

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 د. مولاي الطاهر،  
Université de Saida Dr MOULAY Tahar



N° d'Ordre

كلية العلوم  
Faculté des Sciences  
قسم البيولوجيا  
Département de Biologie

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

**Filière : Sciences biologiques**

**Spécialité : Biochimie**

**Thème**

## **Contribution à l'étude des infections nosocomiales associés aux biofilms bactériens et risques d'antibiorésistance**

Présenté par :

- Mme : Bellia Roqiya
- Mlle : Loukar Nour Elhouda

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Président	Mr. GHELLAI Lotfi	MCA Université de Saida
Examineur	Mr. BENABBOU Taha Ahmed	MCB Université de Saida
Rapporteur	Mr. BELLIL Yahia	MCA Université de Saida

**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 د. مولاي الطاهر، عبيدة

Université de Saida Dr. MOULAY Tahar



N° d'Ordre

كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

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

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème

## **Contribution à l'étude des infections nosocomiales associés aux biofilms bactériens et risques d'antibiorésistance**

Présenté par :

- Mme : Bellia Roqiya
- Mlle : Loukar Nour Elhouda

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Président

Mr. GHELLAI Lotfi

MCA Université de Saida

Examinateur

Mr. BENABBOU Taha Ahmed

MCB Université de Saida

Rapporteur

Mr. BELLIL Yahia

MCA Université de Saida

Année universitaire 2021/2022

## DÉDICACE

*Je dédie ce modeste travail  
À mes très chers parents*

*qui m'ont toujours encouragé et soutenu , ma très chère mère :Dada .k  
Merci pour ta présence, tes conseils, maman. Tu es restée présente par  
ton soutien et tes exhortations à la prière, assurant ainsi ta  
protection maternelle. Que le Dieu t'accorde longue vie et prospérité  
afin que tu jouisses des soins de tes enfants.*

*et mon chère papa B.Ahmed*

*Homme de rigueur et d'une simplicité absolue. Tu nous as  
responsabilisés dès nos jeunes âges ; ton amour et tes sacrifices pour  
nous sont très grands. Ton conseil le plus répété est : « Restes droit et  
honnête quoi qu'il arrive ». Ce travail est le fruit de tes nombreuses  
concessions, ta constante présence et ton immense amour pour nous.*

*Sois en remercié père*

*À mes très chère et adorables sœurs Rania et Meryem*

*À mes deux frères.*

*À ma binôme Noure Elhouda, je la remercie pour le courage qu'elle  
m'a donné et tous les*

*Moments qu'on a passés ensemble.*

*À ma chère amie Fatima .B*

*À tout mes collègues de travail.*

*À ma promotion et tous qui connaisse Roqiya.*

***Roqiya.***

---

*Je dédie ce mémoire à :*

*Mes très chers parents*

*Ce travail est le fruit de vos efforts, de vos prières incessantes, de votre tendresse, et de votre amour. J'espère rester toujours digne de votre estime et ne jamais vous décevoir. Puisse DIEU, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur*

*À mes chères sœurs : khadija, Hadjer, Anfal*

*À mon chère frère : Zizou, Qu'allah vous protège .*

*A mes chères cousins et cousines : Mina, Radia , bouchera, khaulwa, kheir Eddine, Mokhtar*

*A mes meilleures amies : Assia,*

*Samah, Ines, Manel, Housseem, Mokhtar, Samedo, Yacer, Hafid  
merci pour toutes ces fois où j'ai pu compter sur vous; pour tous les bons moments de folie et de joie qu'on a passés ensemble durant toute ses années .*

*À mes très chères : Feryel Amira, Hamidou, Ikram, Bouchera  
.Aucune dédicace ne saurait exprimer l'estime, le respect et l'amour que je vous porte. Je vous aime beaucoup mes chères*

*À mon binôme reqaya et mes copine ikram mentefa  
benmohamed wafaa.*

*À la famille Loukar et mazar*

*Merci beaucoup*

*Nour El houda*

---

## Remerciements

Ce travail est le résultat des efforts conjugués de plusieurs personnes, sans lesquelles il n'aurait pas pris corps. Nous voudrions dire infiniment merci :

Au Docteur Bellil, notre encadreur de mémoire. Vous nous avez fait l'honneur de diriger notre mémoire. Nous vous remercions de vos conseils précieux. Soyez rassuré de toute notre reconnaissance et de notre profond respect.

Au président des jury de notre Thèse Mr GHELLAI Lotfi et Mr. BENABBOU Taha Ahmed pour nous honorer à l'évaluation de ce travail.

Au Directeur, aux enseignants, aux responsables des laboratoires de biologie et chimie et à tout le personnel de l'université de Saida merci pour votre dévouement et vos sacrifices.

A tous les étudiants de la promotion 2022 de biologie, pour la bonne collaboration tout au long de notre formation.

A l'ingénieure Benatta.F de laboratoire de biologie de l'université de Naama

A tous ceux qui nous ont soutenu d'une manière ou d'une autre et dont les noms n'ont pu être cités. Trouvez ici notre profonde reconnaissance.

**IN** : Infection nosocomiales.

**OMS**: Organisation Mondiale de la Santé .

**CLIN** : comités de lutte contre les infections nosocomiales.

**CDC**: Centers for Diseases Control.

**VP** : Vosges-Proskauer.

**RM** : Rouge de Méthyle

**VRS**: Virus Respiratoire Syncytial.

**HAS**: Haute Autorité de santé.

**SARM**: Staphylocoques résistants à la méticilline.

**SARS**: Severe acute respiratory syndrome.

**ERV** : Entérocoque résistante à la vancomycine

**CMV**: Le cytomegalovirus.

**SIDA**: Le syndrome d'immunodéficience acquise.

**VIH** : Le virus de l'immunodéficience humaine.

**SCN** : Staphylocoques à coagulase négative.

**SCT** : Syndrome de choc toxique.

**BMR** : Les bactéries multirésistantes.

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice.

**EBLSE** : Entérobactéries productrices de $\beta$ -lactamases à spectre étendu.

**PLP** : Protéines de liaison aux pénicillines.

**FMAR** : Flore mésophile aérobie revivifiable.

**pH** : Le potentiel hydrogène.

**Gram +** : Gram positif.

**Gram -** : Gram négatif.

**MH** : Gélose Mueller-Hinton .

**GN** : Gélose nutritive.

**BN** : Bouillon nutritive.

**TSI** : Triple Sugar Iron Agar.

**ATB**: anti biotique.

**MR** : Multi resistant



---

**Liste des tableaux**

<b>Tableau 1:</b> Différents mécanismes de résistance bactérienne.....	35
<b>Tableau 2 :</b> Les bactéries signalées comme prioritaires par l’OMS 2017. ....	40
<b>Tableau 3:</b> Les sites et les services hospitaliers des prélèvements effectués.....	62
<b>Tableau 4:</b> Liste des antibiotiques utilisé .....	64
<b>Tableau 5 :</b> Procédé de préparation des dilutions d’antibiotiques.....	71
<b>Tableau 6:</b> Tableau récapitulatif d’identification morphologique et microscopique des souches isolées.....	76
<b>Tableau 7:</b> Résultats d’antibiogramme montre les différent diamètres de la zone d’inhibition.....	81
<b>Tableau 8:</b> L’antibiogramme des souches isolées aux ATB testés. ....	84
<b>Tableau 9:</b> Récapitulatif des résultats des tests biochimiques : .....	89

---

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Fréquences des différents types d'infections nosocomiales.....	7
<b>Figure 2:</b> Prevalence des pathogenes responsables d'infections nosocomiales .....	9
<b>Figure 3:</b> Répartition des micro-organismes responsables de bactériémies et de fongémies nosocomiales . .....	14
<b>Figure 4:</b> Schéma explique la transmission endogène.....	15
<b>Figure 5:</b> Schéma explique la transmission exogène. ....	16
<b>Figure 6:</b> Voies de colonisation des cathéters veineux centraux .....	18
<b>Figure 7:</b> Schéma explique la transmission de l'infection hospitalière.....	20
<b>Figure 8:</b> Principaux mécanismes d'action des antibiotiques .....	31
<b>Figure 9:</b> Les trois principaux mécanismes de la résistance bactérienne aux antibiotiques.....	37
<b>Figure 10 :</b> Biofilm bactérien. ....	44
<b>Figure 11:</b> Représentation schématique des différentes étapes de développement d'un Biofilm .....	45
<b>Figure 12:</b> Un biofilm hétérogène de plusieurs espèces .....	47
<b>Figure 13:</b> Observation de <i>P. aeruginosa</i> au microscope électronique .....	48
<b>Figure 14:</b> Staphylocoques dorés .....	49
<b>Figure 15:</b> <i>E. coli</i> .....	50
<b>Figure 16:</b> Schéma des étapes de prélèvements et l'isolement des souches bactériennes. ....	61
<b>Figure 17:</b> Les prélèvement dans le BN après l'incubation.....	62
<b>Figure 18:</b> La préparation de la microplaque pour tester la formation de biofilm. ....	70
<b>Figure 19:</b> Lecture des résultats de la formation d'un biofilm par le lecteur des microplaques .....	71

---

<b>Figure 20:</b> Microplaque préparer pour le test d'antibiofilmogramme.....	73
<b>Figure 21:</b> Exemple Souches purifiées sur milieux soildes ; (a) Souche 28 sur G. Chapman , (b) souche 27 sur G.MC , (c) souche 09 sur GN .....	75
<b>Figure 23:</b> Résultats du test d'ATB (antibiogramme) de la souche n ° 40 .....	83
<b>Figure 24:</b> Résultat du test d'ATB (antibiogramme) de la souche n°08 .....	83
<b>Figure 25:</b> Résultat du test d'ATB (antibiogramme) de la souche n°15.....	83
<b>Figure 25:</b> Résultats du test CMI avec différentes concentration de l'ATB Céfotaxime par macrométhode .....	85
<b>Figure 26:</b> Résultats du test CMI avec différentes concentrations de l'ATB Amoxiciline par macrométhode. ....	85
<b>Figure27:</b> Résultat du test TSI des souches 15, 17, 19, 08, 02, 38. ....	86
<b>Figure 28:</b> Résultat du test RM des souches 15, 17, 19, 08, 02, 38.....	87
<b>Figure 29:</b> Résultat du test VP des souches 15, 17, 19, 08, 02, 38.....	87
<b>Figure 30:</b> Résultat du test UI des souches 15, 17, 19, 08, 02, 38. ....	88
<b>Figure 31:</b> Résultat du test uréase des souches 15, 17, 19, 08, 02, 38. ....	88
<b>Figure 32:</b> Résultat du test TDA des souches 15, 17, 19, 08, 02, 38.....	89
<b>Figure n° 33:</b> Résultats du test de la formation de biofilm après 24h d'incubation (UFC /ml) .....	90
<b>Figure n°34:</b> Résultats du test de la formation de biofilm après 48h d'incubation (UFC/ml).....	91
<b>Figure n°35:</b> Résultats du test de la formation de biofilm après 72h d'incubation (UFC/ml).....	91
<b>Figure n°36:</b> Résultats de l'antibiofilmogramme (en présence d'Amoxiciline) en UFC/ml.....	92
<b>Figure n°37:</b> Résultats de l'antibiofilmogramme avec Céfotaxime en UFC/ml.....	93

## Résumé

Il s'agit d'une étude dont le but d'isoler, d'identifier des souches pathogènes responsables essentiellement d'infections nosocomiales puis évaluer leur sensibilité vis-à-vis des différents antibiotiques, ainsi leur capacité à former un biofilm. L'isolement de 53 souches (32% bacilles, 68% cocci) aux niveaux de différents services hospitaliers; à partir des patients au cours de leur hospitalisation ainsi qu'à partir de leurs environnements. L'étude de la sensibilité de ces germes vis-à-vis de 12 molécules d'antibiotiques appartenant à différentes classes, par la méthode de disque, a montré l'existence des souches très résistantes (antibiogramme). La détection de la formation de biofilms par la méthode de microplaque a révélé l'émergence des germes formatrice de biofilms après 24h, 48h, 72h d'incubation. L'essai de test antibiofilmogramme a montré que la plupart des souches testées, ont présentés une réssitance aux antibiotiques utilisés ( amoxicilin, céfotaxime).

**Mots clés :** antibiofilmogramme, antibiogramme, antibiotiques, bacilles Biofilms, Cocci , infections nosocomiales, , résistance.

### Abstract

This is a study whose purpose is to isolate, identify pathogenic strains responsible mainly for nosocomial infections and then evaluate their sensitivity to different antibiotics, as well as the ability of isolated strains to form a biofilm. The isolation of 53 strains (32% of bacilli, 68% of cocci) at the level of the various hospital departments Ahmed Medagheri (saida) and the Chnafa brothers and the Rahmani brothers (Mecheria) from the patients during their hospitalization as well as from their environment. The study of the sensitivity of these germs to 12 molecules of antibiotics belonging to different classes of ATB, by the disc method, showed the existence of antibiotic-resistant strains. The detection of biofilm formation (antibiogram) by microplates revealed the emergence of biofilm-forming germs after 24h, 48h, 72h of incubation. The antibiofilmogram test showed that most of the strains tested, showed sensitivity to the antibiotics used (amoxicillin, cefotaxime).

**Keywords:** antibiofilmogram, antibiogram, antibiotics, bacilli, biofilms, cocci, nosocomial infections, , resistance .

## ملخص

هذه دراسة تهدف إلى عزل وتحديد السلالات المسببة للأمراض المسؤولة بشكل رئيسي عن التهابات المستشفيات ثم تقييم حساسيتها للمضادات الحيوية المختلفة، وكذلك قدرتها على تكوين فيلم حيوي.

عزل 53 سلالة (32% عصيات ، 68% كوكسي) على مستويات أقسام المستشفيات المختلفة ؛ من المرضى أثناء إقامتهم في المستشفى وكذلك من بيئاتهم. أظهرت دراسة حساسية هذه الجراثيم مقابل 12 جزيئا من المضادات الحيوية التي تنتمي إلى فئات مختلفة، بطريقة القرص كشفت عن وجود سلالات عالية لمقاومة (antibiogramme). الكشف عن تكوين الأغشية الحيوية بطريقة الصفائح كشف عن تكوين الأغشية الحيوية بطريقة الصفائح الدقيقة عن ظهور جراثيم مكونة للأغشية الحيوية بعد 24 ساعة و 48 ساعة و 72 ساعة من الحضنة. أظهر اختبار المضادات الحيوية أن معظم السلالات التي تم اختبارها ، أظهرت مقاومة للمضادات الحيوية المستخدمة (أموكسيسيلين ، سيفوتاكسيم).

**الكلمات المفتاحية:** فيلم حيوي ، المضادات الحيوية ، التهابات المستشفيات ، اختبار المضادات الحيوية، المضاد الحيوي، مقاومة، عصيات، كوكسي.

---

**Table des matières**

I.1. Introduction :.....	2
II.1. Historique : .....	5
II.2. Définition :.....	6
II.3. Types d'infections nosocomiales :.....	7
II.3.1. Infections urinaires nosocomiales :.....	8
II.3.2. Infections du site opératoire :.....	8
II.3.3. Pneumopathies nosocomiales :.....	8
II.3.4. Septicémies nosocomiales :.....	8
II.4. Les germes responsables des IN : .....	9
II.4.1. Bactérie à Gram positif : .....	10
II.4.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> : .....	10
II.4.1.2. <i>Streptocoque</i> : .....	10
II.4.2. Bactéries à Gram négatif :.....	10
II.4.2.1. - Les Entérobactéries : .....	11
II.4.2.2. - <i>Escherichia coli</i> :.....	11
II.4.2.3. - <i>Klebseilla</i> :.....	12
II.4.2.4. - <i>Klebsiella spp</i> :.....	12
II.4.2.5. - <i>Legionella pneumophila</i> : .....	12
II.4.2.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : .....	12
II.4.3. les Virus : .....	13
II.4.4. Parasites et champignons :.....	13
II.5. L'origine des germes pathogènes responsables des IN :.....	14
II.5.1. Une origine endogène : .....	14
II.5.2. Une origine exogène : .....	15
II.5.3. selon l'origine des germes, deux types d'infections nosocomiales peuvent être distingués : .....	17
II.5.3.1. La flore saprophyte du malade lui même : .....	17
II.5.3.2. Le personnel soignant:.....	17
II.5.3.3. L'environnement : .....	18
II.6. Mode de contamination :.....	18

---

II.6.1. Auto-infection : .....	19
II.6.2. Hétéro infection : .....	19
II.6.3. Xéno-infection : .....	19
II.6.4. Exo-infection :.....	19
II.6.5. Patient réceptif :.....	20
II.7. Les mesures de prévention contre les infections nosocomiales : .....	20
II.1. Définition : .....	29
II.2. Les antibiotiques :.....	30
II.3. La résistance aux antibiotiques : .....	32
II.4. Les mécanismes de l'Antibiorésistance : .....	34
II.4.1. La modification de la cible des antibiotiques : .....	36
II.4.2. la production d'enzymes inactivatrices des antibiotiques :.....	36
II.4.3. L'imperméabilité de la paroi bactérienne : .....	36
II.5. Les bactéries résistantes aux antibiotiques : .....	37
II.5.1. <i>E.Coli</i> : .....	37
II.5.2. <i>K. pneumoniae</i> : .....	38
II.5.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : .....	38
II.5.4. <i>Staphylococcus aureus</i> : .....	38
II.5.5. <i>Streptococcus pneumoniae</i> : .....	39
II.5.6. <i>Clostridium difficile</i> : .....	39
II.6. Les types de BMR : .....	40
II.6.1. Les principaux BMR : .....	41
II.6.1.1. - SARM : <i>S.aureus</i> : .....	41
II.6.1.2. ESBL : .....	41
II.7. Identification de la résistance aux antibiotiques : .....	41
II.8. RECOMMANDATIONS : .....	42
III.1. Définition : .....	44
III.2. Les étapes de formation d'un Biofilm : .....	45
III.2.1. Attachement réversible : .....	46
III.2.2. Attachement irréversible : .....	46
III.2.3. Maturation et formation de colonies : .....	46
III.2.4. Détachement des bactéries : .....	46

---



---

III.3. Les Germes capable de former un biofilm : .....	47
III.3.1. Le genre <i>Pseudomonas</i> .....	47
III.3.2. Les <i>Staphylocoques</i> : .....	48
III.3.3. <i>Streptocoque</i> :.....	49
III.3.4. <i>Escherichia coli</i> : .....	49
III.4. Le pouvoir pathogène :.....	50
III.4.1. <i>P. aeruginosa</i> .....	50
III.4.1.1. Infections à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> :.....	50
III.4.2. <i>Staphylococcus</i> .....	52
III.4.3. <i>Escherichia coli</i> .....	53
III.4.3.1. Infection urinaire :.....	53
III.4.3.2. Infection intestinale : .....	53
III.4.3.3. Septicémies et méningites :.....	54
III.4.4. <i>Klebsiella</i> .....	54
III.4.4.1. <i>K. pneumoniae</i> .....	55
III.5. Les Biofilm dans le secteur médical :.....	56
III.6. Les facteurs favorisant la formation de biofilms :.....	57
III.6.1. Caractéristiques de la surface : .....	57
III.6.1.1. Rugosité de la surface :.....	57
III.6.1.2. Les propriétés physico-chimiques de la surface :.....	57
III.6.1.3. Présence de films protéiques sur la surface :.....	57
III.6.2. Caractéristiques du milieu :.....	57
III.6.3. Propriétés des cellules : .....	58
III.7. Résistance des biofilms aux antibiotiques :.....	58
IV.1. Cadre d'étude :.....	60
IV.2. Prélèvement :.....	60
IV.2.1. Prélèvement à partir des surfaces sèches : .....	60
IV.2.2. Prélèvement à partir des surfaces humides :.....	60
IV.3. Méthodes :.....	62
IV.3.1. L'enrichissement :.....	62
IV.3.2. L'isolement .....	63
IV.3.3. Purification :.....	63

---

---

IV.3.4. Identification : .....	63
IV.3.4.1. Caractère macroscopique : .....	63
IV.3.4.2. Caractère microscopique : .....	63
IV.3.5. Conservation des souches .....	63
IV.3.6. Test d'antibiogramme:.....	64
IV.4. Les Tests d'identification biochimique : .....	65
IV.4.1. Métabolisme des glucides :.....	65
IV.4.1.1. Milieu de culture : Gélose TSI.....	65
IV.4.2. Détermination du type fermentaire : .....	66
IV.4.3. Milieux de culture Urée-indole : .....	68
IV.5. Teste de la formation d'un biofilm : .....	69
IV.6. Préparation des solutions mères d'antibiotiques : .....	71
IV.6.1. Test d'antibiofilmogramme :.....	72
IV.7. Mesure de la CMI (concentration minimales inhibitrice):.....	72
IV.7.1. Dilution en milieu liquide (macrométhode ) .....	72
IV.7.2. Dilution en milieu liquide (microméthode).....	72
V.8. Aspect macroscopique et microscopique des souches après l'isolement : .....	75
V.9. L'antibiogramme : .....	81
V.10. Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	84
V.11. Tests biochimiques .....	86
V.11.1. Métabolisme des glucides : .....	86
V.11.2. Détermination du type fermentaire : .....	87
V.11.2.1. Test RM (Rouge de méthyle) :.....	87
V.11.2.2. Test VP (au Vosges-Proskauer) : .....	87
V.11.3. Métabolisme des peptides : milieux de culture l'Urée-indole .....	88
V.11.3.1. Production d'indole :.....	88
V.11.3.2. Dégradation de l'urée :.....	88
V.11.3.3. Recherch de la Tryptophane Désaminase (TDA) : .....	89
V.12. Capacité de formation d'un biofilm: .....	90
V.13. Test d'antibiofilmogramme : .....	92
V.14. Discussion générale : .....	93
VI Conclusion .....	

---

VII Références bibliographiques .....

VIII Annexes.....

# **PARTIE I. INTRODUCTION**

---

### **I.1. Introduction:**

Les infections nosocomiales (IN) constituent depuis plusieurs décennies une priorité de santé publique. Elles grèvent le pronostic des patients hospitalisés en termes de morbidité et de mortalité. Par conséquent, elles tendent à induire un surcoût des soins en plus. Les politiques de prévention des infections nosocomiales ont été mises en œuvre depuis plusieurs années par les équipes soignantes. Des évaluations nationales et internationales de ces pratiques et de leur diffusion fournissent des informations précieuses dans l'établissement des stratégies de lutte contre l'infection nosocomiale.

Les milieux hospitaliers sont des établissements de soins où un personnel soignant peut prendre en charge des personnes malades ou victimes de traumatismes trop complexes pour être traités à domicile ou dans le cabinet du médecin (Grosgean, 1999).

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), plus de 1,4 millions de personnes dans le monde souffrent de complications infectieuses induites par les soins. Dans certains pays en développement, la proportion dépasse 25% des malades hospitalisés. Dans les établissements modernes des pays dits développés, 5 et 10% des patients admis dans les services de soins aigus contractent une infection liée aux soins (Astagneau, 2016).

L'antibiorésistance est définie comme la capacité d'une bactérie usuellement sensible à un antibiotique à acquérir une résistance partielle ou totale à cet anti-infectieux. La conséquence de cette résistance est de rendre partiellement ou complètement inefficace l'utilisation de l'antibiotique pour l'usage médical dans le cadre d'une infection bactérienne (OMS, 2019; Davison et al., 2000).

Ces germes résistants rendent les infections plus difficiles à traiter avec une augmentation de la mortalité estimée à 33 000 décès en Europe et 23 000 aux USA (Center for Disease Control and Prevention, 2013).

Les biofilms sont des communautés de microorganismes en contact avec une surface. Bien que bénéfiques dans la plupart des environnements,

les biofilms bactériens se développant sur des implants ou lors d'infections chroniques constituent des réservoirs de pathogènes à l'origine de nombreuses infections nosocomiales. Malgré la mise en œuvre de mesures préventives, les biofilms sont difficiles à éradiquer en raison de leur tolérance caractéristique à des doses élevées d'antibiotiques. Cette revue présente les progrès récents de la recherche sur la formation, les fonctions originales et le contrôle de ces communautés, qui permettent à présent d'envisager de nouvelles stratégies dirigées contre les biofilms (David et Jean-Marc, 2012).

L'objectif de notre étude est d'isoler et identifier une collection de souches bactériennes et de déterminer leur sensibilité ou résistance aux 12 antibiotiques et la possibilité de former un biofilm bactérien.

Pour ce la première partie de ce travail a été consacrée à une synthèse bibliographique. Dans la deuxième partie seront présentés le matériel et les méthodes utilisées puis les résultats obtenus. Enfin, on conclure avec une conclusion.

# **PARTIE II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

## II.1. Historique :

Les infections dites nosocomiales (du grec : nosos : maladie et Komein : prendre soin de) ont existé depuis que l'on regroupe géographiquement les malades pour tenter de leur porter assistance. Jusqu'au 19<sup>ème</sup> siècle, ces infections étaient essentiellement les mêmes que celles observées alors dans la communauté (cholera, variole, peste, typhoïde, tuberculose, fièvre puerpérale...) tout au plus la promiscuité de beaucoup d'établissements rendait-elle encore plus probable l'acquisition d'une telle affection. Dès le milieu du 19<sup>ème</sup> siècle, des progrès majeurs vont être réalisés qui permettront de limiter le développement d'infections hospitalières. Ignaz Philippe Semmelweis en 1846 observe que les fièvres puerpérales sont quatre fois moins fréquentes si les accouchements sont effectués par des sages-femmes que des carabines qui pratiquent également des autopsies, en leur imposant une désinfection des mains avant l'accouchement, la mortalité par fièvre puerpérale chuta significativement (Fridkin et al.,1997;Carter et al.,1985).

En 1942, Fleming découvrait la pénicilline. Depuis cette date, les antibiotiques ont amené un vent d'optimisme et d'euphorie qui laissa croire que la pathologie infectieuse, hospitalière ou non, pourra aisément être maîtrisée (Gaudière, 2002)

Dès la fin des années cinquante, on a vu l'apparition des épidémies dévastatrices d'infections hospitalières à staphylocoques dorés résistants à la pénicilline (Gaudière, 2002) . Ceci va susciter un regain d'intérêt pour les infections hospitalières. En effet, si le renforcement des mesures d'hygiène et la découverte de la pénicilline résistante aux pénicillinases vont permettre de mieux contrôler les infections à staphylocoques dorés, d'autres agents, avant tous les bacilles Gram négatif (BGN) mais aussi toutes sortes de bactéries ou de champignons jugés jusqu'alors non pathogènes vont prendre le relais et être à l'origine des infections hospitalières observées aujourd'hui. Ces infections sont difficiles à contrôler car ces agents appartiennent le plus souvent à la flore normale du patient et leur résistance ne fait que s'élargir



parallèlement au développement des nouveaux antibiotiques (ATB) (Gaudière, 2002). Cette évolution dans l'épidémiologie des infections hospitalières est due en fait aux progrès réalisés au cours de ces dernières années permettant maintenant de traiter des patients dont les moyens de défense sont souvent altérés par leur(s) affection(s) de base (Ambrose et al., 1998).

## **II.2. Définition :**

Une infection nosocomiale est une infection (IN) contractée dans un établissement de santé. Le terme nosocomial vient du grec nosos (maladie) et komein (soigner) qui forment le mot nosokomeion (hôpital).

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), Les IN peuvent être décrites comme « des infections survenant chez un patient au sein d'un hôpital ou d'un autre établissement de santé et chez qui cette infection n'était ni présente ni en incubation au moment de l'admission. Cette définition inclut les infections contractées à l'hôpital mais qui se déclarent après la sortie, et également les infections professionnelles parmi le personnel de l'établissement (DUCEL et al., 2002).

L'IN, Pour être considérée comme acquise dans l'établissement, elle ne doit être ni présente, ni en incubation à l'admission du patient dans l'établissement. Un délai de 48 heures entre l'admission et la survenue des symptômes infectieux est habituellement retenu. Ce délai est porté à 30 jours pour les infections du site opératoire (ISO), et à un an après implantation de prothèse ou implant (Astagneau, 2016).

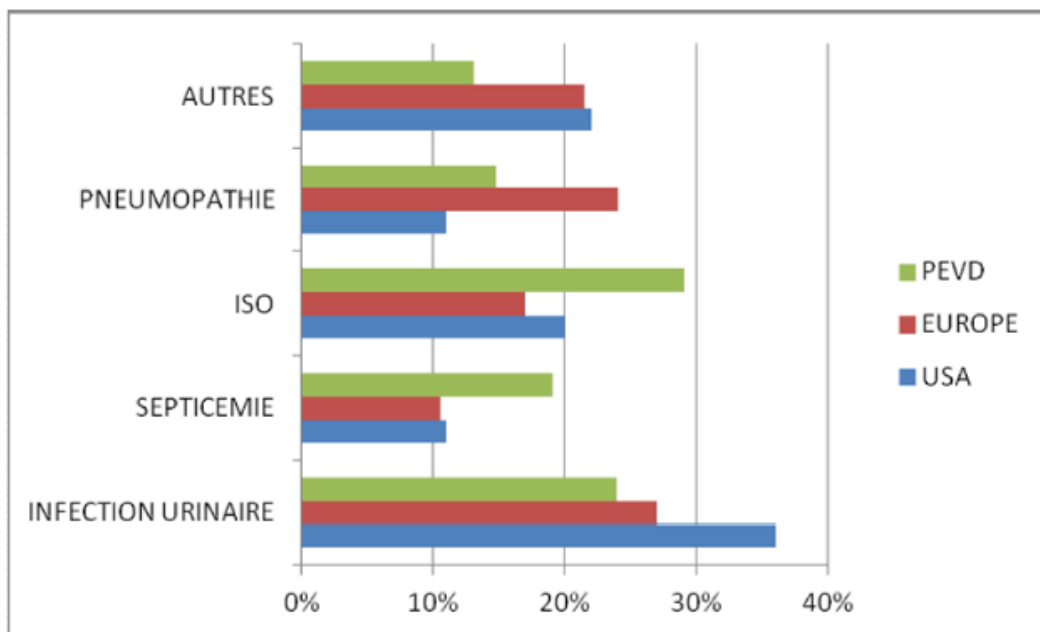
En effet, seul l'hôpital ou l'établissement de court séjour est pris en compte dans cette définition, or le système de santé actuel propose maintenant un réseau de soins beaucoup plus développé.

Les IN posent un véritable problème de santé publique du fait de leur fréquence, leur gravité et leur coût socioéconomique (Bailly et al., 2004 ; Leboucher et al., 2006 ; Vosylius et al. 2003).

### II.3. Types d'infections nosocomiales :

Les 5 principaux sites des infections nosocomiales représentent 70% de l'ensemble des infections nosocomiales avec par ordre d'importance:

- les infections urinaires (35%),
- les infections respiratoires basses (12%),
- les infections du site opératoire (11%),
- les bactériémies (6%) et les infections par cathéter (4%).(ALFANDARI, 1997).(ASTRAGNEAU, 1998).



**Figure 1:** Fréquences des différents types d'infections nosocomiales (European centre for disease prevention and control. 2008)

### **II.3.1. Infections urinaires nosocomiales :**

Pour les infections urinaires nosocomiales, le pathogène principal est sans conteste *E.coli*, avec une prévalence aux alentours de 40% pour les PID (WAGENLEHNER et al., 2011).

### **II.3.2. Infections du site opératoire :**

Dans le deuxième type d'IN les plus fréquentes, les infections du site opératoire, le genre *Staphylococcus* est le plus prévalent.( EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE , 2010).

L'incidence globale des ISO, toutes chirurgies confondues, varie de 0,23% pour la chirurgie vasculaire à 3,29% pour la chirurgie urologique. Lors de l'ENP de 2012, 25% des ISO étaient superficielles (507 pour 2169 ISO tous services confondus), 35 % des ISO profondes (773 pour 2189 ISO) et 40% des ISO d'organes (889 pour 2189) (RAISIN, 2013)

### **II.3.3. Pneumopathies nosocomiales :**

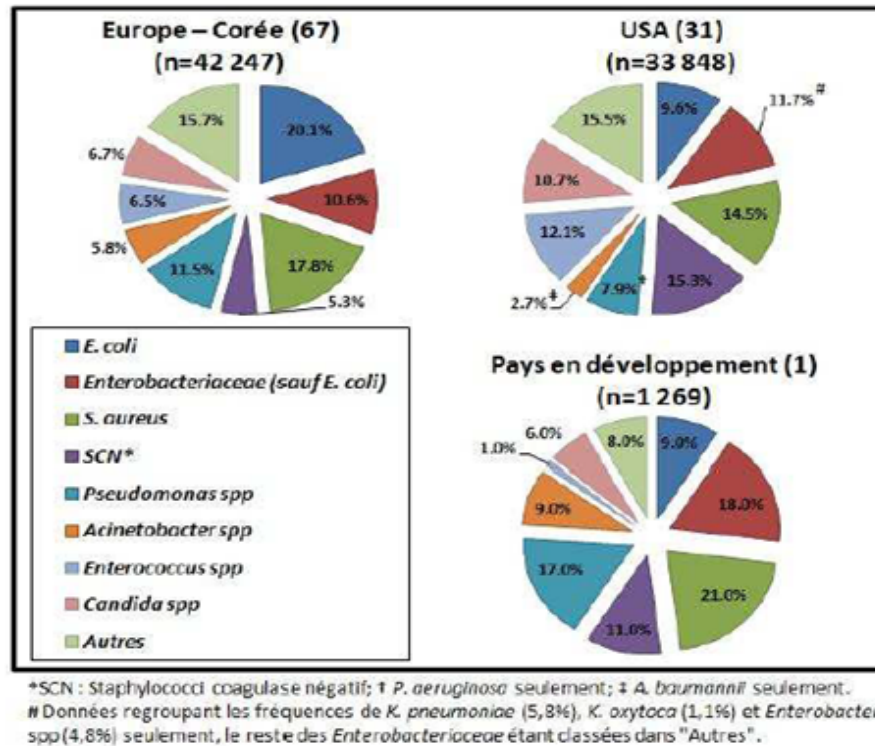
La septicémie, le dernier des types d'IN les plus fréquents, est causée dans environ 40 % des cas par des pathogènes appartenant au genre *Staphylococcus* , surtout par les SCN, qui représentent  $\frac{3}{4}$  des staphylocoques isolés en Europe (European centre for disease prevention and control , 2010).

### **II.3.4. Septicémies nosocomiales :**

La septicémie, le dernier des types d'IN les plus fréquents, est causée dans environ 40 % des cas par des pathogènes appartenant au genre *Staphylococcus* , surtout par les SCN, qui représentent  $\frac{3}{4}$  des staphylocoques isolés en Europe (European centre for disease prevention and control , 2010).

II.4. Les germes responsables des IN :

Figure 2: Prevalence des pathogenes responsables d'infections nosocomiales (OMS 2011)



Les principaux micro-organismes responsables sont les bacilles gram négatif (53%) et les cocci gram positif (33%) : *Escherichia Coli* (21%), *Staphylococcus aureus* (16%), *Pseudomonas aeruginosa* (11%), *Enterococcus spp* (8%). Ces quatre espèces représentent 56% des microorganismes retrouvés dans les infections nosocomiales. (ALFANDARI, 1997 ; ASTRAGNEAU, 1998).

Typiquement, les germes « hospitaliers » diffèrent des germes responsables d'infections dites « communautaires » par les espèces rencontrées et leurs caractères de résistance aux antibiotiques. Ils sont plus volontiers associés aux épidémies, mais la majorité des infections nosocomiales est due à des germes de type « communautaire » encore relativement sensibles aux antibiotiques. Les infections liées à la contamination de matériels venant coloniser ou infecter les malades par contact direct ou indirect, impliquent plus fréquemment des germes saprophytes de l'environnement (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Enterobacter*). (ACAR et al, 1989).

En Europe, les *Entérobactéries* sont les pathogènes principaux (30,7%), avec l'espèce *Escherichia coli* à elle seule isolée dans environ un prélèvement sur cinq (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

Parmi les micro-organismes les plus rencontrés dans les IN, les bacilles à Gram négatif représentent environ 60% et les cocci à Gram positif 30%. (Pilly, 2015).

#### **II.4.1. Bactérie à Gram positif :**

##### **II.4.1.1. *Staphylococcus aureus* :**

Ce sont des cocci à Gram positif regroupés en grappes (Dali Ali, 2015).

C'est la bactérie la plus courante dans toutes les infections de plaies postopératoires. (Birgand, 2014)

*Staphylococcus aureus* (une bactérie cutanée qui colonise la peau et le nez du personnel hospitalier et des patients) provoque diverses infections pulmonaires, osseuses, cardiaques et sanguines et est souvent résistante aux antibiotiques (Vincent et al., 2008).

##### **II.4.1.2. *Streptocoque* :**

Les espèces du genre *Streptococcus* sont les Cocci à Gram positif les plus associés à la pathologie humaine il est la cause d'autres infections invasives et non invasives. On le trouve chez l'homme dans le pharynx ou sur la peau. (Francois et al., 2007)

Cette bactérie est également à l'origine de maladies infectieuses chez les personnes âgées. (Stail et al., 1996)

Ils peuvent être responsables d'infections diverses et surtout d'endocardites et une place très importante dans la pathologie infectieuse communautaire (Nauciel et Vildé, 2007)

#### **II.4.2. Bactéries à Gram négatif :**

les entérobactéries (*E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia marsescens*) peuvent coloniser des sites spécifiques si le système

immunitaire de l'hôte est compromis (site d'insertion d'un cathéter, d'une canule, sonde urinaire) Il provoque des infections graves (infections du site opératoire, infections pulmonaires, bactériémies, infections péritonéales) (Gaudière, 2002).

sont des bacilles à Gram négatif (en forme de bâtonnet droit), des anaérobies facultatifs, largement mobiles par des flagelles péritonéaux ; oxydase négative

#### **II. 4.2.1. - Les Entérobactéries :**

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif (BGN), présents partout dans le sol, dans l'eau, et notamment dans les intestins de l'homme et des animaux (Khayar, 2011).

Sont présentes partout dans le sol, dans l'eau et surtout dans les intestins des humains et des animaux

Leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, leur multiplication rapide, et la captation fréquente des mécanismes de résistance aux antibiotiques expliquent pourquoi ce sont des bactéries couramment impliquées dans la transmission humaine, notamment en milieu hospitalier (Verhaegen, 2004)

#### **-*Escherichia coli* :**

*Escherichia coli* est l'une des espèces bactériennes les plus courantes dans les maladies humaines. Elle est la cause de 60 à 80 % des infections urinaires (Health Canada, 1998).

*E. coli* est également une cause d'infections communautaires et nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus fréquentes des infections néonatales (Quinet et al., 2010), en particulier la méningite ou la septicémie néonatale. Ce colibacille a la forme d'un bâton (Verhaegen, 2004).

*E. coli* est une cause fréquente de bactériémie (Melzer et Petersen, 2007). Il cause 40 à 50 % de toutes les infections nosocomiales (Verhaegen, 2004).

#### **II.4.2.2. -Klebsiella :**

*Klebsiella* est une bactérie encapsulée immobile. Il existe cinq genres, qui peuvent être distingués en fonction de leurs propriétés biochimiques. Elles sont la deuxième cause d'infections urinaires après *E. coli*, les infections des voies respiratoires (Khayar, 2011).

#### **II.4.2.3. -Klebsiella spp :**

L'infection par *Klebsiella* spp. est généralement acquise dans l'environnement hospitalier.

Ces organismes sont une cause importante de pneumonie associée au ventilateur, d'infection des voies urinaires, d'infection des plaies et de bactériémie (Gillespie et Bamford., 2012)

#### **II.4.2.4. -Legionella pneumophila :**

Ce sont des bacilles à Gram négatif, mobiles, aérobies, elles ne cultivent que sur un milieu spécifique

. En milieu hospitalier la contamination peut aussi résulter du rinçage à l'eau courante de matériels mis en contact direct ou indirect avec les voies respiratoires sondes, humidificateurs, appareils à aérosols. La maladie des légionnaires se traduit par une pneumopathie souvent sévère et survient surtout chez des sujets immunodéprimés (Nauciel et Vildé, 2007)

#### **II.4.2.5. Pseudomonas aeruginosa :**

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie à Gram négatif. *Pseudomonas aeruginosa* est devenue une bactérie hospitalière très importante en raison du nombre et de la gravité des infections qu'elle provoque. (Choley, 2010)

Il s'agit d'une bactérie saprophyte environnementale que l'on trouve couramment dans les infections nosocomiales chez les patients immunodéprimés et c'est un micro-organisme ubiquitaire dont l'habitat naturel est l'eau, le sol et les plantes (Dali, 2015).

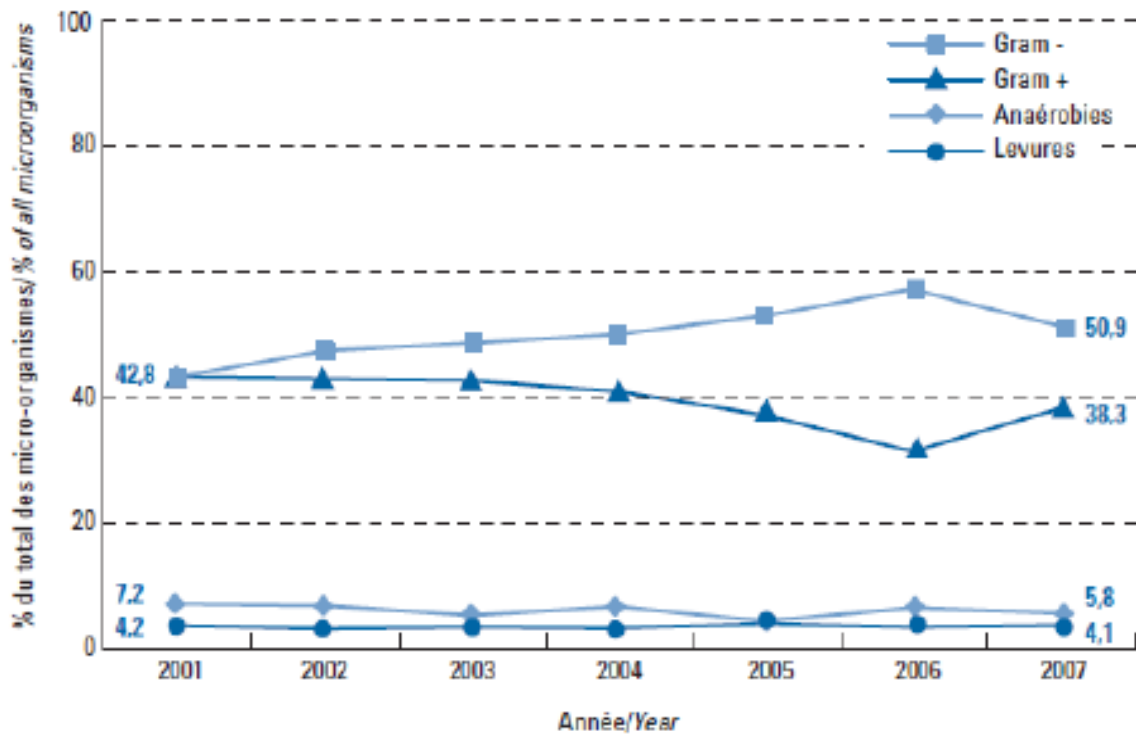
#### **II.4.3. les Virus :**

Il existe une possibilité de transmission nosocomiale pour de nombreux virus, notamment ceux des hépatites B et C (transfusions, dialyse, injections, endoscopie), le virus respiratoire syncytial, les rotavirus et les entérovirus (transmis par contact main bouche et par voie féco-orale). D'autres virus comme le cytomégalovirus, le VIH, le virus Ebola, les virus grippaux, les virus de l'herpès, le virus varicelle zona et le covid-19 sont également transmissibles. (Ducel et al, 2002).

#### **II.4.4. Parasites et champignons :**

Certains parasites (par exemple *Giardia lamblia*) se transmettent facilement chez l'adulte et l'enfant. De nombreux champignons et autres parasites sont des agents opportunistes et provoquent des infections en cas de traitement antibiotique prolongé et d'immunodépression sévère (*Candida albicans*, *Aspergillus* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Cryptosporidium*). Ils sont une cause majeure d'infection généralisée chez les patients immunodéprimés. La contamination de l'environnement par des germes aéroportés comme *Aspergillus* spp. présent dans les poussières et le sol est également préoccupante, en particulier lors de la construction d'hôpitaux. *Sarcoptes scabiei* (agent de la gale) est un ectoparasite qui provoque régulièrement des flambées épidémiques dans les établissements de santé (Ducel et al, 2002).





**Figure 3:** Répartition des micro-organismes responsables de bactériémies et de fongémies nosocomiales (ONERBA, 2010).

## II.5. L'origine des germes pathogènes responsables des IN :

-ils peuvent avoir deux origines ( HORAN TC et al, 2008):

### II.5.1. Une origine endogène :

C'est-à-dire qu'ils font partie de la flore commensale du patient. Les pathogènes sont présents chez le patient avant l'hospitalisation, par exemple au niveau des voies respiratoires, de la peau, de la sphère gastro-intestinale ou génitale.

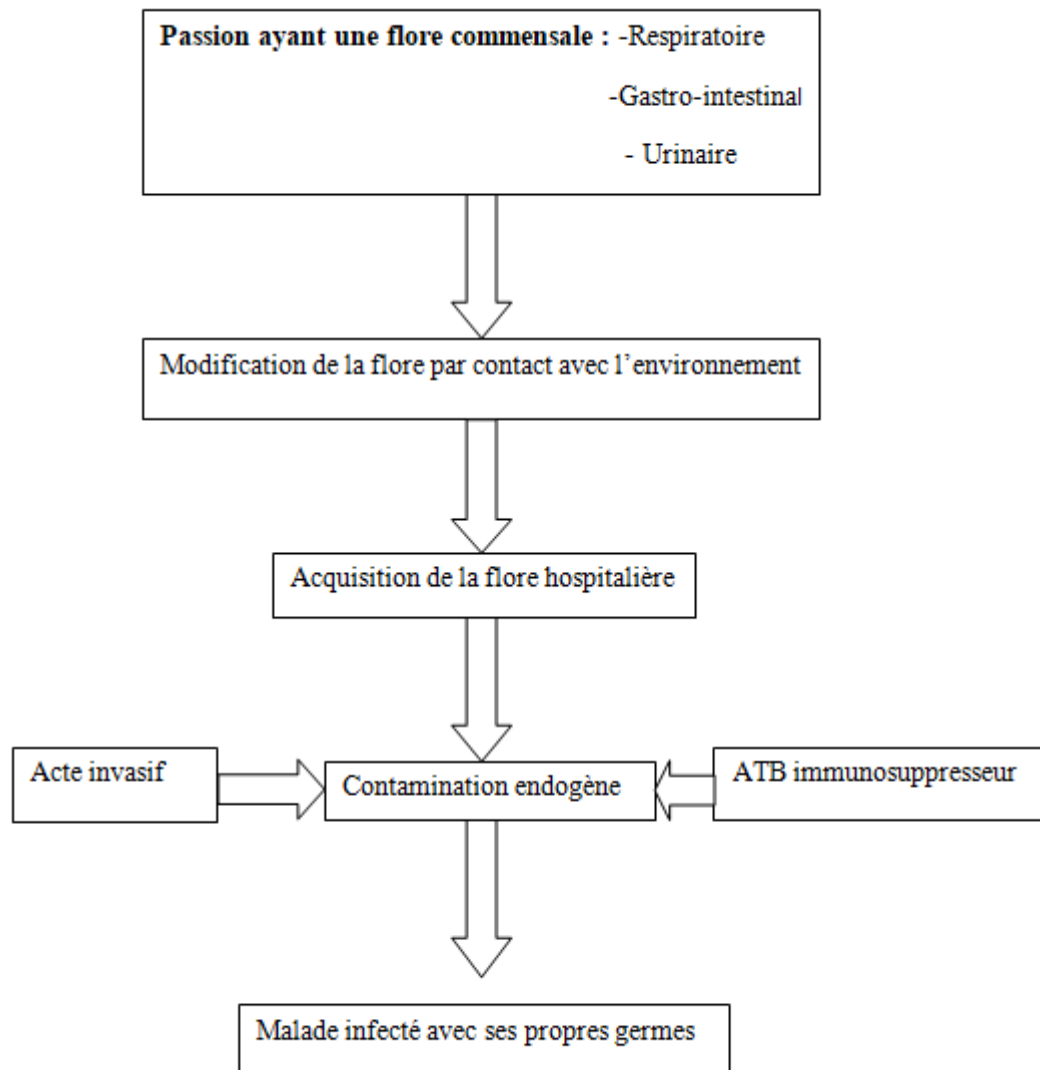
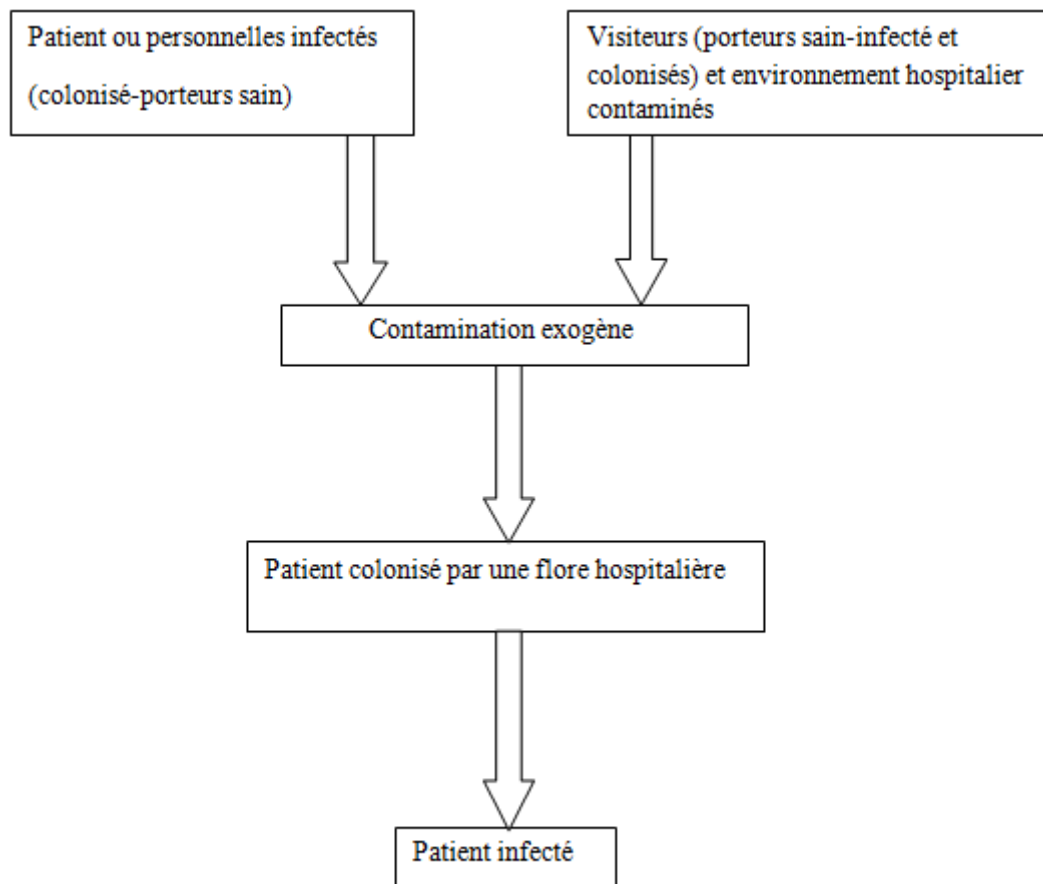


Figure 4:Schéma explique la transmission endogène.

### II.5.2. Une origine exogène :

C'est-à-dire que le patient a été en contact avec ces organismes au cours de l'hospitalisation. Ces pathogènes peuvent provenir de la flore transitoire ou résidente du personnel soignant ou de visiteurs, de dispositifs médicaux (DM) et même de l'environnement et des locaux hospitaliers.



**Figure 5:** Schéma explique la transmission exogène.

Les réactivations d'une infection latente (comme la réactivation du virus de l'herpès ou du zona), les infections trans-placentaires chez le nouveau-né qui se déclarent moins de 48 heures après la naissance (comme une infection par le cytomégalovirus) ou encore l'aggravation d'une infection déjà existante à l'admission du patient, à moins qu'elle ne soit due à un nouveau pathogène ou bien qu'une nouvelle porte d'entrée de l'infection soit identifiée

**II.5.3. Les types d'infections nosocomiales peuvent être distingués selon l'origine du germe:** (Langlois J. 2000).

-**Les infections primaires**, cas où les germes sont présents chez les malades, au moment de leur admission (même s'ils sont des " porteurs sains").

-**Les infections secondaires**, qui résultent d'une colonisation par les germes véritablement hospitaliers (contamination principale au niveau de la peau et du tube digestif) et qui peuvent aboutir à une infection déclarée après un acte de soins, le plus souvent invasif, et/ou parce qu'il y a déficit immunitaire du sujet.

-La population humaine d'un établissement de santé est faite de trois composantes :

-Les malades.

-Les soignants.

-Les visiteurs.

**II.5.3.1. La flore saprophyte du malade lui même :**

Les bacilles gram négatif et plus accessoirement les levures (candida) remplacent les cocci gram positif ou les anaérobies.

. Ces flores saprophytes modifiées colonisent les sites préférentiels chez le malade entraînant une infection de l'appareil urinaire, des plaies opératoires, ou du parenchyme pulmonaire (Samou, 2004)

**II.5.3.2. Le personnel soignant:**

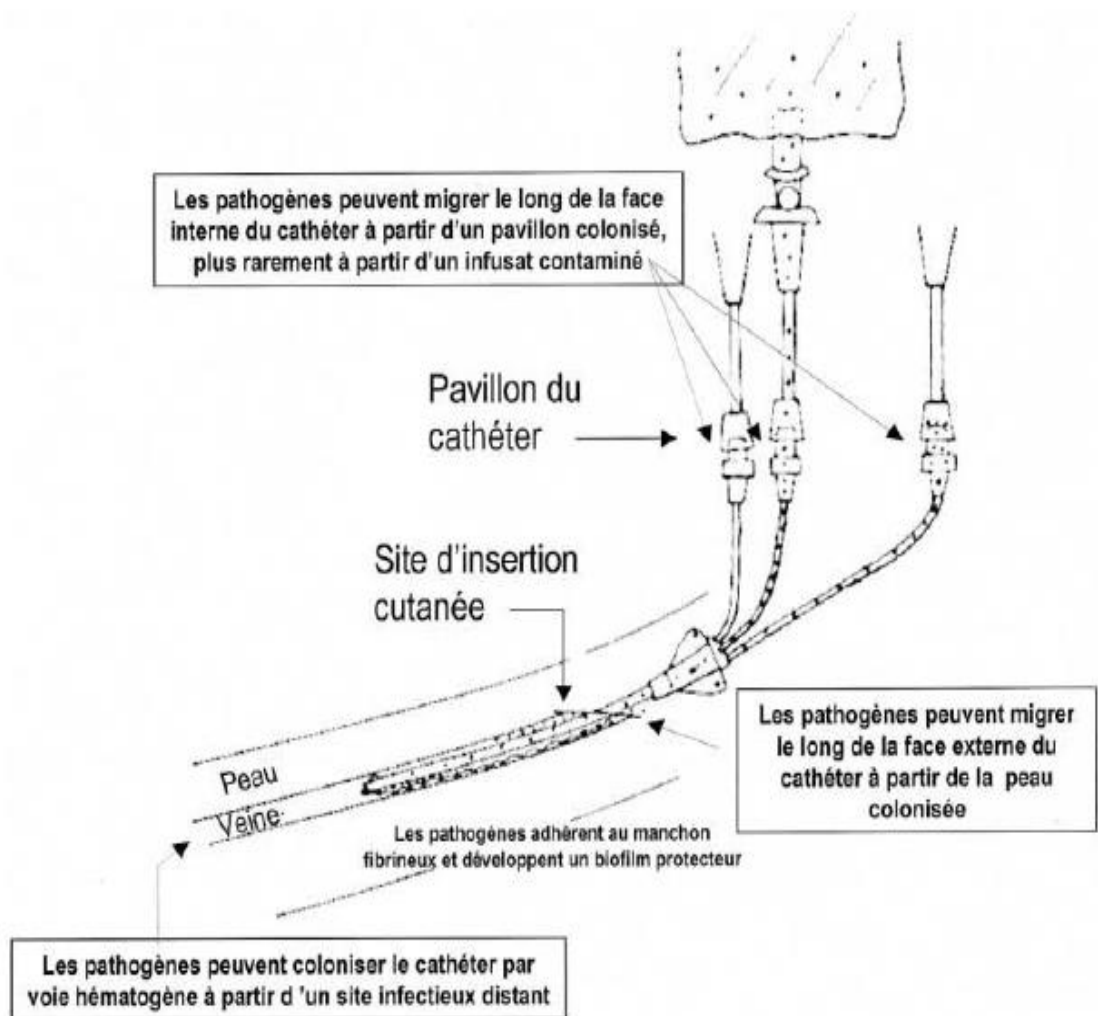
La contamination peut se faire par le biais du personnel soignant qui transmet les germes d'un patient à l'autre avec ses instruments ou ses mains souillées. (Samou, 2004)

### II.5.3.3. L'environnement :

Il peut être contaminé par le personnel ou par le patient. Il 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. (Samou, 2004 ;BOUVET ET CRIMONT, 1989 ;FAGON, 1998 ;TASSEAU et BARON, 1989)

### II.6. Mode de contamination :

Bien que plusieurs sources de contamination soient possibles, le patient reste à l'origine de 50% des infections :



**Figure 6:** Voies de colonisation des cathéters veineux centraux ( Mimos et al, 2001)

-La contamination se fait par l'un des infections suivantes : (BERCHE et al, 1991 ;TASSEAU F et BARON, 1989)

#### **II.6.1. Auto-infection :**

lorsque le malade s'infecte soit par ses propres germes in situ soit à partir de l'environnement immédiat (surface de la peau, vêtement, lit). Ces infections sont dues généralement aux germes saprophytes qui deviennent pathogènes à la suite d'une antibiothérapie itérative ou d'un traitement immunosuppresseur.

#### **II.6.2. Hétéro infection :**

lorsqu'un agent infectieux est transporté d'un malade à un autre provoquant une infection dite croisée ou hétéro-infection. L'agent infectieux est rarement transmis par contact direct ou par voie aérienne. Le plus souvent le vecteur est le personnel soignant par ses mains, et ou ses instruments de travail.

#### **II.6.3. Xéno-infection :**

Les agents infectieux sont importés à l'hôpital par les malades, le personnel soignant, ou les visiteurs qui en sont atteints ou qui sont en phase d'incubation. Ils se transmettent par voie aérienne, par contact direct ou indirect et trouvent à l'hôpital des victimes particulièrement réceptives et des conditions de transmission facilitées. Lorsque la maladie infectieuse est le seul motif d'hospitalisation, les mesures immédiates d'isolement peuvent être prises. Mais dans certains cas l'infection est indépendante du motif d'hospitalisation.

#### **II.6.4. Exo-infection :**

Cette infection est liée à des avaries techniques (stérilisation inefficace, filtre à air non stérile, eau polluée). Les matériaux à usage paramédical ou domestique sont utilisés auprès des malades ; ils sont susceptibles d'être contaminés et peuvent ainsi provoquer des infections nosocomiales souvent épidémiques.

### II.6.5. Patient réceptif :

Certaines pathologies entraînent une légère immunodépression : les malades à risque sont : les brûlés, les grabataires avec des escarres étendues, les polytraumatisés et les porteurs de dispositifs invasifs (assistance respiratoire, sonde urinaire, cathéters divers), les insuffisants respiratoires, les vieillards et surtout les nouveaux nés prématurés. Ils sont donc exposés à une infection nosocomiale.

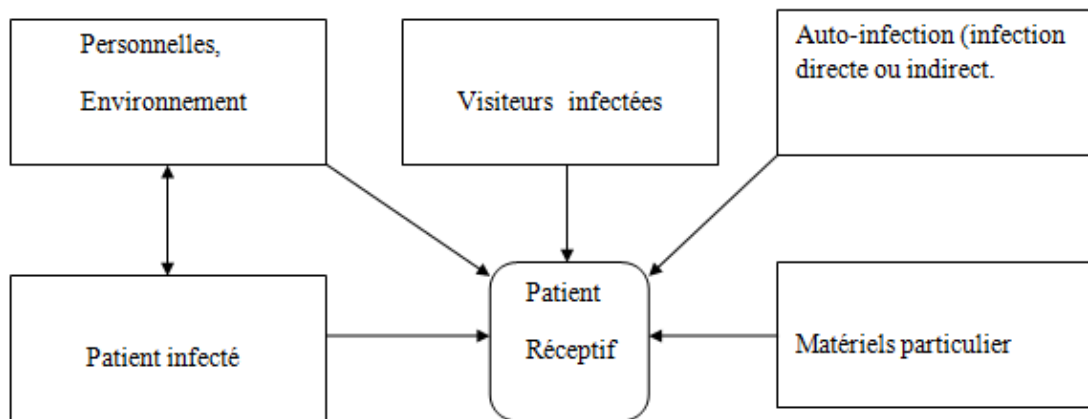


Figure 7: Schéma explique la transmission de l'infection hospitalière.

### II.7. Les mesures de prévention contre les infections nosocomiales :

La prévention des infections nosocomiales est complexe car la plupart d'entre elles relèvent de plusieurs facteurs. S'il est difficile de maîtriser tous les facteurs liés à la situation médicale des patients dans l'état actuel de nos connaissances, la qualité des soins et la sécurité de l'environnement hospitalier doivent faire l'objet d'une vigilance renforcée et d'actions de prévention (Vincent, 2008).

La principale mesure de prévention des IUN repose sur le respect strict de la prescription médicale, des indications de sondage ainsi que sur la limitation de la durée de pose. L'étude réalisée par Jain et al en 1995 sur des patients en réanimation et en médecine montre que le sondage est justifié

dans 79% des cas mais que la durée de sondage est injustifiée dans près de la moitié des cas (ALFANDARI, 2003).

Le respect des bonnes pratiques d'hygiène telles que le changement de gants entre chaque patient, le lavage régulier des mains ou la friction hydro-alcoolique constitue évidemment la base de la prévention des IUN. Selon les situations rencontrées, des mesures différentes peuvent s'appliquer (SPILF, 2002).



# L'ANTIBIO-RESISTANCE

## **II.8. Définition :**

L'émergence de l'antibiorésistance avait été annoncée par Alexander Fleming dès 1945 et concerne désormais toutes les bactéries et tous les antibiotiques.

La résistance bactérienne aux antibiotiques est un enjeu de santé publique majeur. Elle est en augmentation depuis plusieurs décennies, engendrant des difficultés à traiter les patients. Elle entraîne une augmentation de la durée des soins et de la morbidité associée aux infections et peut remettre en cause le pronostic vital

Un premier Plan national pour préserver l'efficacité des antibiotiques a été mis en place en 2001 sur la base d'un rapport d'experts ( Rapport pour un plan national pour préserver l'efficacité des antibiotiques 2001-2005. Anne-Claude).

parfois la résistance a un ATB conféré de la résistance a un autre ATB c'est ce que l'on appelle la résistance croisée ,les bactéries sont dits multi résistante lorsqu'a la suite d'une accumulation de résistance naturelle et acquise il ne sont sensible qu'a un petite nombre d'ATB elle sont donc résistants a plusieurs ATB ou classe pharmacologique d'ATB (Jones, 2001)

Une souche est dite « résistante» lorsque elle a la capacité de se multiplier malgré la présence de l'antibiotique.

La multirésistance concerne les bactéries responsables d'infections communautaires à l'exemple des pneumocoques ou les bacilles de la tuberculose et les bactéries responsables d'infections nosocomiales ou associées aux soins. Certaines résistances sont particulièrement importantes à prendre en compte, car elles concernent des espèces bactériennes qui sont à la fois commensales susceptibles de disséminer dans la population générale et à fort potentiel pathogène. C'est le cas des *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) et des Entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (EBLSE). (Vincent, 2000).

### **II.9. Les antibiotiques :**

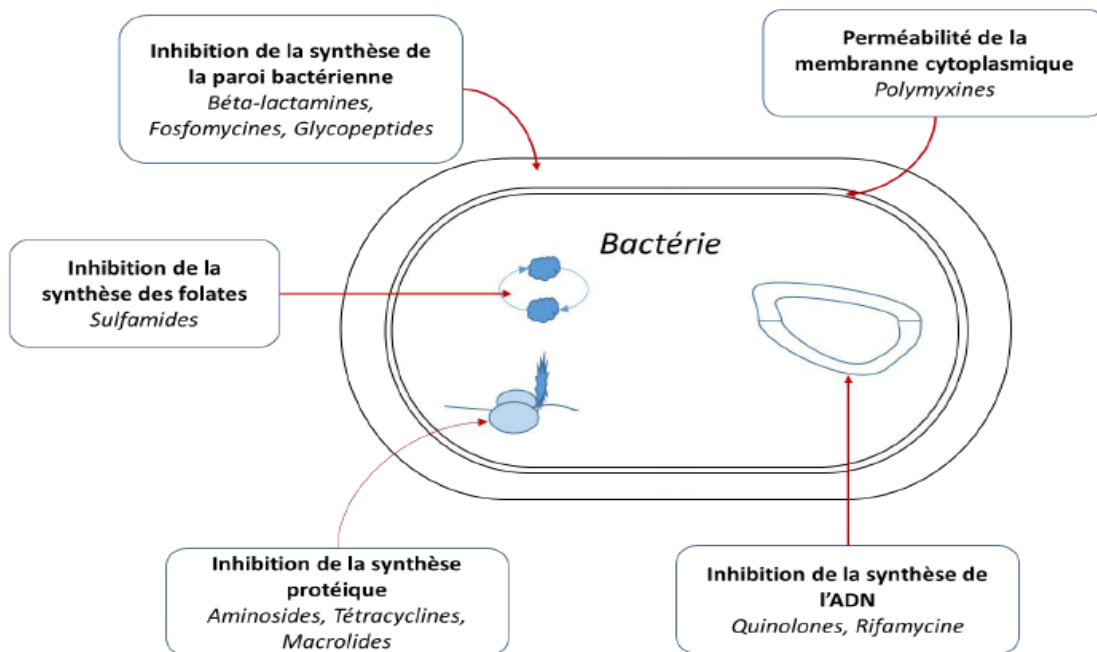
La découverte des antibiotiques a été une des grandes avancées médicales du 20<sup>ème</sup> siècle. Ces molécules permettent de bloquer la croissance des bactéries ou de les détruire. Dans le premier cas elles sont appelés bactériostatiques, dans le deuxième cas bactéricides (Walsh, 2013; Waglechner et Wright, 2017).

Les antibiotiques peuvent être des produits de synthèse, mais la plupart sont produits de façon naturelle par des microorganismes pour réguler leur croissance, ou lorsqu'ils sont soumis à des conditions particulières.

Les propriétés bactériostatiques ou bactéricides des antibiotiques proviennent de leur capacité à bloquer une étape d'un mécanisme essentiel à la multiplication ou à la survie des bactéries. Pour cela visent une cible spécifique de la cellule bactérienne, présentant ainsi une toxicité sélective, c'est-à-dire, qu'aux doses utilisées, ils n'affectent que certaines bactéries et non pas l'hôte infecté.

La classification des antibiotiques peut se faire selon leur origine (naturelle ou de synthèse), leur mécanisme d'action sur la bactérie, leur spectre d'activité ou encore leur nature chimique. Les principaux mécanismes d'action que l'on peut rencontrer diffèrent selon la molécule considérée. Ainsi, les antibiotiques peuvent agir, entre autre, sur : (1) la paroi

bactérienne ; (2) la membrane interne ; (3) le génome bactérien ; (4) la synthèse protéique ; ou (5) la synthèse des folates (Figure n°9).



**Figure 8:** Principaux mécanismes d'action des antibiotiques (Marion, 2020)

1- Certains antibiotiques bloquent la synthèse d'éléments de la paroi bactérienne, dont le rôle est de maintenir la pression osmotique et protéger la bactérie du monde extérieur. La membrane de la cellule est alors fragilisée, et la lyse bactérienne survient. Ce blocage confère une activité bactéricide. Ce mécanisme entre en jeu pour les bêta-lactamines, comme les pénicillines ou les céphalosporines, la fosfomycine, ou encore les glycopeptides, comme la vancomycine.

2-D'autres agissent sur l'intégrité de la membrane plasmique de la bactérie, qui permet de retenir les éléments nécessaires à sa survie dans le cytoplasme, et de maintenir un gradient chimio osmotique. Les antibiotiques peuvent agir sur cette membrane de deux façons : en désorganisant sa structure, ou en formant un canal dans la membrane, entraînant la fuite des composés cellulaires. On retrouve ce procédé chez les polymyxines par exemple.

3-Les antibiotiques peuvent aussi bloquer la réplication de l'ADN bactérien ou la transcription de l'ADN en ARN, suivant différents mécanismes. Pour cela, ils doivent pénétrer dans la cellule et interrompre un élément de la chaîne de réplication. Ce processus concerne les quinolones ou la rifamycine.

4-D'autres inhibent la synthèse des protéines, essentielle à la survie de la cellule. L'antibiotique pénètre dans la cellule, et bloque le ribosome bactérien, structure du cytoplasme nécessaire à la synthèse des protéines. De nombreux antibiotiques fréquemment utilisés ont pour cible le ribosome, comme les aminosides, les cyclines, ou les macrolides.

5-Enfin, certains antibiotiques inhibent la synthèse des folates, éléments essentiels à la formation de constituants nécessaires à la survie cellulaire : lipides, acides aminés, nucléotides. Ce mécanisme concerne les sulfamides par exemple.

#### **II.10. La résistance aux antibiotiques :**

On définit la résistance aux antibiotiques d'une bactérie comme l'absence d'effet d'un antibiotique pour lequel l'espèce bactérienne est naturellement sensible, c'est-à-dire pour laquelle on attend un effet thérapeutique lors d'un traitement à dose habituelle par voie générale (Walsh C, 2003) (Waglechner et Wright, 2017).

Le phénomène de résistance aux traitements n'est pas spécifique aux bactéries et aux antibiotiques. Des résistances sont observées chez les virus, les champignons, ou même dans les cellules humaines, dans le cas des traitements contre le cancer ou le diabète. De nombreux mécanismes entrent en jeu dans ce phénomène. Concernant les bactéries résistantes aux antibiotiques, plusieurs processus ont été mis en évidence (Courvalin, 2008) (Davies et Davies, 2010).

Dans certains cas, la structure de la cible de l'antibiotique est modifiée, réduisant l'affinité de l'antibiotique avec celle-ci. Dans d'autres, c'est la surexpression du gène de la molécule cible, augmentant sa production, qui permet de dépasser la capacité d'action de l'antibiotique et de maintenir

suffisamment d'activité pour se développer. Certains mécanismes de résistance impliquent une diminution de l'accès à la cible bactérienne, par la réduction de la perméabilité membranaire (modification de la structure des porines ou réduction de leur nombre par exemple), ou par la production de pompes à efflux qui larguent l'antibiotique hors de la bactérie. Enfin, certaines bactéries agissent directement sur les antibiotiques, en les inhibant à l'aide d'une enzyme, comme les bêta-lactamases ou les carbapénemases.

Lorsque ces mécanismes ne sont pas présents naturellement chez une espèce bactérienne, la résistance peut provenir de l'acquisition de nouveaux gènes de résistance, phénomène qui peut survenir de deux façons : par transfert vertical (descendance) ou horizontal (transfert d'une bactérie à une autre). Dans le cadre d'un transfert vertical, les gènes de la bactérie peuvent avoir muté, au niveau d'un emplacement génomique stratégique, entraînant une modification de structure ou une modulation d'expression d'une molécule, la molécule cible par exemple. Ces gènes seront ensuite répliqués lors de la division cellulaire, et conservés par les deux cellules filles. Dans le cadre d'un transfert horizontal, la bactérie peut acquérir un ou plusieurs gènes de résistance via des éléments transposables, provenant d'autres microorganismes, via des transposons ou des plasmides. Ces gènes peuvent être intégrés dans le chromosome bactérien, ou s'exprimer directement dans la cellule. Ceci permet des transferts de gènes de résistance entre les bactéries, et l'acquisition de plusieurs gènes de résistance pour une même bactérie. Ainsi, des transferts de gènes de résistance peuvent se faire entre des bactéries de même espèce, mais aussi d'espèces différentes. Ces transferts représentent le mécanisme de résistance le plus répandu, soit 80% des résistances acquises (Courvalin, 2008 ; Davies et Davies, 2010).

Le développement de la résistance est donc un processus naturel mais celui-ci est accéléré par la pression de sélection exercée lors de l'exposition aux antibiotiques. Lors d'une prise d'antibiotiques, seules les bactéries sensibles sont détruites, en conséquence, les bactéries présentant une résistance, non majoritaires dans le microbiote humain, peuvent bénéficier

des nutriments et de la place laissée par la destruction des bactéries sensibles pour se multiplier. Lorsque ces bactéries résistantes font partie des bactéries causant l'infection, des difficultés de traitement peuvent en résulter. Mais ces bactéries résistantes peuvent également appartenir à la flore commensale de l'individu, on parle alors de colonisation (ou portage). Ces bactéries colonisatrices peuvent ensuite être responsables de nouvelles infections sur le même site anatomique ou sur un site différent. Avec ou sans infection, ces bactéries résistantes peuvent être transmises à d'autres individus, en particulier à l'hôpital. D'autres mécanismes peuvent être mis en cause dans une diminution de l'efficacité du traitement antibiotique, comme la formation d'un biofilm, qui est un agrégat de plusieurs milliers de bactéries, présentant une protection contre le traitement. Ces mécanismes ne seront pas traités dans ce document. Ils correspondent d'ailleurs plutôt à une tolérance qu'à une résistance telle qu'on peut la tester en laboratoire.

### **II.11. Les mécanismes de l'Antibiorésistance :**

La résistance bactérienne aux antibiotiques se caractérise par son caractère naturel ou acquis, son mécanisme et son support génétique. La résistance naturelle est une caractéristique propre aux souches d'une espèce bactérienne. Elle détermine les phénotypes sauvages des espèces bactériennes. Elle est transmissible à la descendance car portée par un chromosome.

La résistance acquise ne s'applique qu'à certaines souches au sein de la même espèce bactérienne, variable dans le temps. Elle est transmissible horizontalement entre bactéries d'une même espèce, parfois entre espèces différentes (rôle dans les épidémies). La transmission verticale de la bactérie mère à fille est possible, en l'absence d'une pression de sélection permettant de la stabiliser. La résistance acquise est due à une modification génétique : mutation ponctuelle, remaniement du génome ou acquisition de matériel génétique étranger. Au niveau génétique, il existe plusieurs mécanismes principaux permettant l'acquisition de résistance dont la mutation, la

transformation ou encore la conjugaison plasmide (FINES et LECLERCQ, 2004).

Il y a deux supports essentiels :

- Le premier support est chromosomique : mutation ponctuelle soit dans un gène de régulation, de production d'enzymes par exemple, soit dans un gène de structure d'une enzyme.

- Le deuxième support est extra-chromosomique, portée par des plasmides, transférables à d'autres bactéries.

-Trois mécanismes principaux sont responsables de la résistance bactérienne aux antibiotiques (Figure n°11) ( Mainardi et al, 1996):

**Tableau 1:** Différents mécanismes de résistance bactérienne

Mécanisme de résistance	Conséquence
Inhibition enzymatique	Production d'une enzyme qui inactive ou détruit l'ATB (Mécanisme le plus répandu).
Réduction de la perméabilité cellulaire	Changements de perméabilité de la paroi ou de la membrane bactérienne empêchant le médicament d'atteindre sa cible
Altération des sites de liaisons cibles par ATB	Baisse de l'affinité de l'ATB pour son site d'action
Pompes à efflux	ATB éjecté de la cellule par transport actif et site d'action devenant inaccessible



### **II.11.1. La modification de la cible des antibiotiques :**

(Mutation de l'ADN gyrase et de la topo-isomérase IV entraînant l'inefficacité des fluoroquinolones, ou encore altération de la cible ribosomale des macrolides ou des tétracyclines) ;

### **II.11.2. la production d'enzymes inactivatrices des antibiotiques :**

(bêtalactamases, aminosides phosphotransférase, aminosides adényltransférase, aminosides acétyltransférase) ;

### **II.11.3. L'imperméabilité de la paroi bactérienne :**

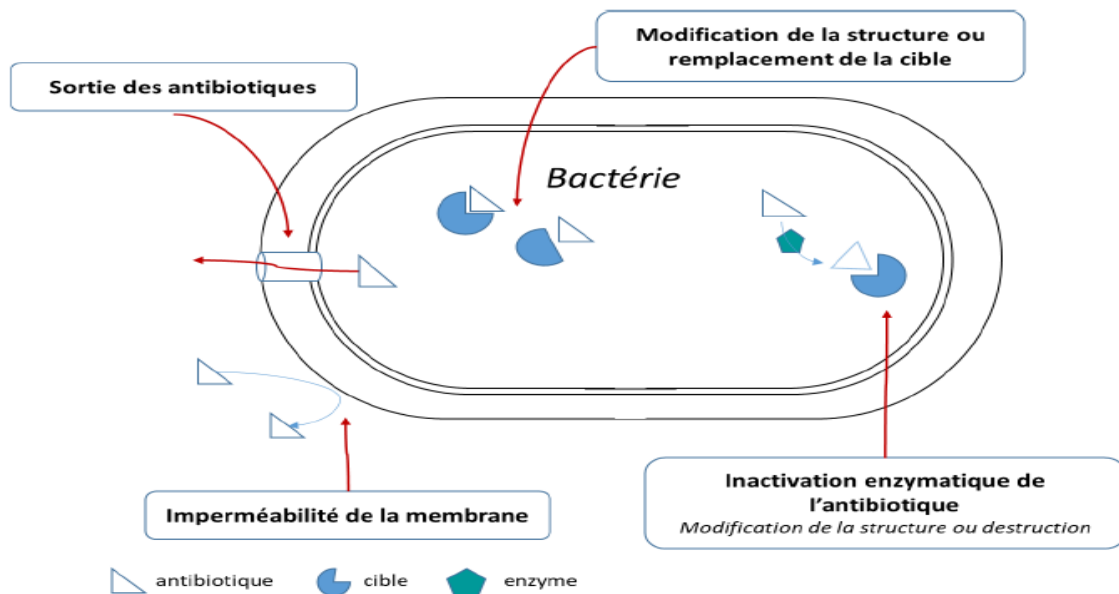
Ce dernier mécanisme contribue à diminuer la concentration d'antibiotique en contact avec la cible :

Ce phénomène peut avoir lieu par modification des composants de la paroi (porines) qui réduisent la vitesse de diffusion des antibiotiques et/ou par leur expulsion de manière active vers le milieu extracellulaire via des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux.

Plusieurs mécanismes de résistance peuvent exister pour un antibiotique donné, et une bactérie peut avoir une résistance à plusieurs molécules expliquant la multirésistance bactérienne ( Mainardi et al., 1996)

La connaissance de l'épidémiologie de la résistance bactérienne et son évolution dans le temps, en fonction de la progression ou de l'apparition des mécanismes de résistance, sont fondamentales pour établir des propositions d'antibiothérapie probabiliste.

L'exposition d'une bactérie à un antibiotique implique tôt ou tard l'apparition d'un mécanisme de résistance. Ainsi plusieurs études ont mis en évidence le parallélisme entre la prévalence d'une infection nosocomiale et la fréquence de souches bactériennes résistantes.



**Figure 9:** Les trois principaux mécanismes de la résistance bactérienne aux antibiotiques. (Marion, 2020)

### II.12. Les bactéries résistantes aux antibiotiques :

-Parmi les bactéries pathogènes qui représentent une forte résistance aux ATB il ya :

#### II.12.1. E.Coli :

La proportion d'E. Coli résistants aux antibiotiques a considérablement augmenté au cours de la dernière décennie, et l'émergence de souches combinant des résistances à plusieurs classes d'antibiotiques est de plus en plus fréquente.

La résistance aux aminopénicillines est la plus répandue. Elle est soit l'unique résistance de la souche (33,3% des souches), soit associée avec une ou plusieurs autres résistances. Elle est fréquemment combinée à la résistance aux fluoroquinolones (84,8% des souches multirésistantes), qui est la deuxième résistance la plus fréquente.

La résistance aux céphalosporines de 3ème génération (C3G), si elle est la moins fréquente. Avec l'émergence de souches produisant des carbapénémases , la prise en charge des patients atteints d'IN va devenir de

plus en plus compliquée dans les prochaines années, au vu de la prévalence d'E. coli dans ces infections. (Monnet, 2011).

#### **II.12.2. *K. pneumoniae* :**

*K. pneumoniae* est naturellement résistante aux aminopénicillines (amoxicilline, ticarcilline) par production d'une  $\beta$ -lactamase. De nombreuses souches de *K. pneumoniae* résistent aux inhibiteurs des beta-lactamases (des beta-lactamases de classe A de type IRT , insensibles à l'acide clavulanique.(Heaggman, 1997).

#### **II.12.3. *Pseudomonas aeruginosa* :**

*Pseudomonas aeruginosa* possède une résistance naturelle à un grand nombre d'antibiotiques en raison de la production d'une bêta-lactamase qui n'est pas inhibé par le clavulanate, et une mauvaise perméabilité membranaire. *Pseudomonas aeruginosa* est donc naturellement résistant aux pénicillines, à la plupart des céphalosporines de troisième génération .*Pseudomonas aeruginosa* est aussi résistant à la kanamycine (Poole, 2004).

A-côté de la résistance naturelle existe aussi la résistance acquise. Cette résistance ne concerne que quelques ou de nombreuses souches d'une espèce donnée. Ces souches dérivent de bactéries initialement sensibles (phénotype résistance). Elle résulte de changements dans le génome bactérien par une mutation soit l'acquisition des informations génétiques étrangères (Mulvey et al., 2009).

#### **II.12.4. *Staphylococcus aureus* :**

Comme toutes les bactéries Gram positif, *Staphylococcus aureus* présente une résistance naturelle à l'aztréonam, colistine et à l'acide nalidixique. Sa particularité est d'avoir une résistance naturelle à la ceftazidime uniquement parmi les céphalosporines.

La résistance à la méticilline est un problème majeur de santé publique. Ces staphylocoques ont acquis le gène mec qui permet la synthèse d'une enzyme (PBP2a ou PBP2') n'ayant qu'une affinité très faible pour les  $\beta$ -

lactamines, qui ne peuvent plus exercer leur action inhibitrice. La plupart de ces staphylocoques sont également résistants aux quinolones et aux macrolides. Les staphylocoques communautaires sont habituellement sensibles à la méticilline. Les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) sont principalement observés en milieu hospitalier. Les souches hospitalières sont caractérisées par leur résistance aux antibiotiques notamment aux Bêta -lactamines. (Ahamogbe, 2014).

#### **II.12.5. *Streptococcus pneumoniae* :**

Pour cette bactérie, des résistances ont été décrites contre les pénicillines et contre les macrolides. Les SPNP (sensibilités à la pénicilline : intermédiaires et résistants) sont non-sensibles aux deux classes d'antibiotiques. Dans deux pays, la prévalence y est supérieure à 25% : en Bulgarie et à Chypre.

#### **II.12.6. *Clostridium difficile* :**

Résistantes aux macrolides, aux lincosanides, aux tétracyclines et aux fluoroquinolones sont respectivement de 44,4%, 46,1%, 9,2% et 37,5%. De plus, 36,4% des souches sont résistantes à la fois aux macrolides et aux fluoroquinolones ( Barbut et al., 2007).

Une souche particulièrement virulente à fait son apparition au Canada en 2003 ( Eggertson, 2004 ; Muto, 2005), et s'est maintenant répandue aux USA, au Japon et en Europe (JJosephn et al, 2005 ; Kuijper et al, 2008). Cette souche, le ribotype 027 ou pulsotype NAP1 (pour National American Pulsotype 1), est fortement résistante aux fluoroquinolones et à l'érythromycine (100% des isolats), mais sensible à la clindamincine (lincosanide) ainsi qu'à la vancomycine et au metronidazole (anti-anaérobies). Le taux de mortalité dans les infections dues à cette souche est élevé, entre 15% et 20% (Kuijper et al, 2008).

**Tableau 2** : Les bactéries signalées comme prioritaires par l'OMS 2017.

Priorité	Bactérie	Résistance
Critique	<i>A.baumannii</i> <i>P.aeruginosa</i> Entérobactéries	Aux carbapénèmes Aux carbapénèmes Aux carbapénèmes Productrice de bêta-lactamase a spectre étendu
Haute	<i>E.faecium</i> <i>S.aereus</i>  <i>H.pylori</i> <i>Campylobacter</i> <i>Salmonella spp</i> <i>N.gonorrhoeae</i>	A la voncomycine A la méticilline A la voncomycine A la clarithromycine Aux fluoroquinolones Aux fluoroquinolones Aux fluoroquinolones Aux céphalosporines de 3 <sup>eme</sup> génération
Moyenne	<i>S.pneumoniae</i> <i>H.influenzae</i> <i>Shigella spp</i>	Non sensible aux pénicilline A l'ampicilline Aux fluoroquinolones

**II.13. Les types de BMR :**

La multi résistance est ainsi une étape vers l'impasse thérapeutique. Elle concerne les bactéries des infections communautaires (ex : pneumocoque, bacilles de la tuberculose) et les bactéries des Infections Nosocomiales (Savey et Troadec, 2001).

### **II.13.1. Les principaux BMR :**

#### **II.13.1.1. - SARM : *S.aureus* :**

Il sont résistants à toutes les  $\beta$ -lactamines et très souvent résistants aux aminosides, aux macrolides et aux fluoroquinolones.(Vincent, 2000).

#### **II.13.1.2. ESBL :**

Ils sont résistantes à de nombreuses  $\beta$ -lactamines (sauf imipénème), et souvent céphamycines pour les espèces qui y sont naturellement sensibles, et très souvent résistantes aussi aux aminosides et aux fluoroquinolones. (Vincent, 2000).

#### **- Entérocoque résistante à la vancomycine (ERV) :**

Certaines souches épidémiques résistantes à l'imipénème conduisent à des impasses thérapeutiques (Vincent, 2000). Les souches de *P.aeruginosa* résistantes aux  $\beta$ -lactamines (ticarcilline, ceftazidime ou imipénème) ont tendance à être résistantes aussi aux aminosides et aux fluoroquinolones (Vincent, 2000).

### **II.14. Identification de la résistance aux antibiotiques :**

Dès 2013, l'OMS a révisé la CIM-10 afin d'incorporer des codes relatifs à la résistance aux antibiotiques plus précis (World Health Organization,2019). Cette mise à jour repose sur la création de trois nouveaux groupes de code : U82 (Résistance aux antibiotiques  $\beta$ -lactamines [ $\beta$ -lactames]), U83 (Résistance aux autres antibiotiques) et U84 (Résistance aux autres antimicrobiens) . Cette révision a été applicable dans le PMSI dès 2014 avec incorporation de certains de ces codes dans la liste des CMA (ATIH. Manuel des GHM,2019). Par ailleurs, des codes plus précis ont aussi été créés tels que « U8210 : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline – SARM ». Les situations d'utilisation de ces codes de résistances ont été établies par l'ATIH, ils sont activés uniquement en cas d'infection et doivent respecter les deux conditions suivantes rappelées dans le « Fascicule de codage pour le PMSI,

Maladies Infectieuses » de Décembre 2014 (ATIH, 2019) : « La résistance doit être mentionnée dans le compte rendu du laboratoire de bactériologie »

#### **II.15. RECOMMANDATIONS :**

1. Faire de l'antibiorésistance une Grande Cause Nationale.

2. Encadrer les prescriptions d'antibiotiques par trois mesures : limiter le remboursement de l'antibiothérapie curative à 7 jours ; le limiter à 24 heures pour l'antibioprophylaxie (geste dentaire en ville, intervention en établissement de santé) ; renforcer les mesures de Rémunération sur Objectifs de Santé Publique portant sur la prescription antibiotique.

3. Généraliser l'aide à la prescription des antibiotiques à l'hôpital et en ville : renforcer l'enseignement sur l'antibiothérapie, la vaccination et l'hygiène ; rendre obligatoire un service de conseil en antibiothérapie dans les centres hospitaliers ; créer un Centre régional de conseil à destination des praticiens de ville et une astreinte régionale d'infectiologie dans chaque région ; autoriser les infirmières, après une formation adaptée, à réaliser les tests rapides d'orientation diagnostique.

4. Renforcer la couverture vaccinale : Rendre obligatoire la vaccination annuelle contre la grippe saisonnière pour les personnels soignants ; organiser la vaccination antigrippale et anti-pneumococcique des personnes âgées hébergées dans les établissements de soins.

5. Promouvoir l'hygiène à l'hôpital, dans les collectivités et dans les familles

6. Promouvoir la recherche en matière d'antibiorésistance et de nouveaux antibiotiques.

# **LE BIOFILM MICROBIEN**



### III.1. Définition :

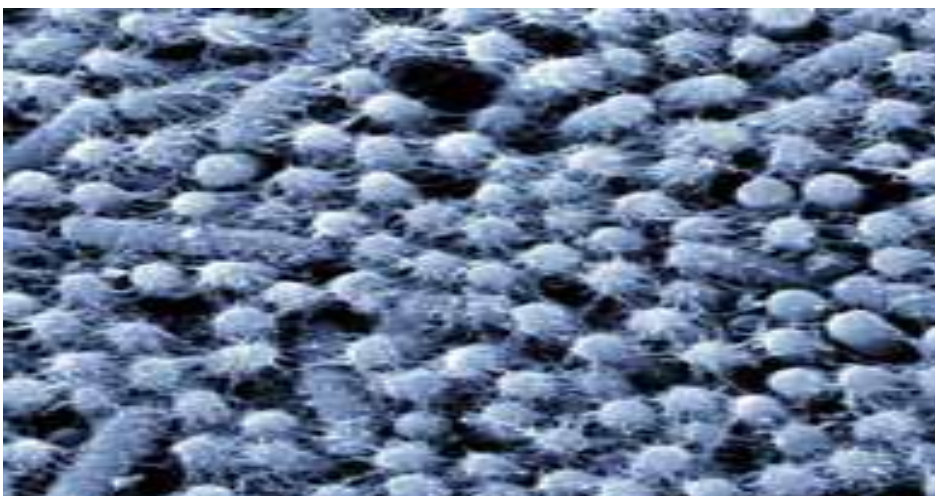
Dans les écosystèmes naturels, les micro-organismes vivent généralement dans des communautés microbiennes appelées biofilms. (Flemming et al, 2001)

Les biofilm sont généralement définis comme des agrégats de micro-organismes. (Flemming et al, 2016).

Ils sont contenus dans une matrice de polysaccharides appelés Polymères Extracellulaires (EPS), produite par le micro-organisme lui-même, cette matrice est composée principalement de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques et de lipides, apportant stabilité et protection à l'organisme (Flemming et Wingender, 2010).

Ils sont observés en milieux aqueux ou exposés à l'humidité, ils peuvent pousser sur tout type de surface naturelle ou artificielle, qu'elle soit minérale (roches, interface air-liquide, etc.), organique (peau, tube digestif, racines et feuilles des plantes ), industrielle (tuyau, coque) ou médical (prothèse, cathéter, sonde urinaire, etc.) (Lock, 1993; Costerton et al, 1994; Dawgul et al, 2014)

Les biofilms peuvent être composés d'une seule espèce ou de plusieurs espèces (Phillips et al, 2011 ; Spyridon et al, 2009)

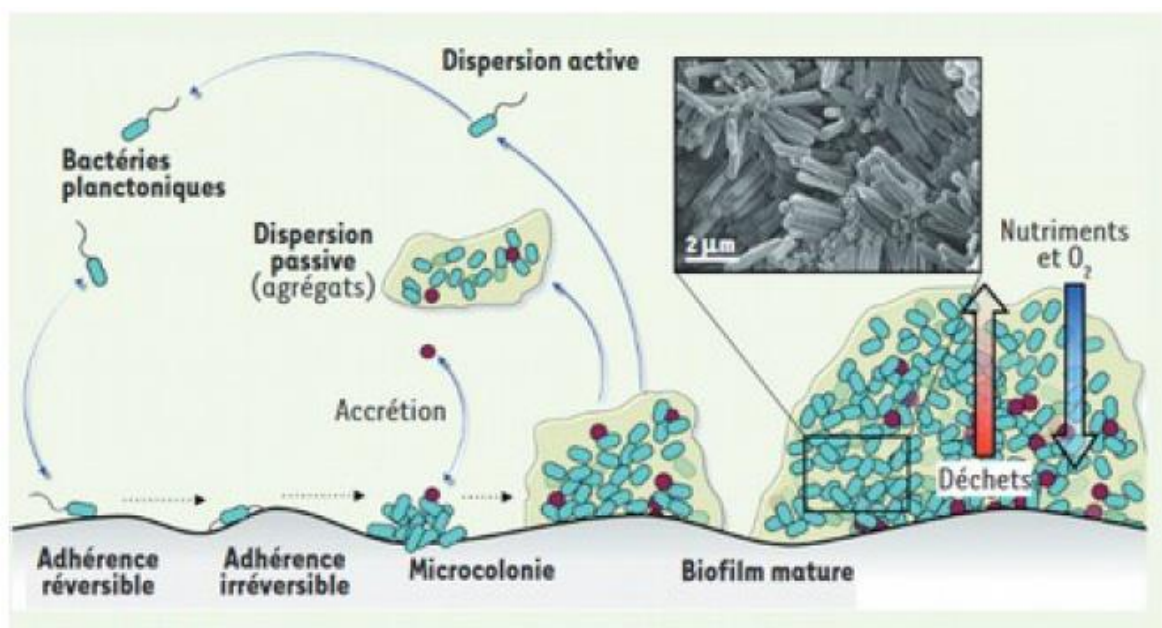


**Figure 10** : Biofilm bactérien (L'INSTITUT PASTEUR, 2012).

**III.2. Les étapes de formation d'un Biofilm: ils sont résumées dans la figure suivante :**

Les étapes distinctes de la formation d'un Biofilm impliquent l'adhésion initiale des micro-organismes à une surface, la formation d'une mono-couche avec formation de microcolonie, la maturation du biofilm associée à une structure tridimensionnelle et la dispersion cellulaire (Lebeaux et Ghigo, 2012).

La formation du biofilm met donc en œuvre différents processus physicochimiques (diffusion, adhésion, ...) ainsi que des processus biologiques (formation d'agrégats, croissance de microorganismes, production d'exopolymères, ...) (Fletcher, 1979 ; Celmer, 2008 ; Andersson, 2009).



**Figure 11:** Représentation schématique des différentes étapes de développement d'un Biofilm (David et Jean-Marc, 2012)

Le développement d'un biofilm se déroule en 4 phases :

### **III.2.1. Attachement réversible :**

L'attachement possible sur n'importe quelle surface, mais préférentiellement sur des surfaces hydrophobes, les bactéries les plus souvent retrouvées dans les biofilms sont celles qui présentent un degré d'hydrophobie élevée. Les modifications physiologiques à proximité de la surface potentiellement colonisable attirent les bactéries et les renseignent sur la possibilité de création d'un biofilm : modification de pH, de l'osmolarité, présence de charges électriques sur la surface ... le phénomène est alors encore réversible

### **III.2.2. Attachement irréversible :**

Cette étape débute au moment de la synthèse par les bactéries d'un réseau d'exopolymères composé surtout de polysaccharides, cette synthèse est sûrement initiée par l'attachement lui-même.

### **III.2.3. Maturation et formation de colonies :**

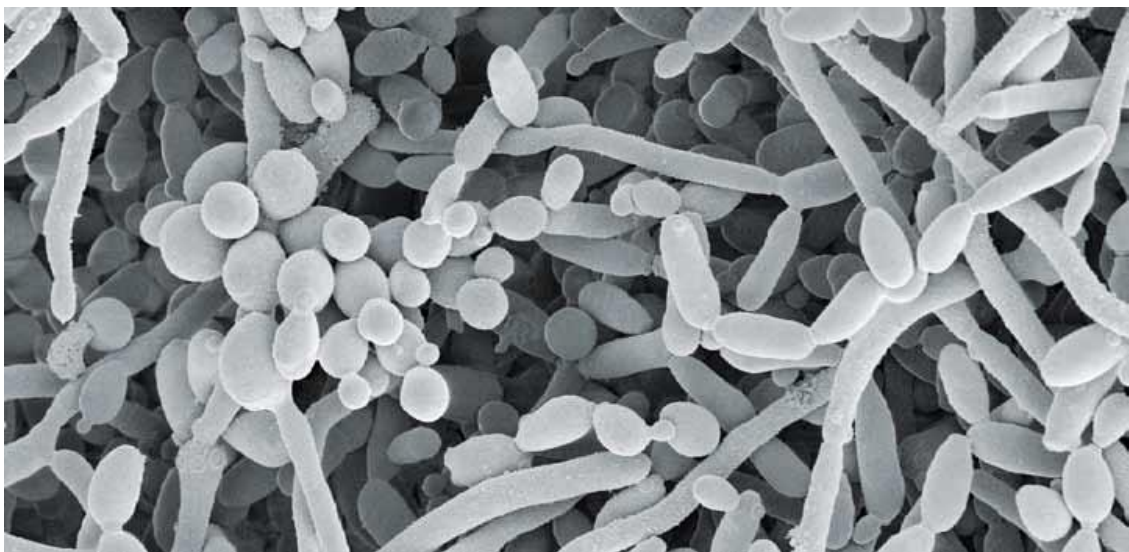
Les bactéries se multiplient, donnant ainsi naissance à des colonies, qui à leur tour synthétisent aussi des polysaccharides.

L'épaisseur du biofilm permet de différencier 2 stades de maturation : de 10µm à 100µm et supérieur à 100µm. Au niveau architectural, les colonies adhèrent à la surface en formant des piliers qui reposent sur une couche de cellules. Entre ces piliers naviguent les bactéries mobiles, le tout enveloppé dans la matrice. De plus, que ce soit un biofilm mono ou polybactérien, l'organisation y est très codifiée pour maximiser les chances de survie, on observe un gradient d'activité et de croissance, ainsi plus on se rapproche de la surface d'adhésion plus la concentration en oxygène et le pH diminuent.

### **III.2.4. Détachement des bactéries :**

Le détachement et la dispersion des cellules du biofilm permettent la dissémination et la colonisation d'autres lieux dans l'organisme. Celui-ci pourrait être déclenché par signal cellulaire en réponse à une surpopulation et le manque de nutriments.

La surface inerte exerce sur les bactéries une attraction, provoquée par exemple par d'infimes traces de fer (P. LEJEUNE 2004). Ce fer permet la solubilisation de  $Fe^{3+}$  au contact des milieux internes, or de nombreux micro-organismes sont munis de mécanismes de détection et de tactisme actifs même à des concentrations faibles. Le déplacement des bactéries vers la surface se fait alors soit par transport passif soit par chimiotactisme. Pour les liaisons, elles sont le résultat d'interactions chimiques faibles entre la surface et les différents constituants de l'enveloppe bactérienne (LPS, Slime,...)



**Figure 12:** Un biofilm hétérogène de plusieurs espèces (L'INSTITUT PASTEUR,2012).

### **III.3. Les Germes capable de former un biofilm :**

Parmi les microorganismes, on peut citer :

#### **III.3.1. Le genre *Pseudomonas***

*Pseudomonas* appartient à la famille des Pseudomonadaceae, ce sont des Gram-négatifs, aérobies ou anaérobies facultatifs, oxydase positive, mobiles à l'aide de flagelles polaires qui réduisent le nitrate en nitrite (Nauciel, 2000).

Cette bactérie est à l'origine d'infections opportunistes chez des patients le plus souvent immunodéprimés ou fragiles. Les infections

chroniques se caractérisent par la formation d'un biofilm bactérien puisque cette bactérie a une grande capacité à coloniser les surfaces et à former des biofilms (Denis et al, 2007).



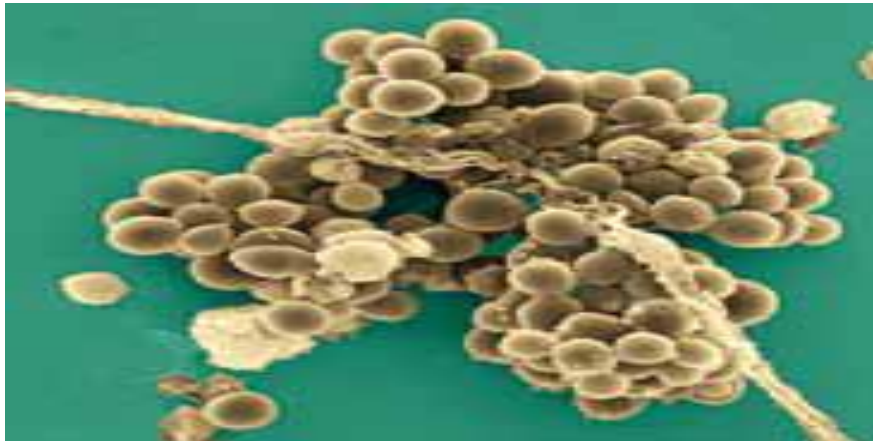
**Figure 13:** Observation de *P. aeruginosa* au microscope électronique (L'INSTITUT PASTEUR, 2012).

### **III.3.2. Les Staphylocoques :**

Les staphylocoques sont des cocci à gram positif qui se sont regroupés en grappe. Une espèce, *Staphylococcus aureus* ou *S. dore*, joue un rôle très important dans les infections communautaires et nosocomiales. Les bactéries se développent facilement dans les milieux normaux et les milieux riches en NaCl (Nauciel et Vildé, 2007)

Cette espèce exprime moins de facteurs de virulence tels que la sécrétion de toxines ou la résistance au système immunitaire, mais sa capacité à former des biofilms très mucoïdes lui permet de devenir un pathogène opportuniste (Fey et Olson, 2010).

De nombreuses souches de staphylocoques possèdent la capacité de produire du biofilm, ce qui leur permet d'adhérer plus facilement à du matériel médical. Ils sont responsables de la grande majorité des infections causées par des biofilms (Afissa, 2014).



**Figure 14:** Staphylocoques dorés (L'INSTITUT PASTEUR, 2012).

### **III.3.3. Streptocoque :**

Les espèces du genre *Streptococcus* sont les Cocci à Gram positif les plus associés à la pathologie humaine (Francois et al., 2007)

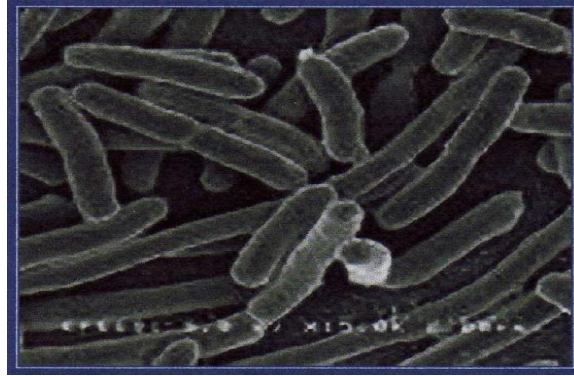
Ce sont des bactéries immobiles, non sporulées, aérobies, anaérobies, Leur habitat naturel : l'intestin humain. On les trouve également dans les matières fécales humaines (fèces) et les établissements médicaux (CDC) (Richard, 1982).

### **III.3.4. Escherichia coli :**

Ce sont des bacilles à Gram négatif (Khayar, 2011)

*Escherichia coli* est une bactérie commensale de l'intestin de l'homme et des animaux. C'est l'espèce aérobienne la plus importante de la flore digestive.

un certain nombre sont connus pour être impliqués à des degrés divers dans la formation de biofilms. (Van Houdt et Michiels, 2005).



**Figure 15:** E. coli (BUGNICOURT, 1995)

### **III.4. Le pouvoir pathogène :**

#### **III.4.1. *P. aeruginosa***

Il est principalement lié à ses nombreux facteurs de virulence qui sont impliqués dans les différentes étapes du processus infectieux. Ces facteurs permettent l'adhérence de la bactérie, sa multiplication, la formation de biofilms, son échappement au système immunitaire de l'hôte et sa persistance dans un environnement hostile (Nyalidome, 2016).

*P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste, pour l'organisme, puisqu'il va profiter de la diminution des défenses de l'organisme pour se développer. Il peut coloniser de nombreux tissus, notamment le tissu cutané, osseux et des dispositifs médicaux, tels les valves cardiaques. Il est aussi responsable d'infections ophtalmiques, du tractus urinaire et des poumons.

*P. aeruginosa* est l'agent pathogène prédominant associé à une morbidité et mortalité élevée chez les patients souffrant de mucoviscidose (You Essoh, 2013).

#### **III.4.1.1. Infections à *Pseudomonas aeruginosa* :**

Dans de nombreux hôpitaux, *P. aeruginosa* est devenu la bactérie à coloration de Gram négative commune associée à des infections nosocomiales graves, en particulier dans les unités de soins (Scott et al., 2005). *P. aeruginosa* est une bactérie adaptable et résiliente, largement

répandue dans l'environnement, capable d'infecter un large éventail d'organismes, notamment des vertébrés, des invertébrés eucaryotes et des plantes (John et al., 2015).

*P. aeruginosa* est omniprésent, possède des mécanismes intrinsèques de résistance aux antibiotiques et est associé à des infections graves d'origine hospitalière et des infections des plaies et de brûlure. Cette bactérie est devenue une menace nosocomiale majeure (Siew et al., 2019). *P. aeruginosa* est l'un des agents pathogènes humains les plus difficiles à traiter qui pose un grave problème clinique en raison de la prévalence étendue d'isolats cliniques multi résistants. Armé de mécanismes de virulence abondante et de résistance aux antibiotiques, il constitue un agent étiologique majeur dans de nombreuses infections aiguës et chroniques (Deepak et al., 2015).

*P. aeruginosa* ne provoque une maladie chez l'homme que lorsqu'il existe une défaillance locale ou systémique du système immunitaire. Le type de l'infection dépend aussi de l'efficacité du système immunitaire de l'hôte (Hichem, 2006). *P. aeruginosa* peut être responsable de nombreux processus néfastes liés à sa capacité à coloniser les surfaces sous forme de biofilm (Khalilzadeh, 2009).

#### 1- Infections aiguës :

*P. aeruginosa* est capable de provoquer des infections aiguës des poumons, du système digestif, des voies urinaires et de la cornée (Lyczak et al., 2002 ; Berthelot et al., 2005).

Des facteurs de virulence sont impliqués dans les différentes étapes du processus d'infection et permettent ainsi à *P. aeruginosa* de coloniser son hôte. Dans les infections aiguës, l'invasion, la dissémination et les lésions tissulaires vastes prédominent (Ben Haj et al., 2011). *P. aeruginosa* passe d'un agent pathogène virulent aigu d'infection précoce à un agent pathogène virulent chronique adapté à l'hôte de l'infection en phase terminale comme dans le cas de la Fibrose kystique (FK) du poumon (Hogardt et Heesemann, 2013).



## 2- Infections chroniques

*P. aeruginosa* est le principal agent pathogène causant une infection chronique chez les personnes atteintes de FK (Tim et al., 2003) à l'âge adulte, 80% des patients sont infectés et l'infection chronique à *P. aeruginosa* est la principale cause d'augmentation de la morbidité et de la mortalité des patients FK (Pressler et al., 2011). Infections chroniques à *P. aeruginosa* ont particulièrement fréquentes, et constituent la première des pneumonies communautaires dues à *P. aeruginosa*. Elles font suite à une colonisation précoce qui survient dès l'enfance et sont émaillées de poussées d'infections aiguës respiratoires. Une fois que les voies respiratoires du patient sont colonisées, *P. aeruginosa* met en jeu plusieurs mécanismes adaptatifs : formation du biofilm, échappement au système immunitaire de l'hôte puis production d'alginate. (Nyaledome, 2016)

### III.4.2. *Staphylococcus*

Chez l'Homme :

C'est l'agent pathogène le plus fréquemment rencontré dans les infections nosocomiales et suppuratives superficielles cutané-muqueuses telles que les folliculites, les furoncles, les impétigos,

les sinusites et les otites. Il est responsable de septicémies à l'origine de localisations viscérales pleuro-pulmonaires (abcès bulleux), cardiaques (endocardites aiguës), ostéo-articulaires (ostéomyélites) ou urinaires (phlegmon périnéphrétique), de toxémies qui regroupent le syndrome de la peau ébouillantée (maladie de Ritter du nouveau-né), le syndrome du choc toxique et les intoxications alimentaires (Vincenot et al., 2008).

Le pouvoir pathogène se définit comme l'aptitude de ce germe (*Staphylococcus*) à provoquer des troubles dans un organisme, soit par virulence, soit par toxinogénèse, soit par l'association de ces deux mécanismes (Grünfeld, 1994).

Les Staphylocoques sont responsables d'une pléthore de problèmes médicaux, comprenant les infections cutanées et des tissus mous, les

infections des sites opératoires, ainsi que les endocardites et les septicémies acquises à l'hôpital. Un nombre croissant d'infections sont liées à l'évolution des pratiques médicales (utilisation de prothèses et de cathéters, ainsi que d'immunosuppresseurs) (Klein et al., 2007 ; Biedenbach et Jones, 2009; Koksal et al., 2009; Otto, 2009; Morad-Asaad et al., 2016).

### **III.4.3. *Escherichia coli***

#### **III.4.3.1. Infection urinaire :**

L'infection des voies urinaires se fait en général par voie montante, elle est plus fréquente chez la femme en raison de la brièveté de l'urètre. Chez l'homme, l'infection est généralement secondaire et peut s'accomplir de prostatite. *E. coli* est souvent impliqué dans les infections urinaires nosocomiales. (Naucial et Vildé, 2005).

#### **III.4.3.2. Infection intestinale :**

Les souches de *E. coli* responsables des infections intestinales altèrent la muqueuse intestinale par différents mécanismes. Ils sont classés de la manière suivante :

- **les *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC):**

Les *Escherichia coli* entéro-hémorragiques (EHEC) encore appelés *E. coli* producteurs de Véro toxines (VTEC), sont des agents pathogènes associés à des manifestations digestives allant de la diarrhée aqueuse bénigne à la colite hémorragique (Kurkdjian et Bonacorsi, 2014).

- Les *E. coli* Enteropathogènes (EPEC) :

Ils sont responsables de diarrhées infantiles et touchent en particulier les enfants en bas âge (<3 ans). Des lésions histopathologiques apparaissent lors d'infections. Ces lésions sont appelées lésions d'attachement et d'effacement (Andrade et al., 1989)

- Les *E. coli* Entérotoxigènes (ETEC) :

Ils sont majoritairement associés à deux syndromes cliniques importants, les diarrhées du

nourrisson dans les pays en voie de développement et la diarrhée du voyageur. Ils sont

présents essentiellement dans la partie proximale de l'intestin grêle (Levine, 1987).

- Les E. coli entéro-invasives (EIEC) :

Ce sont des souches très proches de Shigella dysenterie, elles ont la capacité d'envahir les cellules du colon grâce à des gènes plasmidiques, elles provoquent le plus souvent une diarrhée liquide (Naucial et Vildé, 2005).

**III.4.3.3. Septicémies et méningites :**

E. coli est un pathogène majeur pour le nourrisson de moins de 3 mois puisqu'il représente la première cause d'infection urinaire compliquée d'une bactériémie et la deuxième cause de méningite chez le nouveau-né.

Au cours des méningites néonatales, les bactériémies font suite, dans 80% des cas, au passage des bactéries par translocation à partir de la colonisation digestive et dans 20 % des cas à une infection urinaire haute. La capacité de multiplication intravasculaire élevée entraîne un haut niveau de bactériémie (> 10<sup>3</sup> UFC/ml).

La bactérie traverse la barrière hémato-méningée à partir de sang par transcytose est suivie de l'invasion et de l'internalisation. De nombreux facteurs de virulence sont impliqués au cours des différentes étapes de la pathogenèse des méningites (Ag O18, capsule K1, pili de type 1) (Bertholom, 2009).

**III.4.4. Klebsiella**

Les Klebsiella sont fréquemment responsables d'infections opportunistes chez des

malades hospitalisés dont :

- Infections urinaires souvent consécutives à des manœuvres instrumentales.

- Infections broncho-pulmonaires en réanimation.

Infections généralisées (septicémies ou bactériémies lors d'un cathétérisme) responsables fréquemment d'un choc endotoxinique, la taux de mortalité est élevé.

- Infection méningées (post traumatique ou post chirurgical) (Richard, 1982)

#### **III.4.4.1. *K. pneumoniae***

C'est une Entérobactérie toujours immobile, généralement entourée d'une capsule polysaccharidique (Euzéby, 2004).

C'est une bactérie ubiquiste, hôte normal quoiqu'en petit nombre de la flore respiratoire et surtout digestive de l'homme, retrouvés dans la flore fécale d'environ 30 % des animaux et de l'homme et ils existent à l'état commensal sur la peau et les muqueuses (Euzéby, 2004).

Elle est fréquemment isolée dans les infections urinaires mais aussi dans les infections de plaie et les bactériémies principalement lorsque ces infections sont nosocomiales. Elles sont responsables d'environ 5 à 10 % des infections nosocomiales. Certaines *K. pneumoniae* peuvent être en cause dans des pneumopathies aiguës (Verhaegen, 2004).

Des travaux réalisés en Inde rapportent également l'isolement de souches de *Klebsiella pneumoniae* de cas de diarrhées chez le jeune enfant (Euzéby, 2004).

*Klebsiella pneumoniae* est un pathogène à fort potentiel épidémique fréquemment impliqué dans des infections sévères (Carreër et Nordmann, 2011).

### III.5. Les Biofilm dans le secteur médical :

Les biofilms sont responsables d'un large éventail d'infections chez l'Homme. Plus de 80% des infections bactériennes chroniques sont associées à leur présence (Hall-Stoodley et al., 2004).

Ces derniers peuvent se former à la surface ou à l'intérieur des dispositifs médicaux implantés dans l'organisme (lentilles de contact, cathéter veineux central, sonde endotrachéale, dispositifs intra-utérins, valves cardiaques artificielles, pacemakers, cathéters de dialyse péritonéale, sondes de tympanostomie, sondes urinaires, prothèses vocales...) ,82% des infections nosocomiales sont dues à la présence d'implants médicaux contaminés (Archibald et Gaynes, 1997).

Les microorganismes en cause proviennent de la flore cutanée du patient, de la microflore exogène du personnel hospitalier, ou encore d'environnements contaminés. Les micro-organismes atteignent le cathéter par migration à partir de la peau le long de la partie externe du cathéter. Les micro-organismes les plus fréquemment isolés sont :K. pneumoniae, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis et Candida albicans (Donlan, 2008).

Les biofilms ont des répercussions sur presque toutes les spécialités médicales et chirurgicales : cependant, la communauté médicale n'est plus consciente de l'importance de ces communautés microbiennes organisées depuis une dizaine d'années (Costerton et al., 1995 et 1999 ; Costerton et Stewart 2001).Ce manque de reconnaissance antérieur peut être attribué à plusieurs facteurs, dont les paradigmes antérieurs à travers lesquels la microbiologie clinique est connue depuis des générations. (Ghannoum et O'Toole, 2004).

### **III.6. Les facteurs favorisant la formation de biofilms :**

#### **III.6.1. Caractéristiques de la surface :**

##### **III.6.1.1. Rugosité de la surface :**

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des micro-colonies est importante (Characklis, 1990). Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'aspérités (Donlon, 2002).

##### **III.6.1.2. Les propriétés physico-chimiques de la surface :**

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le téflon ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux (Bendinger, 2003).

##### **III.6.1.3. Présence de films protéiques sur la surface :**

La présence de polymères sur un matériau modifie les propriétés physico-chimiques de sa surface, et a une influence directe sur l'attachement de bactéries à cette dernière. En effet, la présence préalable sur un biomatériau d'un film protéique comme le sang, les larmes, l'urine, la salive, le liquide intersitiel et les sécrétions respiratoires influence l'attachement de bactéries à sa surface, et favorise la formation de biofilms (Mittelman, 1996)

#### **III.6.2. Caractéristiques du milieu :**

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessitent des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux clefs (Fletcher, 1988 ; O'Toole et al., 2000 ; Martinez, 2007 ; Goller, 2008) tels que : la disponibilité de nutriments (excès ou carence) et les différents stress physicochimiques (pH, température, présence de composés bactéricides, etc.) (Marchal, 2010).

### **III.6.3. Propriétés des cellules :**

L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de fimbriae et de flagelles, et la production d'exopolysaccharides influencent l'attachement des bactéries sur une surface (Donlan, 2002).

### **III.7. Résistance des biofilms aux antibiotiques :**

Beaucoup de problèmes associés au développement des biofilms en milieu hospitalier, ont pour origine leur résistance extrêmement élevée aux antibiotiques et aux désinfectants. Cette résistance accrue, multifactorielle, est liée aux conditions de vie dans le biofilm (hétérogénéité, accès aux nutriments, oxygène etc.) ; elles modifient les propriétés physiologiques des micro-organismes et induisent des mécanismes de résistance spécifiques qui s'ajoutent aux mécanismes de résistance connus. La résistance élevée des biofilms aux agents anti-bactériens pourrait également reposer sur la présence d'une sous-population de bactéries résistantes, capables de résister à des fortes concentrations d'antibiotiques (Lewis, 2005). Ainsi, alors que les progrès de la médecine moderne permettent de lutter efficacement contre de nombreuses maladies infectieuses, celles qui sont liées à la présence de biofilms, échappent largement à ce type de traitements. Les antibiotiques sont en effet très peu efficaces contre les biofilms et les symptômes peuvent réapparaître une fois le traitement fini. Protection vis-à-vis du système immunitaire En plus de leur résistance accrue aux antibiotiques, les biofilms sont protégés vis-à-vis du système immunitaire des hôtes infectés. La taille des biofilms est tout d'abord un frein important au processus de phagocytose. Les cellules phagocytaires libèrent des enzymes qui ont très peu d'effet sur le biofilm et qui peuvent endommager les tissus (Khoury et al., 1992). La matrice extracellulaire est également une barrière au système immunitaire de l'hôte car elle empêche la reconnaissance des antigènes bactériens par les anticorps (Costerton; Stewart et Greenberg, 1999).

# **PARTIE IV. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

---



#### **IV.1. Cadre d'étude :**

Le but de notre travail est l'isolement et l'identification des bactéries responsables d'une infection nosocomiale qui ont la capacité de former un biofilm, l'étude de leur résistance aux antibiotiques. Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de la microbiologie d'université Dr. Moulay Tahar de Saida.

#### **IV.2. Prélèvement :**

Les prélèvements ont été réalisés au niveau des établissements hospitaliers suivants:

- EPH SAIDA les services suivants : Réanimation médicale, médecine homme, médecine femme.
- EPH Hassasna le service de pédiatrie
- EPH Rahmani de Mécheria les services : Pédiatrie, maternité
- EPH Chenafa de Mécheria les services : Médecine homme, médecine femme, chirurgie femme, réanimation médicale

##### **IV.2.1. Prélèvement à partir des surfaces sèches :**

A l'aide d'un écouvillon stérile préalablement humidifié avec de l'eau distillé ou de l'eau physiologique stérile, frotter les surfaces sèches comme : lit, drap, chariot, paillasse, chaise roulante, poignée de la porte, masque d'oxygene, puis introduire dans des tubes contenant du bouillon nutritif. Ces derniers ont été transportés dans une glacière jusqu'à l'arrivée au laboratoire pour analyse.

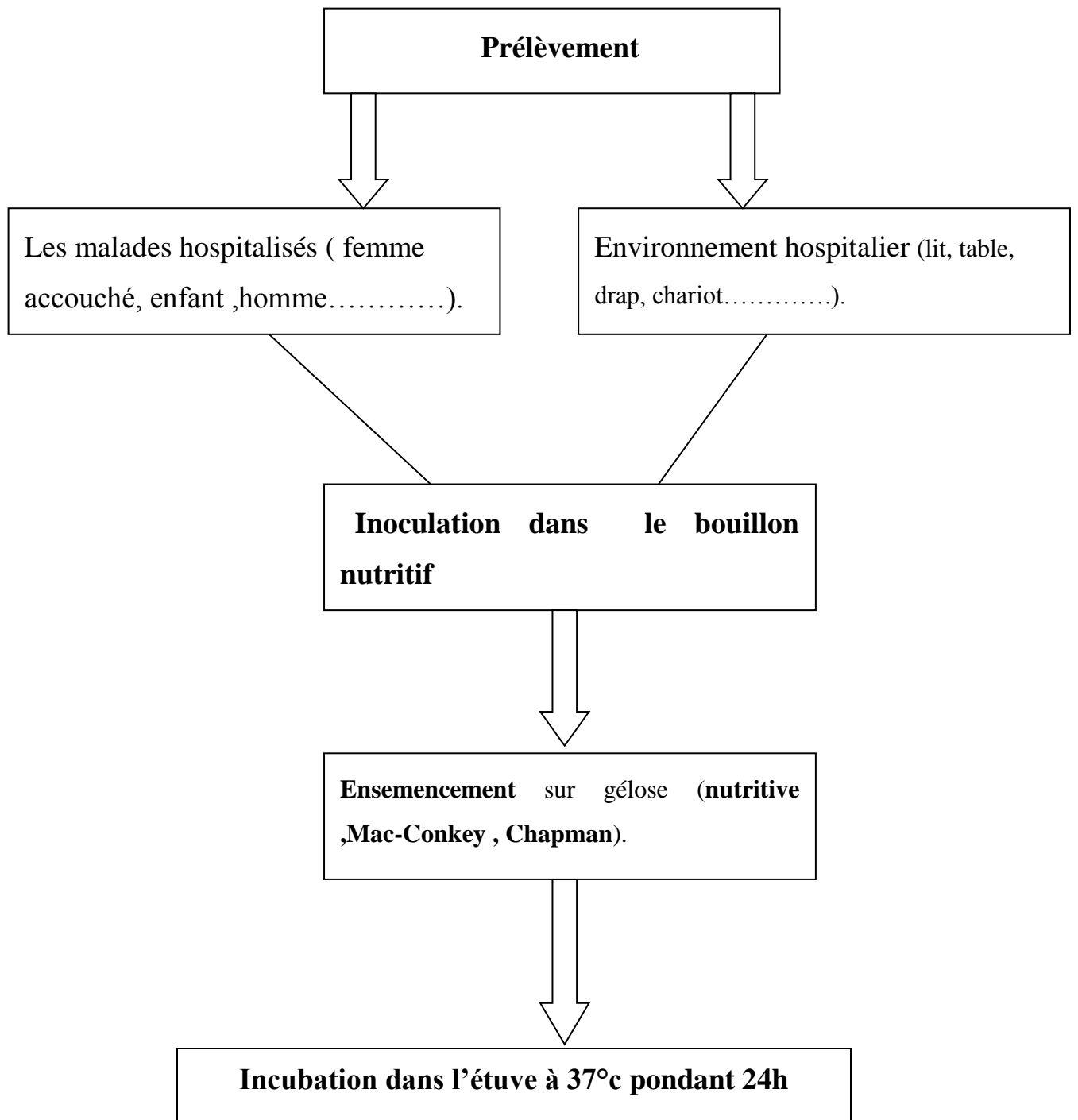
##### **IV.2.2. Prélèvement à partir des surfaces humides :**

Frotter directement les écouvillons stériles secs sur les surfaces, puis les introduire dans des tubes contenant du bouillon nutritif.

#### **Remarque :**

Les prélèvements ont été étiquetés (date, heure, site de prélèvement et service).

Nous avons suivi les étapes motionnées dans le schéma suivant :



**Figure 16:** Schéma des étapes de prélèvements et l'isolement des souches bactériennes.

**Tableau 3:** Les sites et les services hospitaliers des prélèvements effectués.

Hôpital	Service	Patients				Environnement	Total
		Plaie infecté	Cathéter	Escarre	Sonde		
EPH saida	La réanimation		01	01	01		03
	Médecine femme		01			01	02
	Chirurgie homme					01	01
EPH hessassna	Pédiatrie		02			04	06
Mecheria	Chirurgie Femme	01					01
	Pédiatrie	01	02	01			04
	Médecin homme			01			01
	Maternité	01	02		01	01	05
	réanimation					01	01
Total		03	08	03	02	08	24

**Figure 17:** Les prélèvement dans le BN après l'incubation.

### IV.3. Méthodes :

#### IV.3.1. L'enrichissement :

L'enrichissement des microorganismes a été réalisé en mettant chaque écouvillon dans un tube contenant le bouilliant nutritif et ont été incubé 24h à 37°C.

### **IV.3.2. L'isolement**

L'isolement permet de séparer une ou plusieurs isolats contenus dans un mélange. On aensemencé la suspension à la surface d'un milieu solide (GN, Mac Conkey, Chapman) par une anse en platine stérile en formant des stries serrées. Nous avons pris une suspension bactérienne à partir d'un bouillon nutritif enrichi après 24 h. Déposer la boîte dans l'étuve pour une incubation de 24 h à 37 °C, chaque micro-organisme déposé se multiplie pour donner un clone de cellules identiques. Lorsque les micro-organismes sont suffisamment éloignés, le clone se développe abondamment pour produire une colonie

### **IV.3.3. Purification :**

Après 24 h de culture, quatre colonies de chaque échantillon dans des milieux de culture sélectifs et différentiels ont été réensemencés avec une anse de platine afin d'obtenir des bactéries complètement pures pour chaque milieu et ont été incubés à l'étuve pendant 24 h à 37 °C.

### **IV.3.4. Identification :**

L'identification comporte une série d'étape.

#### **IV.3.4.1. Caractère macroscopique :**

L'étude des caractères visibles à l'œil nu : formes, taille, couleur et aspect.

#### **IV.3.4.2. Caractère microscopique :**

C'est l'étude de la mobilité et de la coloration de Gram.

### **IV.3.5. Conservation des souches**

Les souches ont été conservées dans des tubes de gélose nutritive inclinés à une température de 4°C (ces bactéries sont placées dans un état de vie ralentie ou momentanément suspendue donc dans des conditions peu favorables pour leur multiplication).

#### IV.3.6. Test d'antibiogramme:

À partir d'une culture pure de 24 heures sur milieu GN, quelques colonies bien isolées ont été prélevées puis inoculées dans 5ml de BN. La suspension bactérienne a été homogénéisée au vortex puis ajustée à une D.O de 0.4 lue à 625nm au spectrophotomètre. Un écouvillon stérile a été plongé dans la suspension bactérienne. Le sortir du tube en l'essorant doucement sur les parois internes du tube afin de le décharger au maximum. À l'aide de cet écouvillon, on à ensemencer toute la surface gélosée de Gélose nutritive par des stries serrées, en tournant la boîte trois fois de 60°. L'ensemencement fini en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. À l'aide d'une pince préalablement flambée, les disques d'antibiotiques ont été appliqués sur la surface de la gélose. Les boîtes sont ensuite ont été incubées pendant 24 heures à 37°C.

Les différents diamètres des zones d'inhibition, obtenus autour des disques d'antibiotiques, ont été mesurés. L'interprétation en sensible (S) intermédiaire (I) ou résistante (R) est effectuée selon les critères définis par les recommandations de CLSI.

**Tableau 4:** Liste des antibiotiques utilisé

Antibiotique	La Charge De Disque
Levofloxacin	5 µg
Erythromycine	15 µg
Amoxicilin+Ac clavulanique	20+10 µg
Amoxicilin	25 µg
Cefoperazone	30 µg
Cefipime	30 µg
Cefotaxime	5 µg
Cefoxitine	30 µg
Chloramphicol	30 µg
fosfomicyne	50 µg
ceftazidime	10 µg
Oxacilline	5 µg

#### **IV.4. Les Tests d'identification biochimique : (DELLARAS, 1998 et GUIRAUD, 2003).**

##### **IV.4.1. Métabolisme des glucides :**

###### **IV.4.1.1. Milieu de culture : Gélose TSI**

###### **a) Caractères recherchés :**

- Utilisation des sucres.
- Production de gaz et d'H<sub>2</sub>S.

###### **b) Principe de milieu TSI :**

Cette étude a été réalisée sur un milieu combiné spécifique des entérobactéries T.S.I (Three Sugar Iron). Il s'agit d'un milieu complexe gélosé réparti en tubes à essai sous forme semi-incliné avec pente et culot de 2 cm de haut environ. Il contient du glucose, du lactose, du saccharose, de la peptone, un sel de fer et un indicateur de pH (le rouge de phénol). Il permet de fournir quatre renseignements principaux : dans le culot, l'anaérobiose relative favorise l'utilisation de glucose ; l'acidification de la tranche indique bien l'utilisation du lactose ; l'apparition de bulles dans le culot traduit la production de gaz et un noircissement dû à la formation de sulfure de fer traduit celle de H<sub>2</sub>S.

###### **a) Méthode :**

Le tube de TSI a été ensemencé à l'aide d'anse en platine par stries serrées et parallèles sur la surface inclinée suivies d'une piqure centrale et profonde. Après incubation de 24h à 37°C, la fermentation de chaque sucre se traduit par virage de couleur en jaune, et la production de gaz par la présence des bulles d'air, ainsi la production de sulfure d'hydrogène par des taches noires (PAUL, 2002)

###### **b) Lecture :**

- Virage au jaune (sucres+);
- Fissure (gaz+);
- Noircissement (H<sub>2</sub>S+).

- Lorsque l'un des glucides est fermenté, la baisse du pH fera passer le milieu de l'orange rougeâtre (la couleur originale) au jaune.
- Une couleur rouge foncé indique une alcalinisation des peptones.
- Le thiosulfate de sodium dans le milieu est réduit par certaines bactéries en sulfure d'hydrogène ( $H_2S$ ), ce dernier réagit avec les ions ferriques dans le milieu pour produire du sulfure de fer, un précipité insoluble noir.

Donc la gélose **TSI** fournit quatre renseignements principaux :

**Fermentation de glucose :**

- Culot rouge : glucose non fermenté
- Culot jaune : glucose fermenté

**Fermentation du lactose et/ou du saccharose :**

- Pente inclinée rouge : lactose et saccharose non fermentés ;
- Pente inclinée jaune : lactose et/ou saccharose fermentés.

**Production de gaz :** apparition de gaz dans le culot.

**Formation d' $H_2S$  :** formation d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la pente.

**IV.4.2. Détermination du type fermentaire :**

**Milieus de culture :** Clark et Lubs (**Teste de Voges Proskauer (VP) et Rouge de Méthyl (RM)**):

- **Test RM (Rouge méthyle) :** (Boudraa et al., 2011)

**Caractère rechercher :** Mise en évidence de la voie de fermentation des acides mixtes.

**Méthode :**

- Ensemencer largement le milieu Clark et Lubs.
- Incuber à  $37^{\circ}C$  pendant 24h. Après culture :
- Ajouter 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle. La lecture est immédiate.

**Lecture :**

- Milieu jaune. (RM-)

- Virage au rouge (RM+)

« fermentations acides mixtes ».

Ce test permet la mise en évidence, grâce au rouge de méthyle, de la fermentation acide mixte par acidification d'un milieu glucosé après fermentation du glucose. Il est réalisé en utilisant le milieu Clark et Lubs (bouillon réparti dans des tubes standards) ensemencé par le germe à tester et incubé à 35-37°C pendant 48h. Une à deux gouttes de la solution de rouge de méthyle, sont ensuite ajoutées à 2 ml du milieu d'incubation.

La réaction positive se traduit par une teinte rouge, alors que la réaction négative se manifeste par une teinte jaune.

- **Test VP (au Vosges-Proskauer) : (Boudraa et al., 2011) ; (Meziani., 2012),**

**Caractère rechercher :**

La production de l'acétoïne ( acétyle méthyle carbinol) : est un produit intermédiaire de la fermentation butanediolique synthétisé par décarboxylation de l'acéto acétate puis réduit grâce au NADH en 2,3-butane diol.

**Méthode :**

Ce test permet la mise en évidence de la **production d'acétoïne** (ou 3-hydroxy-butanone) au cours de la fermentation butylène glycolique. Le milieu Clark et Lubs est ensemencé et incubé à 35-37°C pendant 48h. En présence d'**a-naphtol (0.5 ml de VP1)** et d'une **base forte** (soude ou potasse) (1 ml de VP2), l'acétoïne donne une **coloration rouge en milieu très oxygéné**.

**Lecture :**

-Milieu rouge : VP(+)

-Milieu jaune : VP(-)

Les tests RM et VP permettent l'étude des produits de fermentation du glucose : différenciation entre les fermentations « acides mixtes » et « butylène glycolique » (GUIRAUD, 2003).



**Téchnique :** nous avons suivies le protocole suivant :

**1. RM :**

Ajouté 5 gouttes de Rouge de méthyle

(RM) sur 2.5ml de culture bactérienne a testé.

Incubation des pré-culture étudiées à 37°C /48 h.

**Lecture :** Virage au rouge (RM+) « fermentations acides mixtes ».

**2. VP :**

ajouter 12 gouttes de Réactifs VP1 et 4 gouttes de réactif VP2 sur 2.5ml de culture bactérienne a testé en attend 10 à 15 min avant la lecture .

**Lecture :**

Virage au rose (VP+) « fermentations butanediolique».

**IV.4.3. Milieux de culture Urée-indole :**

**Propriétés :**

**Métabolisme des peptides.**

**Principe :** L'uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée en ions ammonium et carbonate Le CO<sub>2</sub> et le NH<sub>3</sub> se combinent ensuite pour donner du carbonate d'ammonium. L'indole est le produit de l'hydrolyse du tryptophane par une enzyme, la tryptophanase. Il est mis en évidence grâce à la coloration rouge caractéristique qu'il donne avec le réactif de Kovacs.

**Méthode :**

Le milieu Urée-indole permet d'étudier simultanément les deux caractères, d'une part, la production d'indole à partir de tryptophane et d'autre part, la production de l'uréase. Ce milieu liquide est réparti en tubes à hémolyse et estensemencé à partir d'une culture sur milieu solide. Après incubation à 37°C pendant 24 heures l'alcalinisation du milieu qui vire au rouge traduit la présence d'un enzyme uréase . Le milieu incubé sert ensuite à la

caractérisation de l'indole par le réactif de Kovacs qui se traduit par l'apparition d'un anneau rouge (GUIRAUD, 2003).

**A) Production d'indole : (DELLARAS, 1998 et GUIRAUD, 2003)**

A partir d'une culture sur milieu solide + réactif de Kovacs.

**Techniques d'ensemencement :** A partir d'une culture sur milieu solide + réactif de Kovacs

- 1- **Conditions d'incubation :** 37°C /24h.
- 2- **Lecture :** Quelques secondes Apparition d'un anneau rouge (indole+).

**b) Dégradation de l'urée : (DELLARAS, 1998 et GUIRAUD, 2003)**

- 1- **Techniques d'ensemencement :** A partir d'une culture sur milieu solide.
- 2- **Conditions d'incubation :** 37°C /24h.
- 3- **Lecture :** Virage au rouge (uréase +).

**c) Recherche de la Tryptophane Désaminase (TDA) :**

**1- Techniques d'ensemencement :**

Après 24h d'incubation verser dans le tube du milieu Urea Indole 1 à 2 gouttes de Ferric chloride solution .

**2- Lecture :**

- coloration brun rouge :TDA(+)
- coloration jaune orangée : TDA (-)

**IV.5. Teste de la formation d'un biofilm :**

A partir d'une pré-culture des souches portées les numéros suivants (02, 08, 15, 17, 19, 38) de 24 heures dans le milieu BN,

On a utilisé une suspension bactérienne d'une charge 0.4 à une longueur d'onde 600 nm.

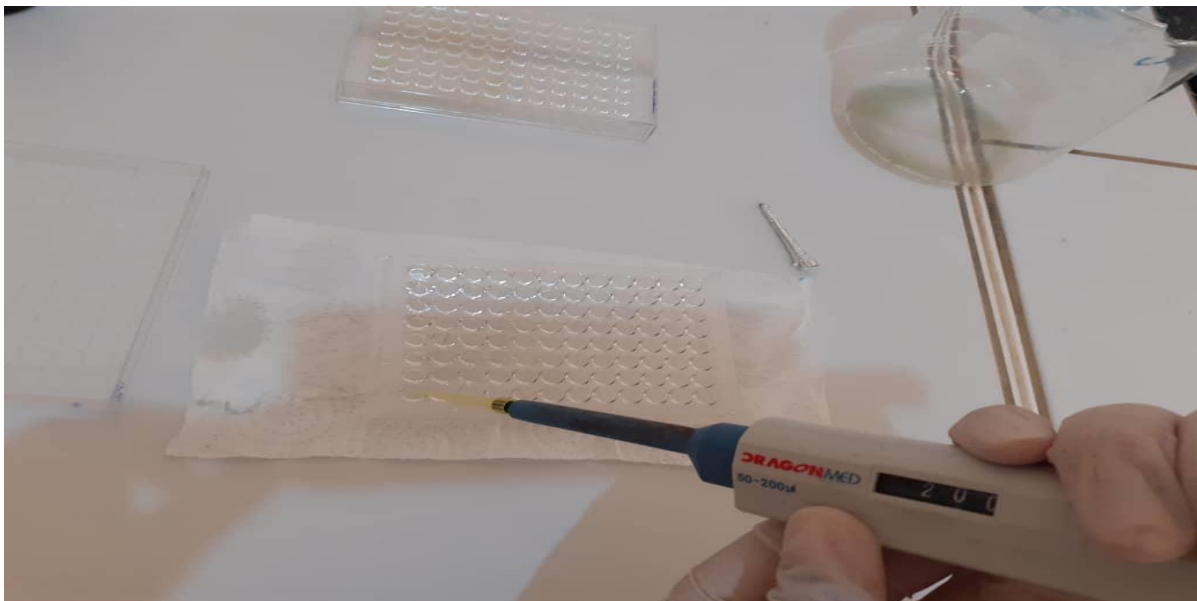
Le 1<sup>er</sup> ligne de la microplaque est remplie avec 250µL d'eau distillée

Le 2<sup>ème</sup> ligne est remplie avec 250µL de BN.

Les puits restants ont été inoculés avec 50  $\mu\text{L}$  de suspension de bactéries à laquelle ont été ajoutés 200  $\mu\text{L}$  de BN. La microplaque est ensuite incubée à 37°C pendant 24h, 48h, 72h

Après incubation, les puits de la microplaque ont été vidés de leurs contenus. Trois lavages consécutifs sont réalisés avec 200 $\mu\text{L}$  de tampon PBS afin d'éliminer les bactéries libres planctoniques.

Les puits sont remplis avec 250  $\mu\text{L}$  du cristal violet et laissé pendant 15 minutes. La solution de cristal violet est éliminée et les puits sont lavés trois fois avec l'eau distillée afin d'éliminer toute trace de colorant non fixé. Les microplaques renversées sont couvertes de papier absorbant et laissées sécher à température ambiante pendant 15 minutes. Enfin, les puits sont remplis de nouveau avec 200 $\mu\text{L}$  d'acide acétate glaciale pour libérer le colorant fixe au sein des cellules emprisonnées dans le biofilm ainsi formé. Les densités optiques (DO) de tous les puits sont déterminées par l'intermédiaire d'un lecteur des microplaques à une longueur d'onde 630 nm ( Mathur et al., 2006).



**Figure 18:** La préparation de la microplaque pour tester la formation de biofilm.



**Figure 19:** Lecture des résultats de la formation d'un biofilm par le lecteur des microplaques

#### IV.6. Préparation des solutions mères d'antibiotiques : (ziane, 2008)

Nous avons mesuré la CMI de 2 antibiotiques vis-à-vis des souches bactériennes, amoxicilin, cefotaxime

Nous avons préparé une solution initiale(A) d'antibiotique à 5120  $\mu\text{g/ml}$  et à partir de cette solution deux autres solutions ont été préparées

Une solution (B) à 320  $\mu\text{g/ml}$

Une solution (C) à 20  $\mu\text{g/ml}$

**Tableau 5 :** Procédé de préparation des dilutions d'antibiotiques

Concentration de la solution initiale en antibiotique ( $\mu\text{g/ml}$ )	Les dilutions	Titre obtenu $\mu\text{g/ml}$
Solution (A) 5120	1/2	2560
	1/4	1280
	1/8	640
Solution (B) 320	1/2	160
	1/4	80
	1/8	40
Solution (C) 20	1/2	10
	1/4	5
	1/8	2.5

#### **IV.6.1. Test d'antibiofilmogramme :**

On a préparés des pré-cultures de 03 souches isolées (15--19-02) dans des tubes a essais rempli de 5 ml de BN puis ont été incubées à 37°C pendant 24h le lendemain on fait la lecture à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde égale à 600 nm , on a utilisé la densité 0,4 .

On a utilisé deux antibiotiques pour chacune microplaques qui a été rempli comme suit :

- 1<sup>Er</sup> ligne : 200µl'eau distillée
- 2<sup>ème</sup> ligne: 200µL de BN. Les lignes restantes (3/6) ont été remplis avec 20µl d'antibiotiques (12 concentrations) dans chaque puis.

On a déposé les microplaques dans le réfrigérateur pendant 1h.

Enfin, on a ajouté 200 µl de chaque souche dans tous les 6 puits et incubé pendant 24h. Lecture des résultats obtenus par le lecteur des microplaques.

#### **IV.7. Mesure de la CMI (concentration minimales inhibitrice):**

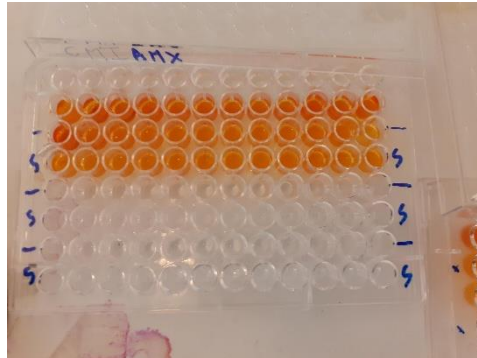
##### **IV.7.1. Dilution en milieu liquide (macrométhode ) (Mims et al.,1993)**

Dans une série de tubes stérile, 1ml de milieu de culture BN I est ajouté contenant chacun de l'antibiotique à ses concentrations finales croissantes de 0.125 ml/l .puis les tubes sont ensemencé par des pre-cultures préparées au préalable et placés pour une incubation à 37° pendant 24h.La CMI sera la concernant en antibiotique la plus faible pour laquelle il n'y a pas de croissance visible indiqué par l'absence du virage de couleur. En toute rigueur, elle est compromise entre le tube correspondant à cette définition et le premier tube dans lequel une croissance observée.

##### **IV.7.2. Dilution en milieu liquide (microméthode)**

Des microplaques à fond en U (plaque micro titration) sont utilisables pour la détermination des CMI. Une plaque de 96 puits permet la détermination de la CMI de 3 souches bactériennes vis-à-vis d'un antibiotique.

Dans les cupules d'une même ligne ,les dilutions de l'ATB sont introduites à l'aide de micropipette En présence de milieu BN rouge phénol inoculé par une pre culture bactérienne après une incubation de 24h à 37°C,une éventuelle croissance dans chaque cupule est révélée par un trouble au fond de la cupule et un virage du couleur .La CMI Correspondant à la concentration de la cupule ne présentant pas de croissance.



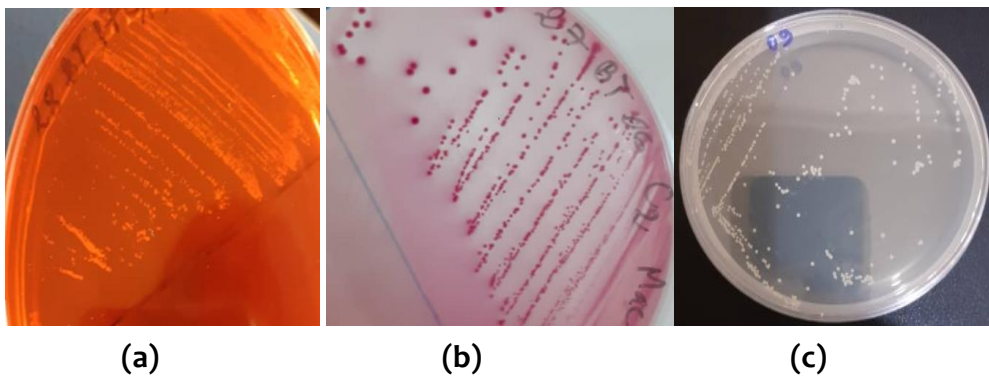
**Figure 20 :** Microplaque préparé pour le test d'antibiofilmogramme

# **PARTIE V : RESULTATS ET DISCUSSION**

---

### V.8. Aspect macroscopique et microscopique des souches après l'isolement :

Après isolement et purification des souches bactériennes sur les trois géloses (nutritive, Mak Conkey et Chapman), nous avons fait la coloration de gramme et on les observées sous microscope optique. LA figure 22 montre quelque résultats de l'aspect macroscopique des isolats après purification sur Chapman, Mac conkey et gélose nutritif.


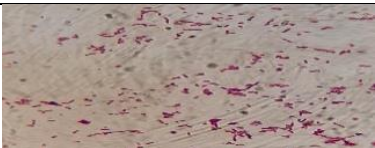

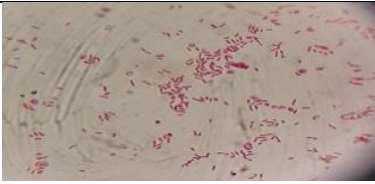




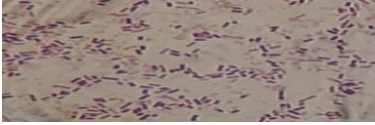

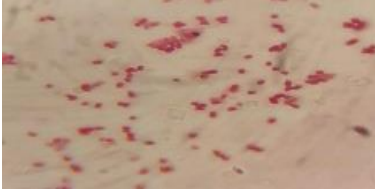

















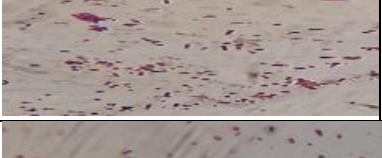
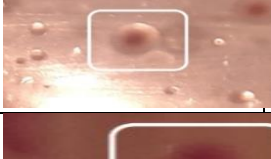
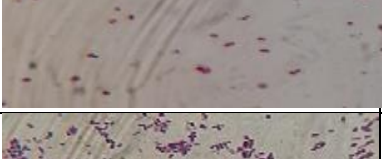

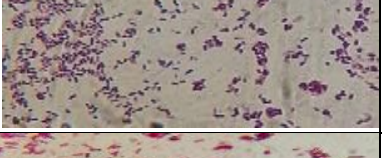
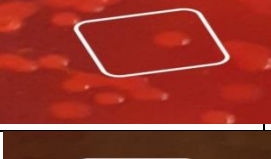
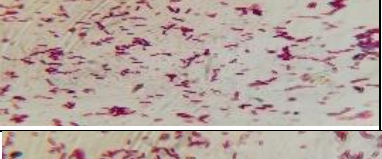
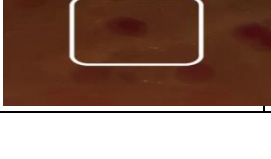
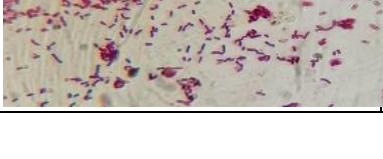
**Figure 21 :** Exemple Souches purifiées sur milieux soildes ; (a) Souche 28 sur G. Chapman , (b) souche 27 sur G.MC , (c) souche 09 sur GN .

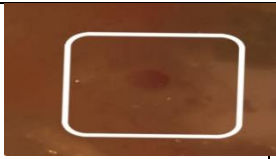
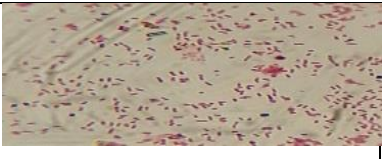

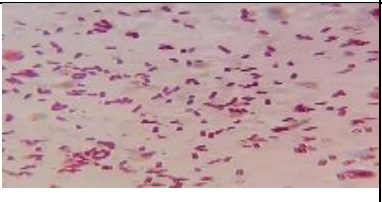

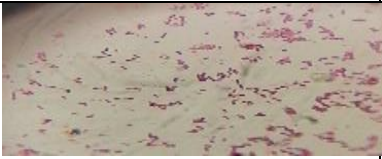
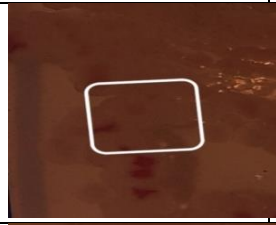
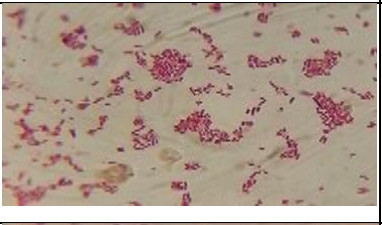

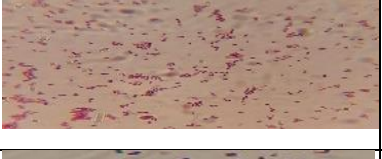



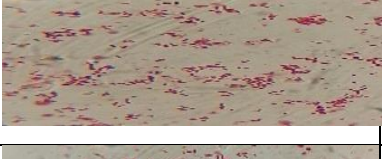





Les principaux caractères cultureux sont résumés dans le tableau 6 :


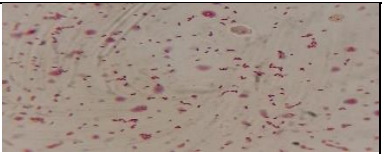
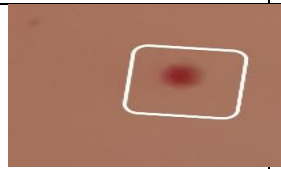
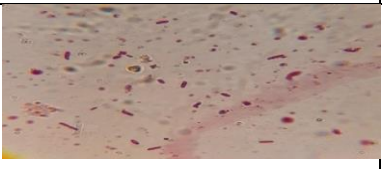

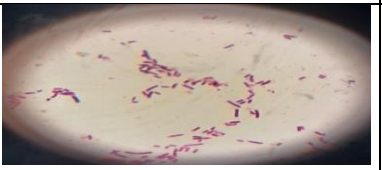
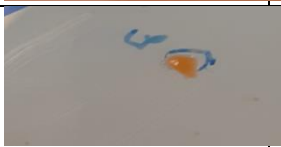
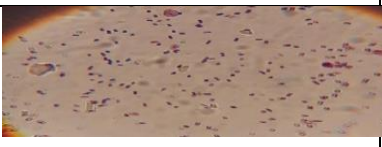

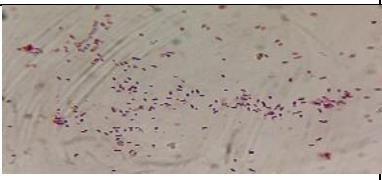
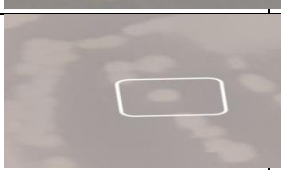
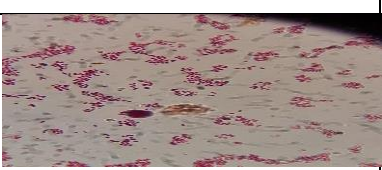


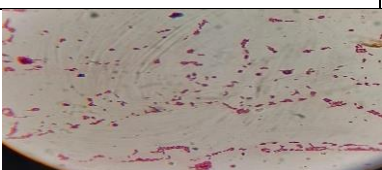

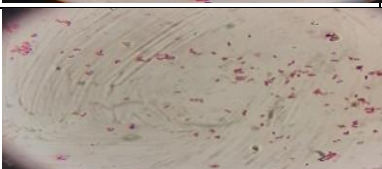



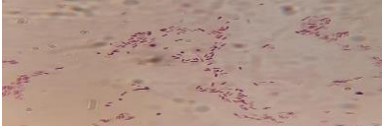





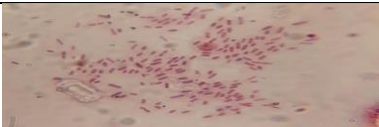

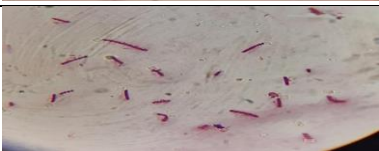

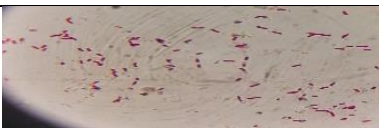

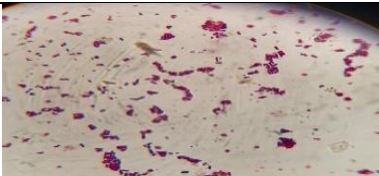


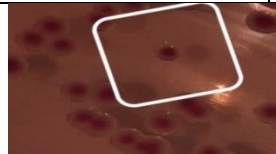
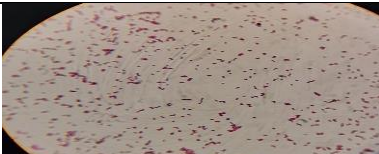


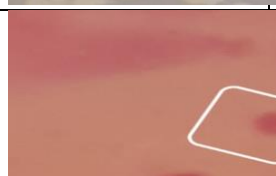
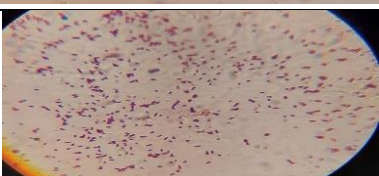

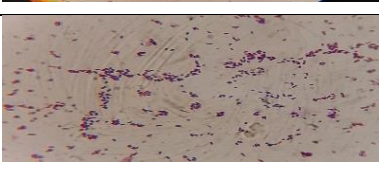

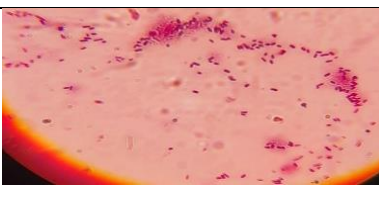
**Tableau 6:** Tableau récapitulatif d'identification morphologique et microscopique des souches isolées.

Les colonies	L'aspect macroscopique	Aspect microscopique		N°
	Crème _ touche à l'extrémité	Cocci en chaînette G+		01
	Jaune.. Ronde.. petite	Bacille G-		02
	Irrégulière..rose Claire.petite	Bacille G+		03
		Diplocoque G +		04
	Rose Claire..bombé..moyenne	Cocci enchainette G+		05
	Ronde..bombé..rose Claire	Diplocoque G+		06
	Irrégulière..jaune..grande			07
	Crème..plate..moyenne	Diplocoque G+		08

	Rose foncé..Ronde..grande	Bacille G- Diplocoque G-		09
	Ronde..blanche..bombé	Cocci enchainetteG+ Diplocoque G+		10
	Ronde..grande..beige			11
	Ronde..rose Claire..bombé	Bacille G- Diplocoque G-		12
	Irrégulière..rose Claire..moyenne	Bacille G+		13
	Fusifforme..beige..moyenne	Diplocoque G-		14
	Rose foncé.Ronde.bombé	Bacille G-		15
	Ronde..bombé..rose pâle et au centre rose foncé	Diplocoque G-		16
	Rose Claire..Ronde..bombé	Bacille G-		17
	Ronde..crème..moyenne..vis queuse.. Bombé	Bacille +		18
	Bombé.rouge.grande.Ronde	Bacille G-		19

	Bombé..rouge.petite.Ronde	Diplocoque G-		20
	Bombé..beige..irrégulière..moyenne	Diplocoque G- Cocci enchainette G-		21
	Bombé..beige..irrégulière..petite	Cocci G- Diplocoque G- Bacille G-		22
	Ronde..rose Claire..bombé	Bacille G- Diplocoque G-		23
	Ronde..rose Claire au centre foncé	Diplocoque G- bacille G-		24
	Ronde..rouge..moyenne..bombé	Diplocoque G-		25
	Irrégulière..rose Claire..bombé	Diplocoque G-		26
	Rouge..bombé..Ronde..petite	Diplocoque G-		27
	Moyenne..Ronde..jaunâtre..bombé			28
	Une touche à l'extrémité	Diplocoque G+		29

	Une touche à l'extrémité	Diplocoque G-		30
	Rose foncé..Ronde..petite	Diplocoque G- Cocci enchainette G-		31
	Rose foncé..Ronde..moyenne	Bacille G-		32
	Irrégulière..orange..bombé..ondulé	Cocci G- Diplocoque G-		33
	Ronde..crème..moyenne..bombé	Diplocoque G+		34
	Grande..beige..bombé..Ronde	Diplocoque G-		35
	Ronde..moyenne..jaune			36
	Rose Claire..bombé..grande..Ronde	Diplocoque G-		37
	Irrégulière..moyenne..beige..Ronde..Bombé	Bacille G-		38
	Bombé..rose..grande..Ronde	Bacille G-		39
	Bombé..rose..petite..Ronde	Bacille G-		40

	Ronde..jaunâtre..bombé..grande	Cocci en amas G+		41
	Ronde..jaune..moyenne	Diplocoque G+		42
	Rose au centre rose pâle bombé.. Fusiforme	Cocci enchainette G-		43
	Jaune Claire..Ronde..petite..plate	Diplocoque G+		44
	Beige..bombé..irrégulière..moyenne	Diplocoque G-		45
	Beige..bombé..irrégulière..petite	Diplocoque G+ Bacille G+		46
	Ronde..rouge..moyenne..bombé	Diplocoque G-		47
	Beige..irrégulière..moyenne	Bacille G+		48
	Rose Claire..bombé..Ronde..petite	Diplocoque G-		49
	Ronde..crème..moyenne..bombé	Diplocoque G+		50
	Ronde..rose au centre rose foncé..bombé	Diplocoque G- Bacille G-		51

### V.9. L'antibiogramme :

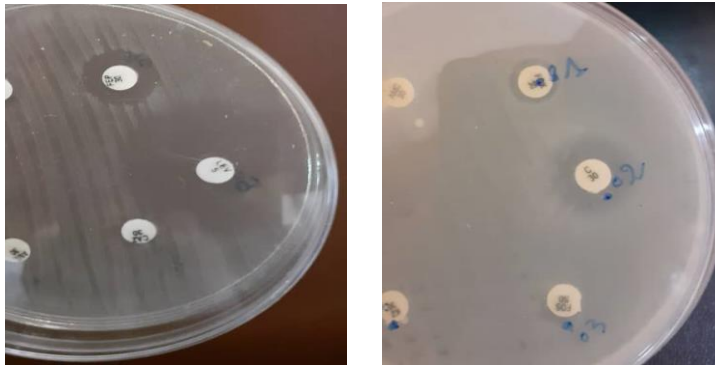
Après incubation sur milieu GN à 37°C pendant 24h, nous avons obtenus les résultats affichés dans le tableau suivant.

**Tableau 7:** Résultats d'antibiogramme montre les différent diamètres de la zone d'inhibition.

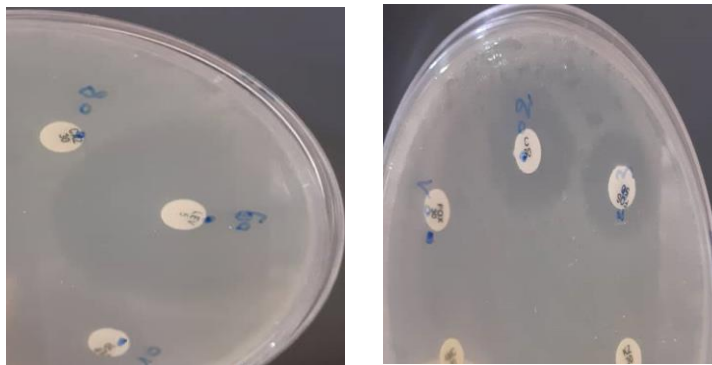
La souche	L'antibiotique	Zone d'inhibition
1	Chloramphénicol	19.5± 0.71
1	Levofloxacin	19 ± 1.41
2	Levofloxacin	16.5± 3.54
8	Chloramphénicol	20.5 ±0,71
8	Fosfomycine	17.5 ±-0,71
8	Levofloxacin	39± 1.00
15	Chloramphénicol	11.5±-0,71
15	Levofloxacin	10 ± 00
17	Chloramphénicol	8.5±-0,71
17	Erythromycine	13 ±1.41
17	Levofloxacin	30± 00
19	Levofloxacin	30 ± 00
27	Chloramphénicol	12.5±2.12
27	Levofloxacin	29.5 ±-0,71
27	Cefoperazone	7.5 ±-0.71
38	Levofloxacin	28.5 ±-0,71
38	Chloramphénicol	14 ± 1.41
39	Chloramphénicol	18 ± 5.66
39	Erythromycine	34± 1.41
39	Amoxiciline + clavulanic acid	25± 00
39	Amoxiciline	16 ± 1.41
39	Levofloxacin	31.5± 4.95
40	Cefoxitine	± 1.0,95

40	Chloramphénicol	15.5± 2.12
40	Fosfomycine	7.5±0.71
40	Levofloxacin	33.5± 2.12
40	Cefepime	14.5 ±0,71
40	Cefoperazone	7.5 ±0,71
43	Chloramphénicol	27 ±1.41
43	Fosfomycine	17.5±0,71
43	Erythromycine	14 ± 2.83
43	Levofloxacin	30 ± 00
43	Cefepime	17.5 ±0,71
43	Cefoperazone	9.5 ±0.71
44	Chloramphénicol	27.5±3.54
44	Fosfomycine	15 ± 00
44	Erythromycine	14 ± 4.24
44	Levofloxacin	34.5±0,71
44	Cefepime	15.5± 1,26
44	Cefoperazone	10 ± 00
45	Cefoxitine	11.5±0,71
45	Chloramphénicol	18.5 ±0,71
45	Fosfomycine	14.5 ±0,71
45	Levofloxacin	32.5 ±0,71
45	Cefepime	13 ±1.41
50	Chloramphénicol	28.5±0,71
50	Fosfomycine	11±00
50	Erythromycine	17.5 ±0,71
50	Amoxiciline +clavulanic acid	15.5 ±0,71
50	Amoxiciline	7.5±0,71
50	Levofloxacin	± 1.1,57
50	Cefepime	20.5 ±0,71
50	Cefoperazone	16 ±1.41

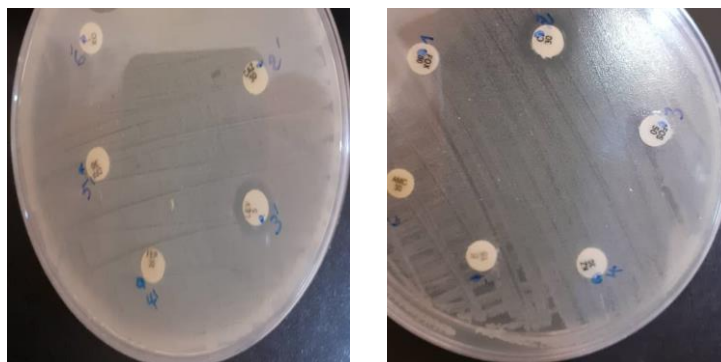
-Les photos suivantes représente les différents résultats du test d'antibiogramme de certaines souches.



**Figure 22:** Résultats du test d'antibiotique(antibiogramme) de la souche n° 40



**Figure 23:** Résultat du test d'antibiotique (antibiogramme) de la souche n°08



**Figure 24:** Résultat du test d'antibiotique(antibiogramme) de la souche n°15



Le tableau suivant résume les résultats d'antibiogramme :

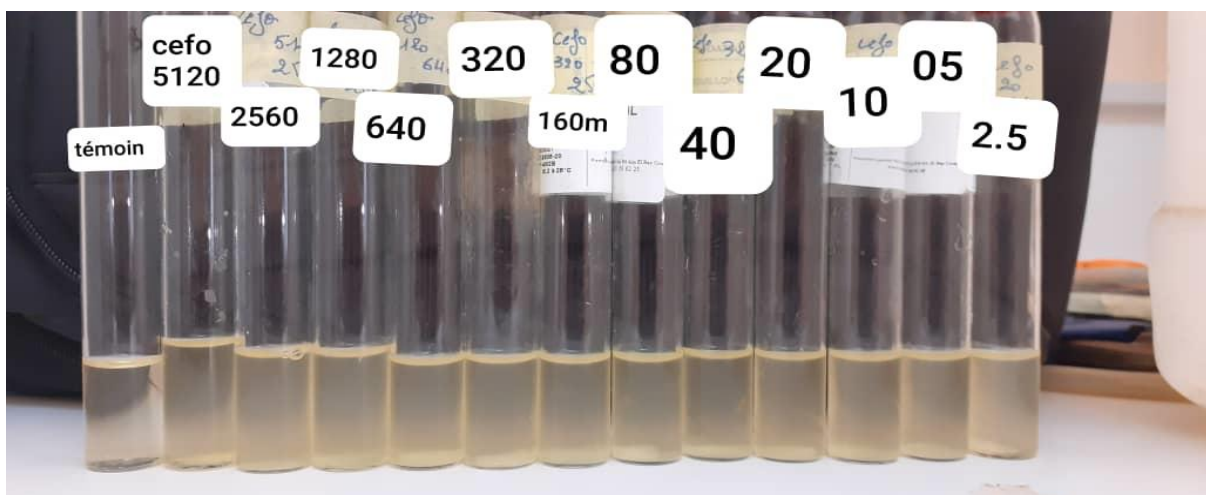
**Tableau 8:** L'antibiogramme des souches isolées aux ATB testés.

L'ATB	levoflx	Amox +ac clav	Amox	cefaz	ceftaz	Eryth	oxaci	chlrm	cefip	Cefoxit	fosfom	Cefoprz
Les souches isolées												
<b>01</b>	I	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R
<b>02</b>	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>08</b>	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	I	R
<b>15</b>	I	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R
<b>17</b>	S	R	R	R	R	I	R	I	R	R	R	R
<b>19</b>	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>27</b>	S	R	R	R	R	R	R	I	R	I	R	R
<b>38</b>	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R
<b>39</b>	S	S	I	R	R	S	R	I	R	R	R	R
<b>40</b>	S	R	R	R	R	R	R	I	I	I	I	I
<b>43</b>	S	R	R	R	R	I	R	S	S	R	S	I
<b>44</b>	S	R	R	R	R	I	R	S	S	R	I	I
<b>45</b>	S	R	R	R	R	R	R	S	I	I	I	R
<b>50</b>	S	I	R	R	R	S	R	S	S	R	I	I

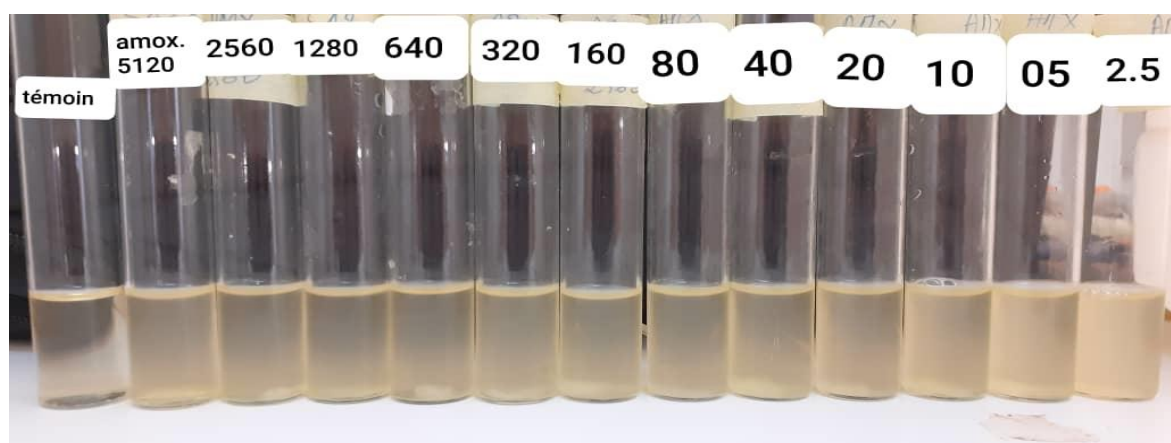
**R : Résistante, I : Intermédiaire , S : Sensible.**

#### V.10. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Après analyse des résultats de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), soit par la microméthode ou la macrométhode (figure 36, 37), on a remarqué que toutes les souches sont poussées après une incubation de 24h avec en présence de toutes les concentrations d'ATB soit l'amoxicilline ou la céfotaxime cela signifie que les souches sélectionnées ont une forte résistance envers ces deux antibiotiques.



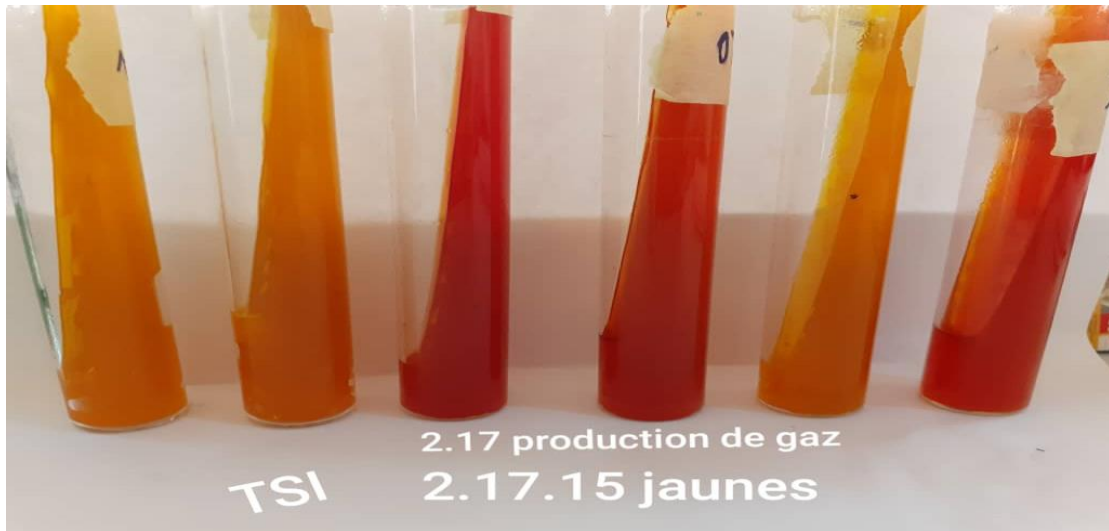
**Figure 25:** Résultats du test CMI avec différentes concentration de l'ATB Céfotaxime par macrométhode



**Figure 26:** Résultats du test CMI avec différentes concentrations de l'ATB Amoxiciline par macrométhode.

## V.11. Tests biochimiques

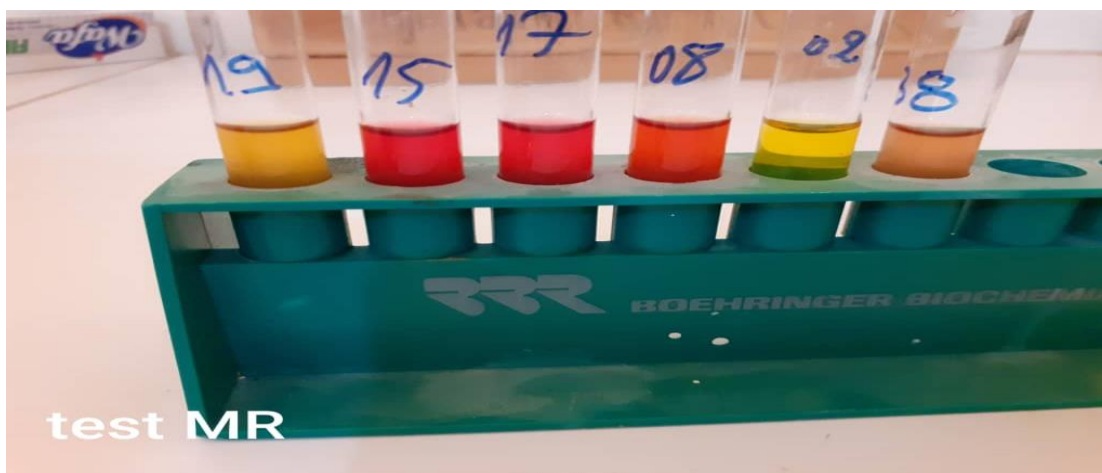
### V.11.1. Métabolisme des glucides :



**Figure 27:** Résultat du test TSI des souches 15, 17, 19, 08, 02, 38.

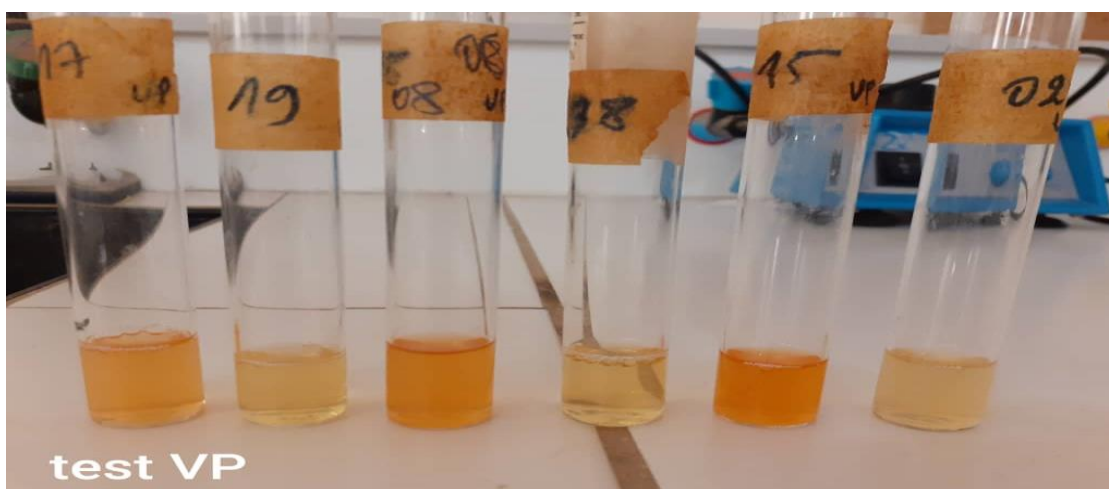
-Lorsque l'un des glucides est fermenté, la baisse du pH fera passer le milieu de l'orange rougeâtre (la couleur originale) au jaune.

Donc les souches 02, 17 et 15 fermentent les glucides, avec apparition de gaz dans le culot des tubes 02 et 17.

**V.11.2. Détermination du type fermentaire :****V.11.2.1. Test RM (Rouge de méthyle) :**

**Figure 28:** Résultat du test RM des souches 15, 17, 19, 08, 02, 38.

La réaction positive se traduit par une teinte rouge, alors que la réaction négative se manifeste par une teinte jaune. Donc les souches 15, 17 et 08 sont positif (+). Les souches 19 et 02 sont négatives. Et la souche 38 est varié.

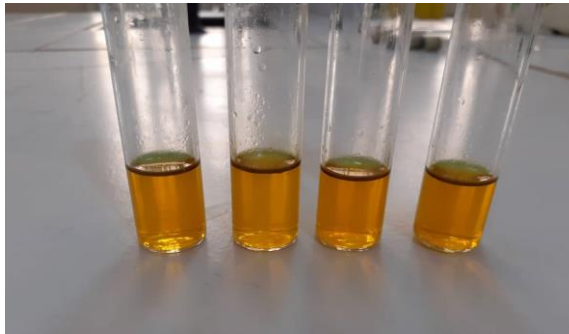
**V.11.2.2. Test VP (au Vosges-Proskauer) :**

**Figure 29:** Résultat du test VP des souches 15, 17, 19, 08, 02, 38.

La réaction positive se traduit par le virage de couleur donc les souches 19, 02 et 38 (VP-) ) Et les souches 17, 15 et 08 sont VP positif (VP+).

### V.11.3. Métabolisme des peptides : milieux de culture l'Urée-indole .

#### V.11.3.1. Production d'indole :



Absence d'indole



Présence d'indole

**Figure 30 :** Résultat du test UI des souches 15, 17, 19, 08, 02, 38.

-Après Quelques secondes, on a remarqué l'apparition d'un anneau rouge (indole positif +) dans les tubes n°15 et 17. Par contre, les autres souches sont indole négatif négatif.

#### V.11.3.2. Dégradation de l'urée :



**Figure 31:** Résultat du test uréase des souches 15, 17, 19, 08, 02, 38.

Le Virage au rouge en cas où la couleur initiale été jaune indique uréase (+) et le virage de couleur vers le rouge rosacé ou orange si la couleur initiale du milieu est rouge sa indique une uréase (+) aussi. Donc la seule souche a uréase (+) c'est la souche o8.

### V.11.3.3. Recherche de la Tryptophane Désaminase (TDA) :



**Figure 32 :** Résultat du test TDA des souches 15, 17, 19, o8, 02, 38.

-Pour une réaction positive une coloration brun rouge va apparaître (TDA(+)), mais pour nos souches la coloration est jaune orangée donc ce test est négatif (TDA (-))

- Les résultats sont résumés dans le tableau 9 :

**Tableau 9:** Récapitulatif des résultats des tests biochimiques :

La souche	Uréase	L'indole	TDA	MR	VP	TSI
o2	-	-	-	-	-	Virage de couleur (jaune) Production de gaz
o8	+	-	-	+	+	Aucun changement
15	-	+	-	+	+	Virage de couleur (jaune)

17	-	+	-	+	+	Virage de couleur (jaune) Production de gaz
19	-	-	-	-	-	Aucun changement
38	-	-	-	-	-	Aucun changement

Selon les clés d'identification des entérobactéries, les 06 souche testés peuvent être identifiées comme suit :

**Souche 02 :** *Salmonella spp* .

**Souche 08 :** *Streptococcus pneumoniae* .

**Souche 15 :** *Klebsiella pneumoniae* .

**Souche 17 :** *Klebsiella pneumoniae* .

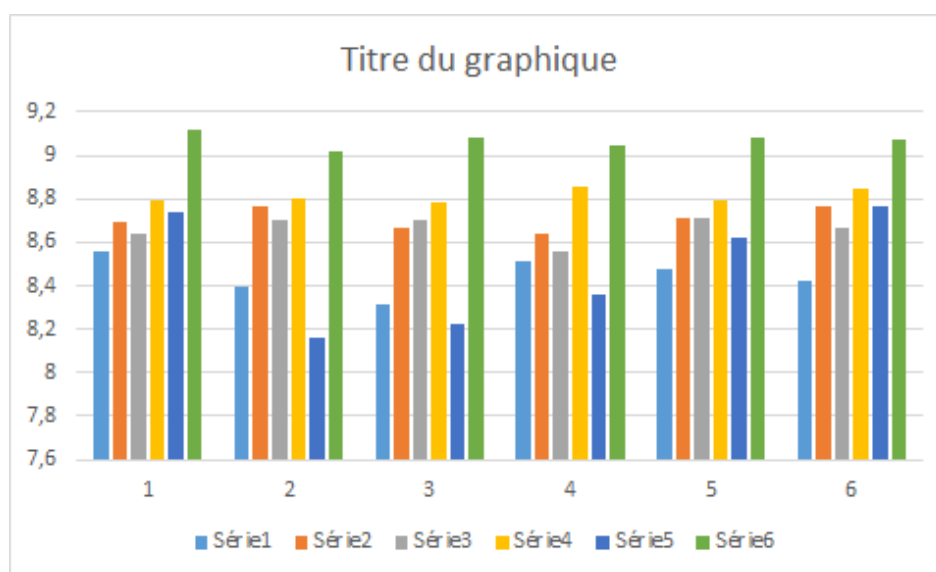
**Souche 19 :** *Acinetobacter baumannii* .

**Souche 38 :** *Yersinia spp.*

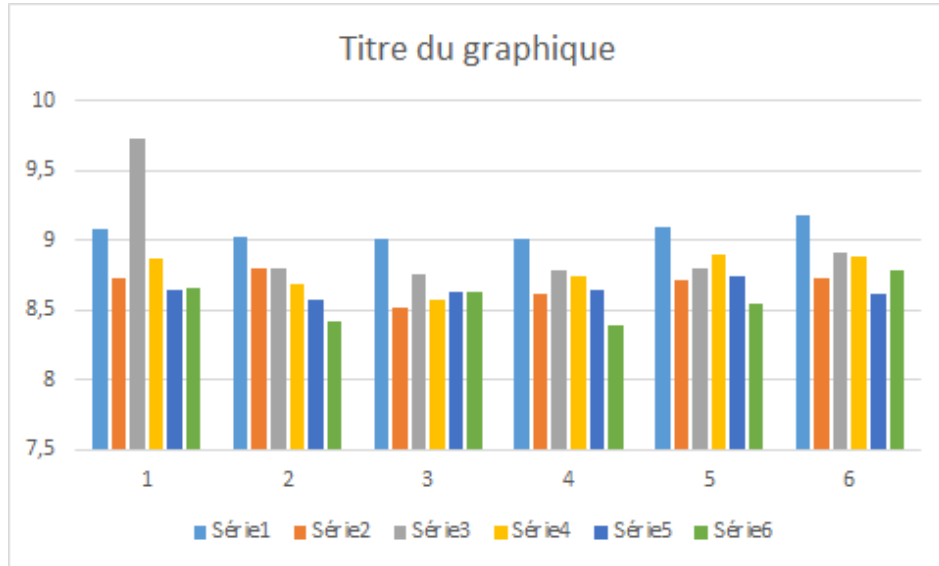
#### V.12. Capacité de formation d'un biofilm:

Les résultats sont affichés dans la figure 33 :

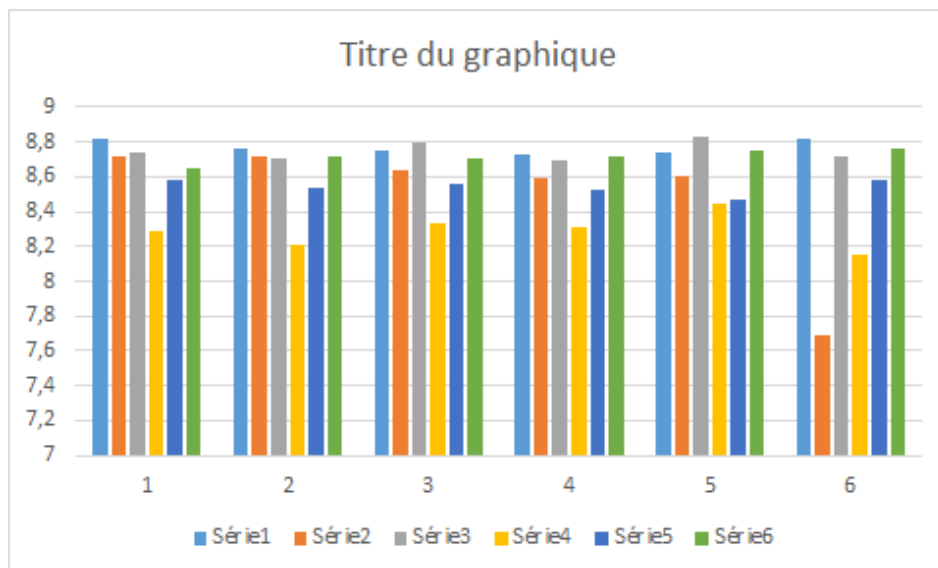
**Figure n° 33:** Résultats du test de la formation de biofilm après 24h d'incubation (UFC /ml)



**Figure n°34:** Résultats du test de la formation de biofilm après 48h d'incubation (UFC/ml).



**Figure n°35:** Résultats du test de la formation de biofilm après 72h d'incubation (UFC/ml).

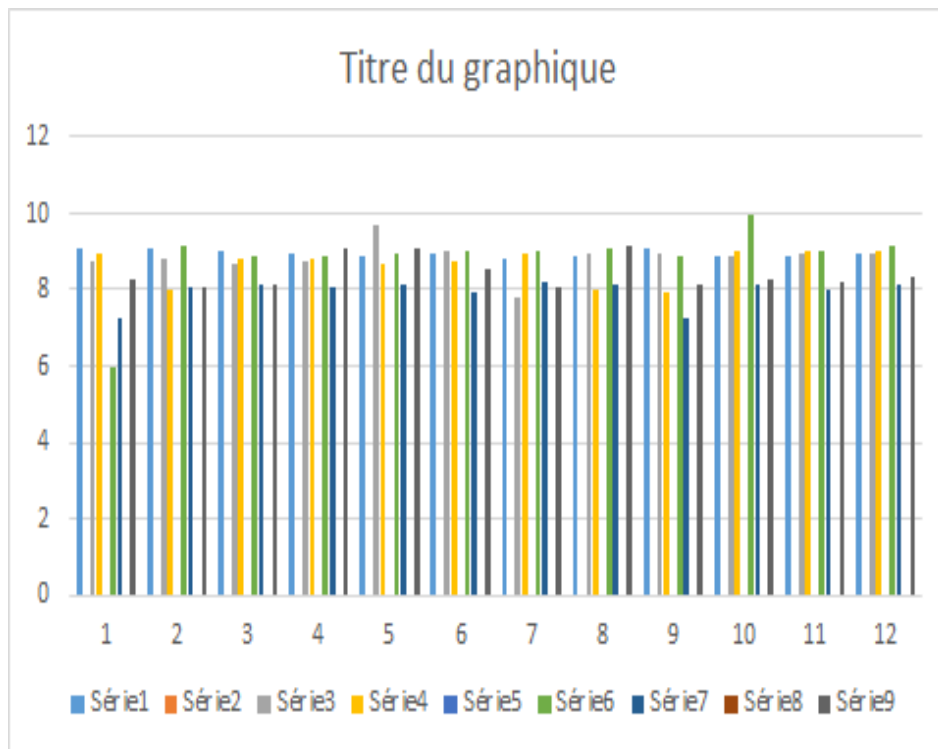


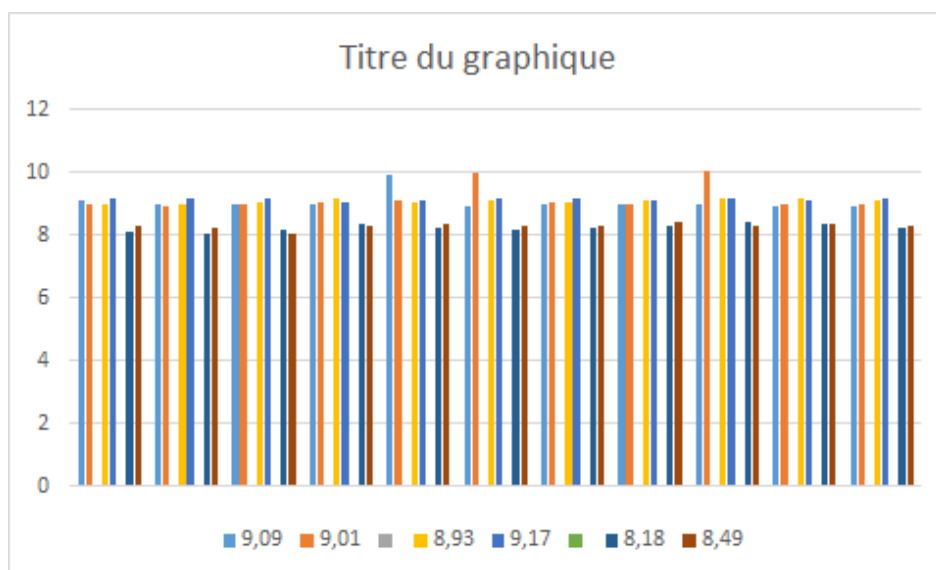


-Les valeurs affichés dans les histogrammes (figure:33-34-35) des souches sélectionnées sont plus élevés que le leur charge initiale (Témoin), ce qu'explique la formation de biofilm. Ils sembleraient que nous atteignant une biomasse bactérienne maximale dès 24h d'incubation dans les conditions utilisées.

### V.13. Test d'antibiofilmogramme :

**Figure n°36:** Résultats de l'antibiofilmogramme (en présence d'Amoxiciline) en UFC/ml.



**Figure n°37:** Résultats de l'antibiofilmogramme avec Céfotaxime en UFC/ml.

Les histogrammes (figure: 36-37) montre l'inefficacité des deux antibiotiques (amoxicilline et céfotaxime) envers les souches testées, avec l'apparition des biomasses bactériennes adhérentes au fond des microplaques après formation de biofilm même en présence de grandes concentrations d'antibiotiques.

#### V.14. Discussion générale :

Après l'isolement de 53 isolats de différents services hospitaliers, ces dernières après identification morphologiques, il y a 32% bacilles 68% cocci.

Selon les clés d'identification des Entérobactéries, et les tests biochimiques, les isolats ont été probablement identifiées comme suit :

Souche 02 : *Salmonella spp*

Souche 08 : *Streptococcus pneumoniae*

Souche 15 : *Klebsiella pneumoniae*

Souche 17 : *Klebsiella pneumoniae*

Souche 19 : *Acinetobacter baumannii*

Souche 38 : *Yersinia spp*

Dans cette étude, après le test de sensibilité aux 12 antibiotiques choisis la résistance des 14 souches a été répartie comme suit: 14/14 envers céfazoline, ceftazidine, oxaciline, 12/14 envers amoxicilline +acide clavulanique, 13/14 envers amoxicilline, 9/14 envers Erythromycine, 8/14 envers Chloramphénicol, 9/14 envers céfépime, 11/14 envers céfoxitine, 8/14 envers Fosfomycine, 10/14 envers Céfopérazone.

Par ailleurs, 11/14 des souches étaient sensibles à Levofloxacin, 2/14 à Erythromycine, 4/14 à Chloramphénicol, 3/14 à céfépime, 5/14 à Fosfomycine.

Ces résultats sont confirmés par les travaux de Baba Ahmed-Kazi Tani et Arlet, (2013).

Par la suite, la détermination de la concentration minimale inhibitrice d'un antibiotique (amoxicilline) envers la souche 19 par deux méthodes dite micro et macrométhode, et on a retenu que la résistance a été supérieure à 5120µg/ml.

Dans le 2<sup>ème</sup> volet de ce mémoire. La capacité à former des biofilms a été testée, cette dernière affichait des valeurs variables d'une souche à l'autre selon l'âge de biofilm 24h, 48h et 72h. Ces résultats révèlent que toutes nos souches sont fortement formatrices de biofilms.

Les biofilms bactériens sont généralement de nature pathogène, et peuvent provoquer des infections nosocomiales. Selon l'institut national de santé (NIH), 65% et 80% des infections microbiennes et chroniques respectivement sont associées à la formation de biofilms (**Jamal et al., 2017**).

A cet égard, on s'est intéressé à tester l'efficacité de deux antibiotiques (amoxicilline, cefotaxime) afin d'inhiber la formation de biofilm de trois souches (*Salmonella spp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*)

présentant une forte résistance aux antibiotiques suivant un gradient de douze concentrations.

Cette méthode permet d'évaluer l'efficacité des ATB à inhiber l'installation des microorganismes en biofilms. On a remarqué que la majorité des concentrations d'ATB ne présentent aucun effet sur les souches testées et elles n'ont pas inhiber l'adhérence de ces germes en biofilms.

Malgré l'amélioration de services de santé, le nombre d'infections liées aux biofilms bactérien ne cesse d'augmenter et demeure un déficit de santé publique de premier ordre (**Olivares et al., 2016**).

# **PARTIE VI : CONCLUSION**

---

---

## Conclusion

Les infections nosocomiales sont en grande partie la conséquence d'un certain progrès diagnostique et thérapeutique de la médecine. Leur pronostic dépend essentiellement du terrain des patients infectés et la multi résistance des germes en cause aux antibiotiques.

Actuellement, la prise de conscience que les infections acquises à l'hôpital représentent un problème majeur de santé publique est manifeste dans le monde hospitalier.

Dans notre travail mené sur des prélèvements cliniques au niveau de certains services de l'EPH Chnafa et l'EPH les Frères Rahmani de la ville de Mécheria et l'EPH Ahmed Medaghri de la ville de Saida et l'EPH de la commune d'El Hassasna (wilaya de Saida), on a pu isoler et identifier 53 souches qui sont les principales Bactéries responsables des infections nosocomiales dans notre région.

On générale, les souches bactériennes isolées et identifiées dans les quatre établissements hospitaliers appartiennent aux familles des *Enterobacteriaceae* (selon leur aspect microscopiques et macroscopique et les tests biochimiques réalisés).

Les souches isolées ont été citées depuis longtemps par la littérature scientifique comme des germes responsables des infections nosocomiales. Après l'étude des antibiogrammes, la majorité des bactéries isolées ont montré aussi une résistance importante aux différents antibiotiques utilisés et commercialisés dans notre pays.

Les propriétés originales des biofilms bactériens, au premier rang desquelles la tolérance aux antibiotiques, jouent un rôle majeur dans le développement d'infections nosocomiales. Bien que les biofilms soient à présent pris en charge comme une physiopathologie spécifique, les recours actuels contre leur développement sont encore limités. Cependant, les données récentes de la recherche fondamentale ont mis en évidence des mécanismes ou des voies de régulation qui constituent autant d'axes

thérapeutiques potentiels. Certains d'entre eux sont réalistes et à un stade avancé d'évaluation, plusieurs données in vivo concordantes permettant d'envisager une validation clinique à court ou moyen terme. Selon notre pratique et les résultats obtenues il ya une grande relation entre le biofilm bactérienne et les IN car les souches qui peut former un biofilm ont été aussi responsables de nombreuse IN pour cela il faut appliquer et exiger toutes les nouvelles méthodes de nettoyage et désinfection dans les services des établissements de santé publique.

Nous proposons aux différents décideurs et intervenants de la santé dans notre pays quelques recommandations pratiques :

- Création de comités de lutte des IN (CLIN).

- Création de services d'hygiène hospitalière, création d'un comité technique des infections nosocomiales (CTIN)...

- L'hygiène hospitalière est l'affaire de tous (professionnels, gestionnaires et décideurs de santé). Une forte motivation de tous ces intervenants est nécessaire pour relever les défis qui se posent pour l'hôpital, en termes de qualité et de coût, et pour le patient, en termes de sécurité.

- Surveiller les antibiothérapies recommander aux patients hospitalisés

Aussi nous recommandons :

**Aux personnels de santé :**

- de respecter les mesures d'hygiène et d'asepsie,
- de respecter les mesures de prévention des infections nosocomiales,
- de faire une surveillance régulière des infections nosocomiales,
- d'arrêter l'antibioprophylaxie systématique
- de pratiquer un antibiogramme avant toute antibiothérapie.

# **PARTIE VII : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---



## Références bibliographiques

**Acar J.F., Bouanchaud D.H., BUU-HOI A.** Résistance bactérienne aux antibiotiques in Le minor L,véron m. Bactériologie médicale Flammarion Medecine Science, Paris, 1989, 2ème édition : 213-224.

**Agence Nationale de Sécurité des Médicaments.** Janvier 2017. L'évolution des consommations d'antibiotiques en France entre 2000 et 2015

**Ahamogbe K .A .L.** 2014.Résistance bactérienne en cas d'infection de plaies diabétiques :diagnostic et surveillance au laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako .Thèse de doctorat en pharmacie .Université des sciences des techniques et des technologies de Bamako.74P. **Alfandari S.** Infections nosocomiales. Epidémiologie, critères du diagnostic, prévention et principe du traitement. Impact internat : Maladies infectieuses. Dec 1997. N°4 : 161-168.

**Allegranzi B, Bagheri Nejad S, Combuscur C, et al.** Burden of endemic health-careassociated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 2011, **377** : 228-241.

**Ambrose PG, Owens RC, Quintiliani R, Yeston N, Crowe HM, Cunha BA, et al.** Antibiotic Use in The Critical Care Unit. *Critical Care Clinics*. Avr 1998;14(2):283-308.

**Andersson S,** master report - *Characterization of bacterial biofilms for wastewater treatment.* Royale Istitute of Technology, school of Biotechnology: Stocholm.2009.

**Arrêté du Ministère de la santé** Dispositions de l'arrêté du ministère de la santé N°456-11 du 2 Rajeb 1431 portant règlement Intérieur des Hôpitaux, publié au Bulletin Officiel N° 5926 du 12 rabii II 1432 , 2010.

**Astragneau .P.**Epidémiologie des infections nosocomiales. *Rev Prat.*1998 ; 48 : 1525-9.

**Astagneau P.** Incidence des infections nosocomiales : Application aux infections du site opératoire. 2016; 1 :17-37.

**Atih. Manuel des GHM**, Version N° 11f-2014 [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 16]. Available from: <https://www.atih.sante.fr/sites/default/files/public/content/2430/vol1an4.pdf>

**Bailly P, Gbaguidi Haore H, Crenn D, Talon D.** Mortalité hospitalière imputable aux infections nosocomiales : mise en place d'un observatoire dans un centre hospitalier universitaire. *Med Mal Infect* 2004 ; 34 : 76-82.

**Balinskaite V, Johnson AP, Holmes A, Aylin P.** The Impact of a National Antimicrobial Stewardship Program on Antibiotic Prescribing in Primary Care: An Interrupted Time Series Analysis. *Clin Infect Dis.* 2019 Jul 2;69:227-232.

**Barbut, F, Mastr Antonio P, Delmée M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I.** Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterization of the isolates. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2007, 13 : 1048-1057.

**Bendinger B., Rijnaarts H.H.M., Altendorff K et al..** Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl. Environ. Microbiol*, 1993;59: 3973-3977.

**Bengaly L.** Implémentation et évaluation d'un programme de promotion d'hygiène des mains dans un hôpital national du Mali [Sciences pharmaceutiques]. Genève; 2011.

**Berche P, Gallard J. L, Simennet M.** les infections nosocomiales d'origine bactérienne et leur prévention. *Bactériologie des infections humaines de la biologie à la clinique.* Paris : Flammarion, 1991 : 64-71.

**Boudraa W., S.Bengati, et F.Djamaa.** Contribution à l'étude de la qualité bactériologique et physico-chimique de l'eau des de la veille d'annaba. Mémoire pour l'obtention du diplôme de master en microbiologie de l'environnement. Université de Guelma. P, 2011 : 47,50

**Boulegmane A.** Evaluation des pratiques d'hygiène hospitalière à l'hôpital Sekkat de la préfecture d'arrondissement Casa Ain Chock. ENSP 2004-2006

**Birgand G ..**infection de site opératoire : Approche originales du diagnostique et de la prévention. Thèse de doctorat en épidémiologie .Paris : université PIERRE et MARIE CURIE, 2014 ;10.

**Black CL, Yue X, Ball SW, Fink RV, de Perio MA, Laney AS, Williams WW, Graitcer SB, Fiebelkorn AP, Lu PJ, Devlin R.** Influenza Vaccination Coverage Among Health Care Personnel — United States, 2017–18 Influenza Season. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2018 Sep 28;67:1050-1054.

**Bouvet P J Met Crimont PAD.** Acinetobacter. In : Le MINOR L et VERON M, eds. *Bactériologie Médicale.* Paris : Flammarion, 1989 ; 599-604.

**Branche AR, Falsey AR.** Viral Diagnostics : Only half of the battle. *J Infect Dis.* 2017;216:923–5.

**Camille Delarras,** *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire.* Lavoisier. Editions TEC and DOC. 11, rue la voisier F-75008 Paris :2007 ;p463. ISBN : 978-2-714-30-0945-8

**Carbonne A et coll.** Évaluation de la pertinence du signalement des infections nosocomiales dans l'inter-région Nord. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire.* 2003: P 1-3.

**Carter KC. Semmelweis I, Mayrhofer C,** and the rise of germ theory. *Med Hist.* janv 1985;29(1):33-53.

**Celmer D., Oleszkiewicz J.A., Cicek N.** Impact of shear force on the biofilm structure and performance of a membrane biofilm reactor for tertiary hydrogen-driven denitrification of municipal wastewater. *Water Research,*2008, 42: 3057-3065.

**Center for Disease Control and Prevention.** ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States, 2013 [Internet]. 2013 [cited 2019 Aug 10]. Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>

**Characklis W.G et Marshall K .C ,** *Biofilms.* John Wiley et Sons, Inc, New York, N.Y,1990.

**Cholley P.** Analyse génétique des souches multi-résistantes de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'est de la France, apport prédictif potentiel sur le risque infectieux .Thèse de doctorat en science de la vie et de la santé. Université de Franche –compte. Besancon ,2010;p21.

**Chevalier B ,Margery J, Wade B, Ka S, Diatta B, Gueye M, Mbaye PS, Debonne JM.** Perception du risque nosocomial parmi le personnel hospitalier de l'Hôpital Principal de Dakar ;2008

Comité éditorial de l'UVMaf. Hygiène hospitalière [Internet]. 2011. Disponible sur: [http://www.uvmaf.org/UE\\_agent\\_infectieux/liste-1.html](http://www.uvmaf.org/UE_agent_infectieux/liste-1.html)

**COREY, G R, M E STRYJEWSKI, et R J EVERTS.** «Short-course therapy for bloodstream infections in immunocompetent adults.» *International Journal of Antimicrobiol Agents*, 2009:47-51

**Costerton J W, Lewandowski Z, De Beer D, Caldwell D, Korber D, James G.** Minireview: biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology* , 1994;176: 2137-2142.

**Costerton.J.W.** *Discussion : Introduction to biofilm.* *International Journal of Antimicrobial Agents*, 1999 ; 11: 217-221.

**COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP .** Bacterial bio- films: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999;284:1318-1322.

**Courvalin P.** Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *J Intern Med* 2008;264:4–16.

**CNAM.** La rémunération sur objectifs de santé publique en 2018, bilan à un an du nouveau dispositif. Dossier de presse, 25 avril 2018 disponible sur le lien : [https://www.ameli.fr/fileadmin/user\\_upload/documents/CNAM\\_-\\_Dossier\\_de\\_presse\\_Rosp\\_2017\\_-\\_25\\_Avril\\_2018.pdf](https://www.ameli.fr/fileadmin/user_upload/documents/CNAM_-_Dossier_de_presse_Rosp_2017_-_25_Avril_2018.pdf)

**Curtis CE, Al Bahar F, Marriott JF.** The effectiveness of computerised decision support on antibiotic use in hospitals: A systematic review. *PLoS One*. 2017; e 0183062 : 12.

**Circulaire n° 2002-272** du 2 mai 2002 relative au bon usage des antibiotiques dans les établissements de santé et à la mise en place à titre expérimental de centres de conseil en antibiothérapie pour les médecins libéraux.

**Dali Ali A**, Infection nosocomiales à bactéries multi résistantes (BMR) en réanimation adulte à l'EHUO profil épidémiologique, facteurs de risque et facteurs pronostiques, thèse de doctorat, Université d'Oran 1 Ahmed Benbella, 2015 ; p161.

**David Lebeaux, Jean-Marc Ghigo** . Infections associées aux biofilms Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ? médecine/sciences ,2012 ; 28 : 727-39.

**Davey P, Marwick CA, Scott CL, Charani E, McNeil K, Brown E, Gould IM, Ramsay CR, Michie S**. Interventions to improve antibiotic prescribing practices for hospital inpatients. Cochrane Database Syst Rev. 2017; 2 :CD003543.

**Davies J, Davies D**. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. Microbiol Mol Biol Rev 2010;74:417–33.

**Davison HC, Woolhouse MEJ, Low JC**. What is antibiotic resistance and how can we measure it? Trends Microbiol. 2000;8:554–9.

**Dembele J**. Infection nosocomiales dans le service des maladies infectieuses du CHU du POINT -G. [Bamako]: Médecine et odon- stomatologie; 2014.

**Denis, F., Ploy, M.-C., Martin, C., Bingen, E. & Quentin, R**. Bacilles à Gram négatif non fermentaires, Genre Pseudomonas. In Bactériologie Médicale, techniques usuelle, 2007; p 330-343. Edited by E. Masson.

**Didier Stingre et Xavier Verdeil**, Les infections nosocomiales, paru et réédité aux Etudes Hospitalières en avril 2004 (V. Ouvrages parus).

**Décret n° 2001-671** du 26 juillet 2001 relatif à la lutte contre les infections nosocomiales dans les établissements de santé. Article L. 1413-14 du code de la santé publique (république française).

**Donlan R.M (2002)**. Biofilms : microbial life on surface. Emerging Infections Diseases 8(9) : p 881-890.

**Ducel G, Fabry J, Nicolle L**. Prevention of Hospital-acquired infections: a practical guide (2nd ed). 2002, WHO/CDS/CSR/EPH/2002.12 URL :

**Ducel G, Fabry J, Nicolle L**. Prévention des infections nosocomiales : Guide pratique [Internet]. 2eme éd . 2002;p71. Disponible sur: [www.who.int](http://www.who.int)

**Dyar OJ, Nathwani D, Monnet DL, Gyssens IC, Stålsby Lundborg C, Pulcini C;** ESGAP Student-PREPARE Working Group. Do medical students feel prepared to prescribe antibiotics responsibly? Results from a cross-sectional survey in 29 European countries. *Journal Antimicrob Chemoth.* 2018;73:2236-2242.

**Edwards, A M, et R C Massey.** «How does *Staphylococcus aureus* escape the bloodstream?» *Trends Microbiol*, Avril 2011: 184-190.

**Eggertson L. C.** *difficile*: by the numbers. *CMAJ.*, 2004, 171 : 1331-1332.

**Emily RM, Sydnor TMP.** Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. *Clin Microbiol Rev*, 2011; 24(1):141-73.

**European Centre for Disease Prevention and Control:** Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2010. Stockholm : ECDC, 2010. URL [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC\\_DisForm.aspx?ID=578](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC_DisForm.aspx?ID=578) Consulté en Octobre 2011.

**Fagon JY.** Pneumopathies nosocomiales à *Pseudomonas aëruginosa*. 1998.

**Fey, P.D. and Olson, M.E** Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol*, 2010; 5: 917-933.

**Fletcher M.** Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium- substratum separation distance. *Journal of Bacteriology* 170: 2027-2030. *Med Mal Inf.*, 1998 ;28 :159-66.

**Flemming, H.C., Wingender, J., Moritz, R., Borchard, W., Mayer, C.** Physico-chemical properties of biofilms. Short review, *Biofilms in the aquatic environment*. Edt The Royal Society of Chemistry, 1999:1-12.

**Flemming H.-C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S. A. & Kjelleberg S.,** . Biofilms: An Emergent Form of Bacterial Life. *Nature Reviews Microbiology*, 2016; 14(9): 563-575.

**Flemming and Wingender** .The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 2010; 8(9): 623-33.

**Francois D ,Edouard B, Christian M ., Maric C et Renald.** *Bactériologie médical : technique usuelles* .2 end édition .Elsevier Masson , 2007; p274.

**Fridkin SK, Welbel SF, Weinstein RA.** Magnitude and prevention of nosocomial infections in the intensive care unit. *Infect Dis Clin North Am.* juin 1997;11(2):479-96.

**Galmiche, J.-M.** *Hygiène et médecine, histoire et actualité des maladies nosocomiales.* Editions Louis Pariente. Paris, 1999 ;510p.

**Garnier B. et Jarlier V.** Bêta-lactamines et bacilles à gram négatif. *Feuillets de biologie*, 1996 ; XXXVII, (212) :13-20.

**Gaudière JP.** Entre biologistes, militaires et industriels : l'introduction de la pénicilline en France à la libération. *RevHist CNRS*, nov 2002;7.

**Gauthier, F.,** rapport de thèse - *Biofilms qualité biologique de l'eau potable au cours de sa distribution.* Université de Picardie – Amiens, 2002.

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

**Goller C.C, Romeo T.** Environmental influences on biofilm development. *Current Topics in Microbiology and Immunology* , 2008;322: 37- 66.

**Goossens H, Peetermans W, Sion JP, Bossens M.** Evidence-based perioperative antibiotic prophylaxis policy in Belgian hospitals after a change in the reimbursement system. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 2001;145:1773-7.

**Grosgean. M & Lacoste M .***Communication et intelligence collective: le travail à l'hôpital.* Presses Universitaires de France-PUF, 1999.

**Guide pratique de signalements des infections nosocomiales** à l'usage des correspondants d'hygiène hospitalière, médecins traitants et responsables du signalement. CLIN CHU Hassan II-FES 2013. Consultable à l'URL : [www.chufes.ma](http://www.chufes.ma). visité le 28 Avril 2017 à 20h.

**Haddadi AZEA.** Construction d'un score prédictif du risque nosocomial pour des patients de réanimation [Thèse]. [Lille]: Droit et de santé; 2013.

**Harbarth S, Samore MH.** Antimicrobial resistance determinants and future control. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:794-801.

**Health Canada.** Hand washing, cleaning, disinfection, and sterilization in health care. Canada Communicable Disease Report (CCDR), Supplement, Vol., 24S4, July 1998.

**Herman Goossens, Matus Ferech, Robert Vander Stichele ME.** Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet* 2005;365:579–87.

**Haeggman S., Lofdahl S., Burman L.G.** An allelic variant of the chromosomal gene for class a beta-lactamase k2, specific for klebsiella pneumoniae, is the ancestor of shv-1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997 ;p 2705-2709.

**Horan TC, Andrus M, Dudeck MA.** CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am. J. Infect. Control*, 2008, 36 : 309-332 .

**Jean Paul G.** « Entre biologiste militaire et industriel : l'introduction de la pénicilline En France à la libération » la revue pour l'histoire, 2002;7.

**Jones RN,** Resistance patterns among nosocomial pathogens : trend over the past few years *Chest*.2001 ;119(2) :397-404.

**Joseph R, Demeyer D, Vanrenterghem D, Van Der Berg R, Kuijper E, Delmée M.** First isolation of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027, toxinotype III in Belgium. *Euro Surveill.*, 2005, 10 : E051020.4.

**Khan HA, Baig FK, Mehboob R.** Nosocomial infections: epidemiology, prevention, control and surveillance, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2017.

**khayar Y.** Comportement des entérobactéries isolées des urines vis-à-vis de l'Amoxicilline –Acide clavulanique l'imipenème et l'ertapenème. Thèse de doctorat. Pharmacie .Université Mohammed V. Rabat , 2011 ;p 10-15.

**Klevens RM, Edwards JR, Richards CL Jr, et al.** Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Rep.*, 2007, 122 : 160-166.

**KHOURY AE, LAM K, ELLIS B, COSTERTON JW.** Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. *Asaio J*, 1992; 38: 174-178.

**KUIJPER EJ, BARBUT F, BRAZIER JS, et al.** Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. *Euro Surveill.*, 2008 ;13.



**Lacotte Y, François B, Brun-Buisson C, Jouvin-Marche E, Ploy MC** la recherche en stratégies antibactériennes : nouvelles pistes, nouveaux enjeux ? Bull Acad Med 2019 (sous presse).

**Lebeaux.D et Ghigo J.M** .infection associée au biofilm –Quelle perspective thérapeutique issues de la recherche fondamentale ? *medecine/science* 28(8-9), 2012 ; 727-739 <https://doi-org/10-1051/medsci/2012288015>.

**Leboucher B, Leblanc M, Berlie I, Savagner C, Lemarié C, Le Bouédec S.** Prévention des septicémies nosocomiales sur cathéters veineux centraux dans une unité de réanimation néonatale : impact d'une procédure d'information. Arch Pédiatr 2006; 13 : 1-6.

**Lejeune, P.** «Adhérence bactérienne et biofilm.» Dans *Maitrise des infections nosocomiales de A à Z*, de Jacques Fabry, 45-50. Health&Co Editions, 2004.

**Leulmi Z. K.** Les Proteus incriminés dans les infections communautaires et hospitalières: étude moléculaire de la résistance aux antibiotiques. Thèse de doctorat d'état, université des Frères Mentouri Constantine, Algérie, 2015 ; 227p.

**Lévin C, Thilly N, Dousak M, Beraud G, Klesnik M Uhan S, Nathwani D, Beovic B, Pulcini C; ESGAP** (the European Society of Clinical Microbiology [ESCMID], Infectious Diseases Study Group for Antimicrobial stewardship). Perceptions, attitudes, and practices of French junior physicians regarding antibiotic use and resistance. *Med Mal Infect.* 2019;49:241-249.

**Liu Y. and Tay J-H.** *The essential role of hydrodynamic force in the formation of biofilm and granular sludge.* Water Research, 2000;36: 1653-1665.

**Lock MA.** Attached microbial communities in rivers. In Ford TE. (ed.). *Aquatic Microbiology.* Blackwell Scientific Publications (Cambridge), 1993; 113-138.

**Loo VG, Poirier L, Miller MA, et al.** A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N. Engl. J. Med.*, 2005, 353 : 2442-2449.

**Lucas-Baloup I, Clarlet C.** Infections nosocomiales - 40 questions sur les responsabilités encourues. Ed SCROF. Paris; 1997 : 509 p.

**LEWIS, K.** Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)*, 2005;70: 267-274.

**Marchal M.** Etude des biofilms bactériens arsénite-oxydants. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg, France, 2010 ; 165 p.

**Mainardi JL, Goldstein FW, Gutman L.** Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques. *Maladies infectieuses. Encycl Med Chir (Elsevier, Paris)* 1996 ;8-006-N-10 :8p.

**Marion OPATOWSKI,** Résistance bactérienne aux antibiotiques, apport du système national des données de santé, [Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay]

**Martinez LR, Casadevall A.** Cryptococcus neoformans biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold and UV light. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007; 4592- 4601.

**Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyah D.J, Fatma T, Rattan A.** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of medical microbiology*, 2006;24 (1), 25-9

**Melzer Mark, Petersen Irene.** Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. *Journal of Infection*, 2007;55: 254-259.

**Meziani M.** Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : Cas des Entérobactéries et *Pseudomonas*. Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine, 2012 ; 30-32.

**Mimoz O, Rayeh F, Debaene B.** Infections liées aux cathéters veineux en réanimation. 2001.

**Misset B, Timsit JF, Dumay MF, Garrouste-Orgeas M, Chalfine A, et al.** A continuous quality improvement program reduces nosocomial infection rates in the ICU. *Intensive Care Med* 2004;30:395-400.

**Mittelman M.W.** Adhesion to biomaterials. *Bacterial Adhesion molecular and ecological diversity*, 1996; 89-127 p.

**Monnet T.** Les infections nosocomiales : L'importance d'un suivi épidémiologique et de l'identification rapide des bactéries en cause. Thèse de doctorat en Pharmacie .Grenoble :Université Joseph Fourier, 2011 ; 21p.

**Mulvey M., Simor R.** Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? *CMAJ* , 2009 ;180(4); 408-415.

**Muto CA, Pokrywka M, Shutt K, et al.** A large outbreak of *Clostridium difficile* associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 2005, **26** : 273-280.

**Nauciel C, Vildé J.L.** Bactériologie médicale. Elsevier Masson SAS, 2ème éd. ISBN, 2007; 978-2-294-08994-7.

**Nauciel C, Vildé J.-L.** Bactériologie Médicale. 2ème édition MASSON , 2000 ;121124 :140-142.

**Nejad SB., Syed SB., Ellis B., Pittet D.** Health-care-associated infection in Africa: a systematic review. *Bull World Health Org* , 2011; 89: 757-65.

**OMS** | Qu'est-ce que la résistance aux antimicrobiens? [Internet]. WHO. [cited 2019 Sep 17]. Available from: <http://www.who.int/features/qa/75/fr/>

**Onerba.** «Rapport d'activité 2008.» Paris, 2010, 170.

**Organisation mondiale de la santé** 100 Recommandations pour l'hygiène des mains au cours des soins .2005

**Organisation mondiale de la santé** , Prévalence des infections nosocomiales dans 27 hôpitaux de la région méditerranéenne EMHJ, Vol, 16 No.10 ; 2010.

**O'Toole G. A., Kaplan HB., Kolter R.** Biofilm formation as microbial development. *The Annual Review of Microbiology*, 2000; 54: 49- 79.

**Paul G., Robert C et al.** antibiotic use in the intensive care unit .*Int.Care, clin* , 1998;28P.

**Pichon M, Gaymard A, Zamolo H, Bazire C, Valette M, Sarkozy F, Lina B.** Web-based analysis of adherence to influenza vaccination among French healthcare workers. *J Clin Virol.* 2019;116:29-33.

**Pilly E**, Collège des universitaires de maladies infectieuses et tropicales (France). Maladies infectieuses et tropicales. 25ème édition. Paris: Alinéa Plus, 2015 ; 648 p.

**Poole K**. Efflux-mediated multiresistance in Gram-négative bacteria. Clin Microbiol Infect, 2004;126 Pp.

**Popi**. Maladies infectieuses. Paris : CMIT, 2003 :185-224.

**Phillips, P.L., Fletcher, J., Schultz, G.S.,** Biofilm made easy. Wounds International, 2011.

**Pouwels KB, Hopkins S, Llewelyn, MJ, Walker AS, McNulty CAM, Robotham JV**. Duration of antibiotic treatment for common infections in English primary care: cross sectional analysis and comparison with guidelines. BMJ. 2019;364:l440.

**Price, J, et G Baker**. «Clinical and Microbiological Determinants of outcome in Staphylococcus aureus Bacteraemia.» *International Journal of Microbiology*, 2010.

**Quinet B, Mitanchez D, Salauze B, Carbonne A, Bingen E, Fournier S, Moissenet D, Vu-Thien H**. Description et investigation d'une épidémie nosocomiale de colonisations et d'infections à Escherichia coli producteur d'une bêta-lactamase à spectre étendu dans un service de néonatalogie. Archives de Pédiatrie, 2010;17:145-149.

**Raisin**, surveillance des infections nosocomiales en réanimation adult. Réseau REA-Raisin, France, résultats 2012. Institut de veille sanitaire, 2013 :38.

**Rice LB**. The Maxwell Finland Lecture: for the duration-rational antibiotic administration in an era of antimicrobial resistance and *Clostridium difficile*. Clin Infect Dis. 2008; 46:491–6.

**Richard C**. Bactériologie et épidémiologie des espèces du genre Klebsiella. Bull. Inst. Pasteur, 1982 ;127-145.

Réseau BN-RAISIN, InVS. «Surveillance des bactériémies nosocomiales en France.» 2004.

**Salabert-Dubar D.**, L'hygiène en médecine générale : état des lieux dans une commune des Hauts de Seine, 2008.

**SAMOU. Fotso hamel said**. Les infections nosocomiales dans le service de chirurgie

'b' de l'hôpital du point g. ( en ligne).Mali : Université du Mali, 2004/2005, p 106.  
Disponible sur : «  
[http://indexmedicus.afro.who.int/iah/fulltext/Thesis\\_Bamako/05M49.PDF](http://indexmedicus.afro.who.int/iah/fulltext/Thesis_Bamako/05M49.PDF)»

**Saveyi A, Troadec M.** Le Manuel du CLIN, un outil pour une demande de qualité -  
Coordination C.CLIN Sud-Est. Hygiènes, 2001; IX:73–162.

**Schaffner William.** Les infections nosocomiales. CECIL Traité de médecine interne.  
1ère édition française, 2005 ; 267 :1548-1555.

**SFAR.** «Antibioprophylaxie en chirurgie et médecine interventionnelle.  
Réactualisation 2010.» 2010, 30.

**Spyridon, P., Stamations, A., Kanstantinos, K., Ioannis, P., George, M.,** Biofilm and  
orthopedic practice: the world of microbes in a world of implant, 2009.

**Sherbuk JE, McManus D, Topal JE, Malinis M.** Improved mortality in  
*Staphylococcus aureus* bacteremia with the involvement of antimicrobial stewardship  
team and infectious disease consultation. Infect Control Hosp Epidemiol. 2019;40:932-  
935.

**Solbi, S.** Effet du repiquage de *Pseudomonas aeruginosa* sur les caractères  
morphologiques, biochimiques et sensibilités aux antibiotiques. Thèse de doctorat  
d'état, université de Mohammed V-Souissi, Rabat, 2013 ;79p.

**Stail, Gorton, Korones.** Lateonset sepsis in verylowbirthweightneonates: a report  
from the National Institute of Child Health and HumanDevelopmentNeonatalResearch  
Network. J Pediatr , 1996 ;129:63-71.

**Suda KJ, Calip GS, Zhou J, Rowan S, Gross AE, Hershov RC, Perez RI, McGregor  
JC, Evans CT.** Assessment of the Appropriateness of Antibiotic Prescriptions for  
Infection Prophylaxis Before Dental Procedures, 2011 to 2015. JAMA Network Open.  
2019;2(5):e193909.

**Sutherland, I.W.** The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial  
environment. Trends Microbiol, 2001;9: 222-227.

**Tasseau F. et Baron D.** Infections nosocomiales. In : BRUKER Get FASSIN D, eds.  
Santé publique. Paris : Ellipses, 1989 ; 478-79.

**Taylor G, Mitchell R, McGeer A, et al.** Healthcare-associated influenza in Canadian hospitals from 2006 to 2012. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2014;35:169–75.

**Van Boeckel TP, Gandra S, Ashok A, Caudron Q, Grenfell BT, Levin SA, et al.** Global antibiotic consumption 2000 to 2010: An analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis* 2014;14:742–50.

**Van Houdt R, Michiels C.** Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res. Microbiol.*, 2005;156: 626-633.

**Vassele A.** «La politique de lutte contre les Infections nosocomiales.» Rapport parlementaire, Office Parlementaire d'Evaluation des Politiques de Santé, 2006 ; 290.

**Verhaegen Jan.** Les Entérobactéries. Bactériologie. Elsevier , 2004.

**Vincent A.** Infection associées aux soins définition, fréquences et facteurs de risque (en ligne). Laprugne-GARCIA E, **Saint genis laval.** 2008. CCLIN sud-est. CCLIN. octobre 2008, p5.

**Vincent. J.** Bactéries multirésistantes dans les hôpitaux français : bilan en 2000 et perspectives de surveillance nationale dans le cadre du Réseau d'Alerte d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN), 2000.

**Vosylius S, Sipylaite J and Ivaskевичius J.** Intensive care unit acquired infection : a prevalence and impact on morbidity and mortality. *Acta Anesthesiol Scand*, 2003 ; 47 : 1132-1137.

**Waglechner N, Wright GD.** Antibiotic resistance: It's bad, but why isn't it worse? *BMC Biol* ,2017;15.

**Wagner B, Filice GA, Drekonja D, Greer N, MacDonald R, Rutks I, Butler M, Wilt TJ.** Antimicrobial stewardship programs in inpatient hospital settings: a systematic review. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2014;35:1209-28.

**Walsh C.** Antibiotics : actions, origins, resistance. ASM Press; 2003.

**Wendy Cronin, Linda Tietjen.** Prévention des infections .Guide à l'intention des programmes de planification familiale. JHPIEGO corporation, Baltimore, Maryland, 1992 ; 13 :5.

**Wintenberger.C** et al. Propositions pour des antibiothérapies plus courtes.  
Médecine Mal Infect. 2017; 47:92–141.

# **PARTIE VIII : ANNEXES**

---



**I-Milieus de cultures :**

Composition chimique des milieux de cultures :

**Bouillon nutritive :**

- peptones.....10gr
- Extrait de bœuf..... 1gr
- Extrait de levure..... 2gr
- Chlorure de sodium.....5gr

PH final : 6,8

**Gélose nutritive :**

- Extrait de viande de bœuf ..... 1gr
- Extrait de levure .....2 gr
- Peptone.....5 gr
- Chlorure de sodium..... 5 gr
- Agar..... 15 gr

**Gélose Chapman :**

La gélose Chapman bioMérieux SA est un milieu de culture ancien (**Chapman, 1945**), destiné à l'isolement et à la différenciation des staphylocoques.

Ce milieu est utilisé :

Pour l'isolement des staphylocoques à partir de prélèvement biologiques en bactériologie médicale ;

La formule théorique de ce milieu de culture en g/l d'eau purifiée est :

- Extrait de viande (bovin ou porcin) .....01 gr
- Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin) ..... 10 gr
- Chlorure de sodium.....75 gr
- D- Man ..... 10 gr

- Agar.....15 gr
- Rouge de phénol.....0.025 gr
- Eau distillée..... 1000ml
- Protéase peptone N°3..... 6 gr

PH final : 7.4

Stérilisation a l'autoclave : 15 minutes à 120°C

Préparer des boîtes de pétri à partir du milieu déshydraté suivant les indications du fabricant ou utiliser des boîtes de Pétri prêtes à l'emploi. Laisser les boîtes re venir à température ambiante avant usage

#### **-Gélose Mac Conkey :**

La gélose Mac Conkey bio Mérieux SA est un milieu d'isolement sélectif et de différenciation destiné à la recherche des Entérobactéries ( dont Escherichia coli ), à partir de prélèvement d'origine diverses ( clinique , alimentaire , pharmaceutique....)

La formule théorique de ce milieu de culture en g/l d'eau purifié est :

- Peptone de gélatine (bovin ou porcin).....17gr
- Peptone de viande ( bovin ou porcin)..... 3gr
- Lactose (bovin)..... 10gr
- Sels biliaire (ovin ou bovin)..... 1.5gr
- Chlorure de sodium.....5gr
- Agar.....13.5gr
- Rouge neutre ..... 0.03gr
- Cristal violet..... 0.01gr

PH : 7.1

Ce milieu est disponible en boîtes de prêts à l'emploi. Les laisser revenir à température ambiante avant emploi.

**Gélose TSI (Triple Sugar Iron Agar) :**

La gélose TSI est utilisée pour l'identification présomptive des entérobactéries basée sur la fermentation du glucose, lactose et du saccharose et sur la production de gaze et de H<sub>2</sub>S. (il contient trois glucides : glucose, lactose et saccharose).

La formule théorique de ce milieu de culture en g/l d'eau purifié est :

-Extrait autolytique de levure.....	3 gr.
-Extrait de viande.....	3 gr.
-Peptone.....	20gr.
-Chlorure de sodium.....	5gr.
-Lactose.....	10gr.
-Saccharose.....	10gr.
-Glucose .....	1gr.
-Thiosulfate de sodium.....	0,3gr.
-Citrate de fer(III).....	0,3gr.
-Rouge de phénol.....	24gr.
-Agar bactériologique.....	9gr.

**Le Bouillon Clark et Lubs (RM-VP) :**

**- Rouge de Methyl (RM) ou Voges-Proskauer (VP).):**

Le milieu de **Clark & Lubs** permet de différencier les Enterobacteriaceae avec les réactions au rouge de méthyle et de Voges-Proskauer. Le rouge de méthyle différencie le processus de fermentation, il est jaune au-dessus d'un pH de 6,3 et rouge en dessous de 4,2.

**Leur composition est :**

Pour l'étude de la fermentation dérivée de l'acide puruvique

Peptone tryptique ou polypeptone .....05 à 07g

Glucose..... 05g  
 Hydrogénophosphate de potassium( $K_2HPO_4$ ).....5gr.  
 Eau distillée ..... 1000ml

Autoclavage 2minutes à 115-120°C

Le pH doit être égal à 7,5.

#### **-Le bouillon Urée- Indole :**

Permet la mise en évidence de l'**uréase**, de la **tryptophane** désaminase et de la production d'**indole** (le milieu contribue à la mise en évidence des caractères d'identification des **Entérobactéries**).

#### **Principe :**

Les bactéries possédant une uréase transforment l'urée en carbonate d'ammonium entraînant une alcalinisation qui provoque une coloration rouge violacé du milieu en présence de rouge de phénol (indicateur de pH). La production d'indole est mise en évidence par l'addition de réactif de Kovacs (code 55313) qui agit avec l'indole en donnant une coloration rouge dans la partie supérieure du milieu en cas de réaction positive. La présence de tryptophane désaminase (TDA) est mise en évidence par addition de perchlore de fer qui provoque une coloration brun rouge du milieu en cas de réaction positive.

La formule théorique de ce milieu de culture en g/l d'eau purifiée est :

-L-Tryptophane ..... 3gr  
 -  $K_2HPO_4$  ..... 1gr  
 -  $KH_2PO_4$  ..... 01g  
 - Chlorure de sodium ..... 5gr  
 - Urée ..... 20gr  
 -Alcool à 95° ..... 10 ml  
 -Rouge de phénol ..... 0,05 gr  
 -pH final : 6,8 ±0,2

**-L'eau physiologique :**

Chlorure de sodium ..... 09g

Eau distillée .....1000g

PH final à 7

Stérilisation à 121 °C pendant 15minute .

**II-Réactif :** Les principaux réactifs utilisés dans l'identification bactérienne.**-Bleu de méthylène :**

Bleu de méthylène.....20g

Acide phénique.....20g

Alcool à 95°... ..... 100ml

**2-Fuchsine phénique :**

Fuchsine basique.....01g

Acide phénique cristallisé..... 05g

Alcool à 95 °..... 10ml

**3-Violet de gentiane :**

Violet de gentiane ..... 10g

Alcool éthylique .....100ml

Acide phénique ..... 05%

Gélatine ..... 0.2%

Fondue ..... 50%

**III-Examen à l'état frais :**

L'état frais c'est une méthode rapide qui consiste à observer entre lame et lamelle une suspension bactérienne à l'objectif x40. Les bactéries sont vivantes, on peut alors

déterminer des caractères tels que la morphologie générale, la mobilité et le groupement (bacille ou coque) ainsi que le type de colonies. (Solbi, 2013) .

#### **IV-Coloration de Gram :**

La coloration de Gram, permet d'étudier les affinités tinctoriales des germes, renseignant aussi sur la prédominance des espèces présentes. Il peut s'agir d'une espèce pure ou au contraire d'une flore complexe. Le résultat est déclaré en bactéries à Gram positif ou à Gram négatif. (Leulmi, 2015)

La coloration de GRAM peut être obtenue suivant divers protocoles techniques normalisés, obéissant tous aux mêmes étapes : fixation, coloration, décoloration, contre-coloration.

Un des protocoles les plus usuels se déroule selon les étapes suivantes :

1-Etalement et **fixation** par la chaleur de la suspension bactérienne sur une lame porte objet,

2- **Coloration** pendant une minute au violet de gentiane(au cristal violet) pendant 30s,

3-Lavage à l'eau,

4-Coloration au lugol pendant une minute,

5-Lavage à l'eau,

6-**Décoloration** à l'éthanol à 95°jusqu'à élimination du colorant (environ 30S),

7-Lavage à l'eau,

8-**Contre-coloration** pendant 1 à 2 minutes par une solution de fuschine diluée à 10% ou par une solution de safranine.

9-Lavage à l'eau.

10-Lecture : Quand les bactéries sont violettes, elles sont des grams positifs et quand elles sont roses, elles sont des grams négatifs

**NB** : Cette coloration permet en général d'apprécier la pureté des souches bactériennes avant toute identification.

<b>Enterobacteriaceae</b>	<b>Uréase</b>	<b>TDA</b>	<b>Indole</b>
<i>Salmonella</i> SE I en général	-	-	-
<i>S. typhi</i>	-	-	-
<i>S. paratyphi</i> A	-	-	-
<i>S. arizonae</i>	-	-	-
<i>Citrobacter</i>	-	-	-
<i>Edwardsiella</i>	-	-	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+
<i>Alkalescens dispar</i>	-	-	+
<i>S. dysenteriae</i>	-	-	d
<i>S. boydii, flexneri</i>	-	-	d
<i>S. sonnei</i>	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	-
<i>Proteus rettgeri</i>	+	+	+
<i>Proteus morgani</i>	+	+	+
<i>Providencia</i>	-	+	+
<i>Levinea</i>	-	-	+
<i>Y. enterocolitica</i>	+	-	d
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	+	-	-
<i>K. pneumonia</i>	+ lent	-	-
<i>K. oxytoca</i>	+ lent	-	+
<i>E. aerogenes</i>	-	-	-
<i>K. ozaenae</i>	D	-	-
<i>K. rhinoscleromatis</i>	-	-	-
<i>E. cloacae</i>	-	-	-
<i>E. agglomerans</i>	-	-	-
<i>Hafnia alvei</i>	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i> et <i>liquefaciens</i>	-	-	-
<b>Vibrionaceae</b>	<b>Uréase</b>	<b>TDA</b>	<b>Indole</b>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	+
<i>A. sobria</i>	-	-	+
<i>A. salmonicida</i> (culture à 22°C)	-	-	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-	-	+
<i>Vibrio cholerae</i> O1	-	-	+
<i>Vibrio</i> NAG	-	-	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	-	+
<i>V. alginolyticus</i>	-	-	+
<i>V. anguillarum</i>	-	-	+