

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 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine: Science de la Nature et de la Vie

Spécialité/Option: Biologie, Santé et hygiène hospitalières

Département: Biologie

Thème

Etude de l'activité antibactérienne des biocides sur les bactéries responsables des infections nosocomiales

Présenté par:

Guefaifia Nabila

Hamil Naima

Touati Bouchra

Devant la commission composée de :

Mme Abdaoui W.

Mme Merabet R.

Mme Boussadia M I.

Mr Benouareth D.E.

Mme Braik A.

Mme Ayed H.

Présidente

Encadreur

Examinatrice

Membre

Membre

Membre

Université de Guelma

Université de Guelma

Université de Guelma

Université de Guelma

Université de Guelma

Université de Guelma

Juin 2017

Résumé

Les infections nosocomiales (IN) constituent un problème de santé publique, elles sont responsables d'une surmortalité et d'un surcoût, lié notamment à l'augmentation de la durée de séjour dans les établissements de santé.

Le présent travail a pour but principal l'évaluation de l'effet antibactérien du peroxyde d'hydrogène et de l'éthanol, sur des espèces bactériennes de référence reconnues comme agent causal des maladies nosocomiales dans le milieu sanitaire, à savoir: *E.coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*.

Les méthodes de la diffusion en milieu gélosé et en milieu liquide ont été utilisées pour le test de sensibilité et la détermination de la CMI et de la CMB. Les résultats obtenus ont révélé que les deux biocides possèdent une activité inhibitrice variable selon la concentration et la souche testée.

Les concentrations minimales inhibitrices de ces deux agents varient entre 18 et 21 pour le peroxyde d'hydrogène et entre 28,8 et 38,4 % pour l'éthanol; par contre celles bactéricides sont aux alentours de 18 et 24 % et entre 57,6 et 67,2 % pour le peroxyde d'hydrogène et l'éthanol, respectivement. Nous constatons que les biocides testés constituent des agents antimicrobiens puissants qui ne devraient pas être utilisés que quand la nécessité se présente avec des concentrations suffisamment élevées pour tuer toutes les bactéries exposées et réduire le risque du développement d'une résistance bactérienne.

Mots clés: infection nosocomiale, résistance bactérienne, peroxyde d'hydrogène, éthanol, CMI, CMB.

Abstract

Nosocomial infections (NI) are a public health problem. They are responsible for an excess mortality and additional costs, which is linked in particular to the increase in the length of stays in hospitals. The main purpose of this work was to evaluate the antibacterial effect of peroxide of hydrogen and ethanol on bacterial species, namely: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* recognized as a causative agent of nosocomial diseases. The diffusion methods on agar and liquid medium were used as reference for the sensitivity test and for the determination of the minimum inhibitory concentrations (MIC) and the minimum bactericidal concentrations (MBC). The results revealed that two biocides have varying inhibitory activities depending on their concentration and the tested strain.

The minimum inhibitory concentrations of these two agents vary between 18 and 21 for the peroxide of hydrogen and between 28.8 and 38.4% for ethanol. However their MBC were found to be around 18-24% and 57.6 and 67.2% for hydrogen peroxide and ethanol, respectively. Our results showed that the tested biocides are potent antimicrobial agents that should not be used unless the need arises with concentrations high enough to kill all exposed bacteria and reduce the risk of the development of bacterial resistance.

Key words: nosocomial infection, bacterial resistance, hydrogen peroxide, ethanol, MIC, MBC.

ملخص

تعتبر عدوى المستشفيات من اهم مشاكل الصحة العامة فهي المسؤولة عن الوفيات و ارتفاع التكاليف المرتبطة على وجه الخصوص بزيادة مدة الاقامة في مرافق الرعاية الصحية.

الهدف من العمل الحالي هو تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لبيرو كسيد الهيدروجين والايثانول على انواع بكتيرية تعرف على انها العامل الرئيسي المسبب لعدوى المستشفيات في المرافق الصحية المتمثلة في *E.Coli* ; *P.aeruginosa*; *S.aureus*.

تم استعمال طريقة الانتشار على سطح جيلوز وطريقة الانحلال في وسط سائل لاختبار الحساسية والتأثير المضاد للجراثيم وتحديد الحد الأدنى للتركيز المثبط (CMI) والحد الأدنى للتركيز القاتل للبكتيريا (CMB).

توضح النتائج المتحصل عليها ان كل من بيرو كسيد الهيدروجين والايثانول لديهما نشاط مثبط متغير حسب التركيز والسلالة المختبرة.

الحد الأدنى للتركيز المثبط لهذين العاملين يختلف ما بين 18 و 21 %بالنسبة لبيرو كسيد الهيدروجين وبين 28.8 و 38.4 %بالنسبة للايثانول.

في المقابل الحد الأدنى للتركيز القاتل هو حوالي 18 و 24 %وبين 57.6 و 67.2 .%بالنسبة لبيرو كسيد الهيدروجين والايثانول على التوالي.

نلاحظ ان المبيدات المختبرة تشكل عوامل مضادة للجراثيم القوية التي لايجب ان تستخدم إلا عند الحاجة مع تركيزات عالية لقتل جميع الجراثيم المكشوفة والحد من مخاطر تطور مقاومة البكتيريا .

الكلمات الرئيسية : عدوى المستشفيات، مقاومة البكتيريا، بيرو كسيد الهيدروجين، الايثانول، CMI, CMB.

Remerciement

Louanges à «Allah» le tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la volonté, la santé, et la patience nécessaires pour mener à bien ce modeste travail

*Nous remercions **Mme Merabet .R** d'avoir accepté de diriger notre travail. Vous avez su donner à chacun de vos enseignements un grand attrait, vos conseils ont toujours été d'une grande pertinence. Tout au long de nos études, vous nous avez appris la rigueur dans le travail, grâce à votre grand sens de la pédagogie et de la qualité de vos enseignements, nous avons pu apprécier votre disponibilité et vos précieux conseils. Permettez-nous de vous exprimer aujourd'hui toute notre admiration et notre gratitude.*

*Nous tenons tout particulièrement à remercier vivement **Mme Abdaoui.W** (**M.A.A** à l'université de Guelma) qui nous a fait l' honneur d' accepter la présidence de ce jury de soutenance, nous tenons à vous assurer ici de notre sincère gratitude. Veuillez trouver ici le témoignage de notre vive reconnaissance et de notre profond respect.*

*Nous s'exprimons nos sincères remerciements à : **Mme Boussadia (M.C.B** à l'université de Guelma) d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail. Nous vous remercions pour la qualité de votre enseignement et l'intérêt que vous portez aux étudiants.*

Nous tenons à remercier vivement les membres de jury :
***Dr: Benouareth D.E** (Professeur à l'université de Guelma), **Mme Braik (M.A.A** à l'université de Guelma), **Mme Ayed (M.A.A** à l'université de Guelma), pour l'intérêt qu'ils ont accordé à ce travail en acceptant de l'évaluer.*

*On réserve enfin nos derniers remerciements à : **Mme Amri.S** qui nous a vraiment aidé ; que dieu la protège, à: **Mme Thabet** et **Mme Boumaàza** pour leurs aides précieuses et leurs disponibilités.*

- Au personnel du laboratoire de l'université de Guelma, pour Leur aide.

- A toutes les personnes qui nous ont aidées de près ou de loin dans la Réalisation de ce mémoire.

Liste des abréviations

ADN: L'acide désoxyribonucléique.

AMC: Amoxiciline.

ARN: L'acide ribonucléique.

ARNm: L'acide ribonucléique messenger.

ATB: Antibiotique.

ATCC: American Type Culture Collection.

BMR: Bactérie Multirésistante.

C: Chloramphénicol.

CA-SFM: Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

CMB: Concentration minimale bactéricide.

CMI: Concentration minimale inhibitrice.

CN: Gentamycine.

CTX: Céfotaxime.

DHFR: Dihydrofolate réductase.

DHPS: Dihydroptérate synthétase.

D.O: Densité optique.

E: Erythromycine.

E.coli: *Escherichia coli*.

GN: Gélose nutritive.

HIV: Human immunodeficiency virus.

IN: Infection nosocomiales.

LPS: Lipopolysaccharide.

MH: Mueller Hinton.

Nm: nanomètre.

OMS: Organisation mondiale de la santé.

P: Pénicilline.

P.aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*.

PAR: *Pseudomonas aeruginosa* résistant.

PBP: Penicillin Binding Protein.

PH: Potentiel hydrogène.

PLP: Protéines de liaison aux pénicillines.

R: Résistant.

S: Sensible.

SARM: *Staphylococcus aureus* résistant à la métiline.

S.aureus: *Staphylococcus aureus*.

SIDA: Syndrome d'immunodéficience acquise

VA : Vancomycine.

Liste des figures

Figure 01: Le pourcentage des principaux germes des infections nosocomiales.....	4
Figure 02 : Observation microscopique de <i>Clostridium perfringens</i>	9
Figure 03 : Observation microscopique de <i>Staphylococcus aureus</i>	9
Figure 04 : Observation microscopique de <i>Escherichia coli</i>	10
Figure 05 : Observation microscopique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
Figure 06 : Principaux mécanismes d'actions des antibiotiques.....	14
Figure 07 : Principe de la méthode de diffusion par disque.....	33
Figure 08 : Antibiogramme des souches a) <i>E.coli</i> b) <i>P.aeruginosa</i> c) <i>S aureus</i>	38
Figure 09: L'effet de l' H_2O_2 sur <i>E.coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>S.aureus</i>	39
Figure 10: L'effet de C_2H_6O sur <i>E.coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>S.aureus</i>	40
Figure 11: Détermination de la CMI du peroxyde d'hydrogène observée chez les trois souches étudiées	42
Figure 12 : Détermination de la CMB du peroxyde d'hydrogène observée chez les trois souches étudiées.....	43
Figure 13 : Représentation graphique récapitulatif de la détermination de la CMI et CMB pour le peroxyde d'hydrogène.....	44
Figure 14 : Détermination de la CMI de l'éthanol observée chez les trois souches étudiées.....	45
Figure 15 : Détermination de la CMB de l'éthanol observée chez les trois souches étudiées.....	46
Figure 16 : Représentation graphique récapitulatif de la détermination de la CMI et CMB pour l'éthanol.....	47

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les infections bactériennes et leurs agents causals.....	7
Tableau 02 : Les grandes familles d'antibiotiques et leurs spectres d'activité.....	15
Tableaux 03 : Les différents mécanismes de résistance.....	20
Tableaux 04 : Aperçu de mécanismes d'action de quelques biocides et de leur utilisation.....	23
Tableau 05 : Listes des antibiotiques utilisés pour l'évaluation de l'antibiorésistance.....	32
Tableau 06 : Les dilutions du peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂	34
Tableau 07 : Les dilutions de l'éthanol C ₂ H ₆ O.....	35
Tableau 08 : Détermination de la CMI avec les différentes dilutions.....	36
Tableau 09 : Résultat de l'antibiogramme pour les trois souches.....	39
Tableau 10 : Diamètre de la zone d'inhibition de H ₂ O ₂ à différentes concentrations.....	40
Tableau 11 : Diamètre de la zone d'inhibition du C ₂ H ₆ O à différentes concentrations.....	41
Tableau 12 : détermination de la CMI de l' H ₂ O ₂	42
Tableau 13 : détermination de la CMI de C ₂ H ₆ O	45

Introduction

L'environnement hospitalier est colonisé par de nombreux micro-organismes comme les champignons, les virus, les parasites et les bactéries.

Les infections nosocomiales sont considérées comme un problème majeur de la santé publique, et ceci en raison de leur morbidité importante, et du surcoût hospitalier non négligeable. Les principaux germes responsables d'infections graves sont bien connus ; il s'agit de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Serratia marcescens*, *salmonella typhi*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*etc (Talbert et al., 2009).

La résistance des bactéries vis-à-vis des agents destinés à les combattre pose de graves problèmes, surtout dans le domaine médical et plus particulièrement, en milieu hospitalier où, souvent 99% des souches isolées présentent des résistances. Afin de limiter la survenue d'effets indésirables et l'émergence de plus en plus fréquente de résistances bactériennes, la prescription des antibiotiques doit être réservée aux seules situations cliniques où leur efficacité a été démontrée (Anssour, 2016).

Certains biocides sont utilisés au niveau des tissus vivants, dans la limite de leur tolérance d'éliminer ou de tuer les micro-organismes et/ou d'inactiver les virus en fonction des objectifs fixés.

Les antibiotiques et les biocides fonctionnent de façon similaire et différents mécanismes ont permis à certaines bactéries de devenir résistantes aux deux à la fois. Cela suscite des inquiétudes à propos de l'utilisation indiscriminée et souvent inappropriée de biocides dans des situations où ils ne sont pas nécessaires, ceux-ci pouvant contribuer au développement et à la persistance de la résistance.

L'objectif de cette étude a été d'évaluer l'effet antibactérien de deux biocides utilisés quotidiennement dans le milieu hospitalier: le peroxyde d'hydrogène et l'éthanol sur des souches bactériennes souvent responsables des infections nosocomiales: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

Dans un premier temps nous avons réalisé une étude bibliographique qui traite les infections nosocomiales ainsi que leurs principaux agents causals. Ensuite nous nous sommes particulièrement intéressées aux antibiotiques, leur classification, leur modes d'action et les mécanismes de résistances développés par les bactéries pour s'échapper à l'action des antibactériens, et enfin nous nous sommes entreprises d'identifier les différents biocides et leurs effets antibactériens, en particulier le peroxyde d'hydrogène et l'éthanol.

Introduction

Dans un second temps nous avons décrit le matériel ainsi que les méthodes utilisés pour réaliser l'objectif de cette étude, une analyse détaillée des résultats obtenus et enfin une conclusion générale présentant les perspectives envisagées.

1. Définition

Le terme nosocomial est issu du grec *nosos* (maladie), *komein*: (soigner). Selon l'organisation mondiale de santé, Les infections nosocomiales aussi appelées infections hospitalières sont des infections acquises pendant un séjour à l'hôpital et qui n'étaient ni présentes ni en incubation au moment de l'admission du patient. Les infections survenant plus de 48 heures après l'admission sont habituellement considérées comme nosocomiales.

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 [1].

Pour les infections de la plaie opératoire, on qualifie d'infections nosocomiales celles survenues dans les 30 jours suivant l'intervention. S'il y a mise en place d'un implant ou d'une prothèse, le délai est d'une année après l'intervention.

2. Epidémiologie

Les infections nosocomiales sont connues dans le monde entier et touchent aussi bien les pays développés que les pays pauvres en ressources. Les infections contractées en milieu médical figurent parmi les causes majeures de décès et de morbidité accrue parmi les patients. Elles représentent une charge importante pour le patient comme pour la santé publique. Une enquête de prévalence réalisée pour l'OMS dans 55 hôpitaux de 14 pays représentant quatre régions (Europe, Méditerranée orientale, Asie du Sud Est et Pacifique occidental) a montré qu'en moyenne, 8,7 % des patients hospitalisés étaient touchés par une infection nosocomiale. A tout moment, plus de 1,4 million de personnes dans le monde souffrent de complications infectieuses acquises à l'hôpital. Les fréquences maximales ont été rapportées dans les hôpitaux des régions de la Méditerranée orientale et de l'Asie du Sud Est (11,8 % et 10,0 % respectivement), et la prévalence atteignait 7,7 % en Europe et 9,0 % dans le Pacifique occidental [2].

Les principaux micro-organismes responsables sont les bacilles Gram négatif et les cocci Gram positif: *Escherichia Coli* (18.4%), *Staphylococcus Aureus* (14%), *Pseudomonas Aeruginosa* (6.1%), *Entérocooccus spp* (16.7%) (**Fig 01**).

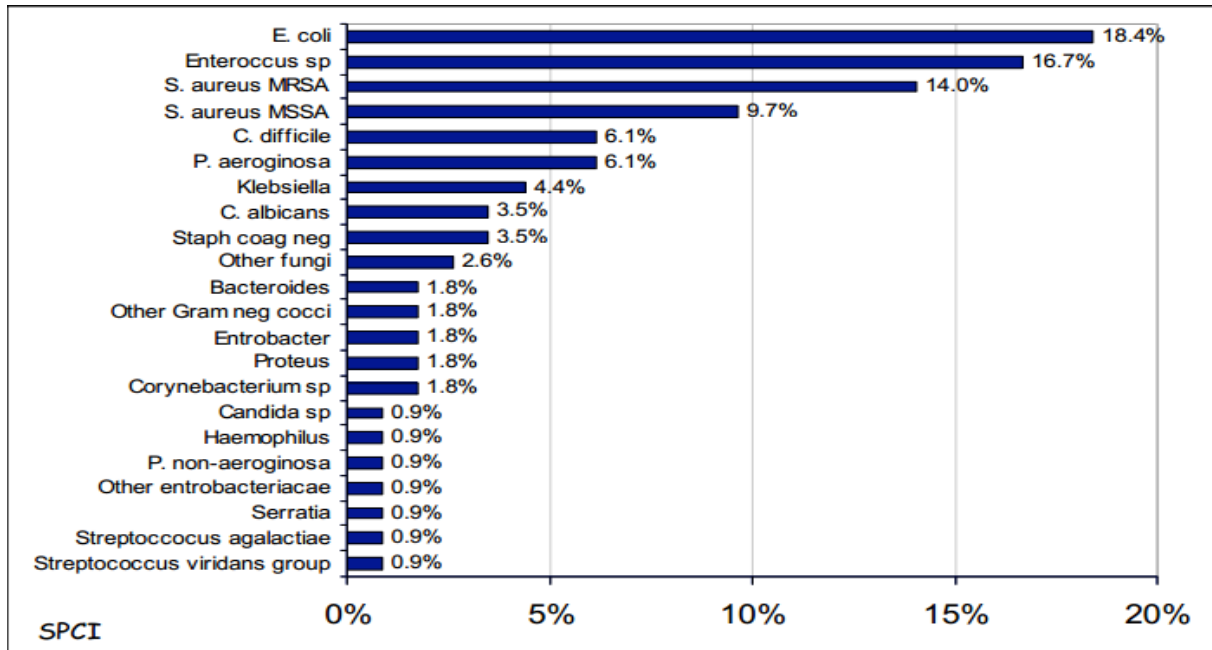


Figure 01: Le pourcentage des principaux germes des infections nosocomiales (Brucker, 1998).

3. Mode de transmission

Pour que l'infection se développe chez un malade à l'hôpital, il faut que deux éléments suivants se réunissent :

- **Le réservoir ou source** d'un microorganisme est défini comme le lieu de contact entre le micro-organisme et l'hôte qui permet la dissémination de l'infection nosocomiale.
- **l'hôte** : Le malade doit avoir de façon transitoire ou permanente une défaillance de son système de protection contre l'infection pour être récepteur.

La transmission peut se faire par contact direct (les mains) ou indirect (objet contaminé), par voie aérienne ou par l'intermédiaire d'un support contaminé (Nourriture, liquide de perfusion, appareillage...) (Tasseau *et al.*, 1989).

Il existe quatre grands modes de transmission:

3.1 Auto-infection

C'est 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.

Les complications infectieuses respiratoires liées au décubitus et ses conséquences sur le drainage des voies aériennes peuvent être des auto-infections.

Enfin certains malades immunodéprimés (aplasie médullaire, SIDA) peuvent avoir des bactériémies dues aux germes intestinaux qu'ils hébergent. Ces infections rigoureusement endogènes sont aussi des auto-infections (**Tasseau *et al.*, 1989**).

3.2 Hétéro infection

On parle d'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. On parle d'infection manu portée ou d'infection transmise par le matériel d'exploration ou de soin. C'est le mode de contamination majeure lors de nombreuses épidémies et probablement le plus sensible aux mesures prophylactiques (**Tasseau *et al.*, 1989**).

3.3 Xéno-infection

Ce sont des infections qui sévissent sous forme endémique ou épidémique dans la population extrahospitalière. 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 (**Berche *et al.*, 1991**).

3.4 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 (**Berche *et al.*, 1991**).

4. Facteurs de risque

Par définition, un facteur de risque agit en augmentant l'incidence de la maladie chez des sujets qui y sont exposés, mais on parle aussi de facteur lorsque l'incidence diminue avec la baisse de l'exposition.

Cette notion est très importante dans la mesure où la maîtrise de l'exposition devrait permettre de baisser l'incidence de la maladie ; les facteurs de risques se classent en facteurs intrinsèques et en facteurs extrinsèques.

4.1. Les facteurs intrinsèques: ils ne sont pas ou peu modifiables

- le sexe: le risque est plus élevé chez la femme, le risque de bactériémie est plus élevé chez l'homme.
- L'âge supérieur à 50 ans : 95% des décès liés ou attribuable aux infections urinaires nosocomiales sont observés après cet âge.
- La sévérité de la pathologie sous-jacente.
- La colonisation préalable du méat urinaire (facteur liés au sexe).
- L'antibiothérapie à large spectre qui favorise la survenue d'infections urinaires nosocomiales à bactéries « hospitalières » de type *Pseudomonas aeruginosa* ou à levure (**Mchich, 2002**).

4.2. Les facteurs extrinsèques

Le sondage urinaire: le risque infectieux est étroitement associés en réanimation au sondage vésicale, il augmente de façon quasi linéaire avec la durée du cathétérisme vésical. 50% à 90% des infections urinaires nosocomiales sont liées au sondage urinaire. Ainsi que dans l'enquête française de 1996 ; 60% de ces infections étaient observées chez les patients sondés, soit un taux de prévalence 14 fois plus élevé chez les patients sondés que chez les patients non sondés. Chez les porteurs d'une sonde à demeure, la bactériurie est quasi permanente (**Mchich, 2002**).

4.3. Autres manœuvres instrumentales

- La cystoscopie entraîne une bactériémie dans 15 à 20 % des cas lorsqu'il existe une infection urinaire préalable.
- Les pyelostomies.
- Les résections endoscopiques de prostate se compliquent d'infection urinaire basse dans 15 à 70% des cas et de bactériémie dans 15 à 30 % des cas.
- Urétéropyélographie rétrogrades peuvent être pourvoyeuses d'infections graves du haut appareil avec bactériémie (**Mchich A, 2002**).

5. Principaux types d'infections bactériennes

5.1. Les infections urinaires

L'infection urinaire représente selon les définitions actuelles environ 40% des infections nosocomiales. Il s'agit d'un véritable problème de santé publique qui intéresse tous les acteurs.

Une infection urinaire est dite nosocomiale lorsqu'elle est acquise dans une structure de soins (sans exclusive) ou d'une manière plus générale reliée à la prise en charge du patient. L'origine des bactéries nosocomiales est endogène (flore du patient) dans les deux tiers des cas.

Le germe isolé le plus souvent est un *Escherichia Coli*, mais la flore se modifie et la distribution écologique est en perpétuelle évolution (**Tableau 01**). Malgré leur caractère habituellement bénin, ces infections nosocomiales ont néanmoins un retentissement sur la mortalité hospitalière, elles augmentent la durée d'hospitalisation de 2,5 jours en moyenne et représentent pour leur traitement une part importante du budget antibiotique.

Elles représentent le deuxième motif de consultation en pathologie infectieuse (après les infections respiratoires), et la première cause d'infection nosocomiale (50%). 1 à 3% des enfants font une infection urinaire avant l'âge de 11ans, avec une prépondérance féminine globale. *Escherichia coli* est responsable de 2/3 des infections urinaires, les autres germes les plus fréquents sont : *Proteus*, *Klebsiella*, *Staphylocoque* et *Entérocoque* (**Anglaret et al., 2002**).

Tableau 01: Les infections bactériennes et leurs agents causals. (**Petignat et al., 2006**)

Nom d'agent causal	Infection (s)
<i>Staphylococcus aureus</i> (Staph. doré)	infection de plaies, septicémie, infection osseuse, Arthrite, Ostéomyélite ...
<i>Escherichia coli</i>	pneumonie, infection urinaire...
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	pneumonie, septicémie ...

5.2. Les septicémies

Elles représentent 45 à 55 % des infections sévères en niveau II et III (< 3 % en niveau I) et les pneumopathies 16 à 30 % des infections sévères en niveau III (5 à 15 % en niveau II et I). Dans une étude de prévalence récente en unité de soins intensifs les infections se répartissaient en 52,6 % de septicémies, 12,9 et 8,6 % d'infections respiratoires basses ou hautes et 8,6 % d'infections urinaires.

Les septicémies sont de diagnostic aisé en cas d'hémoculture positive à un pathogène non résident habituel de la peau normale. En cas de staphylocoque coagulase négative le diagnostic est posé devant l'association à des symptômes d'un autre critère : soit une deuxième hémoculture positive au même germe, soit, si un cathéter intravasculaire est en place, la nécessité d'un traitement antibiotique adapté (**Lachassinne *et al.*, 2004**).

5.3. Les infections du site opératoire

La définition de ces infections est essentiellement clinique: écoulement purulent autour de la plaie ou du site d'insertion du drain, ou cellulite extensive à partir de la plaie. Les infections de la plaie opératoire (au-dessus ou au-dessous de l'aponévrose) et les infections profondes des organes ou des espaces sont identifiées séparément.

L'infection est en général acquise pendant l'intervention elle-même, avec une origine soit exogène (air, matériel médical, chirurgiens et autres soignants), soit endogène (flore cutanée ou flore présente sur le site opératoire ou, dans de rares cas, sang utilisé en préopératoire).

Les micro-organismes infectieux sont divers, et dépendent du type et de la localisation de l'intervention et des anti-infectieux reçus par le patient. Le principal facteur de risque est l'étendue de la contamination préopératoire (chirurgie propre, propre-contaminée, contaminée, sale), elle-même conditionnée par la durée de l'intervention et l'état général du patient.

Les autres facteurs en jeu sont la qualité de la technique chirurgicale, la présence de corps étrangers (drains compris), la virulence des micro-organismes, la présence d'une infection concomitante sur un autre site, la pratique du rasage préopératoire et l'expérience de l'équipe chirurgicale [2].

6. Les bactéries responsables des infections nosocomiales

Les germes nosocomiaux rencontrés sont souvent des bactéries. Elles sont dominées par les staphylocoques, les entérobactéries et les bactéries du genre *Pseudomonas*. Ces bactéries nosocomiales sont souvent caractérisées par leur multirésistantes, on les appelle des bactéries multirésistantes (BMR).

On peut distinguer deux types de bactéries peuvent être retrouvées dans l'environnement des patients :

6.1. Les bactéries commensales : présentes dans la flore normale des sujets en bonne santé.

Elles jouent un rôle protecteur significatif empêchant la colonisation par des microorganismes pathogènes. Certaines bactéries commensales peuvent provoquer une infection si les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies. Par exemple, les staphylocoques cutanés coagulase-négatifs provoquent des infections sur cathéter vasculaire et les *Escherichia coli* présentes dans l'intestin sont la cause la plus courante d'infection urinaire.

6.2. Les bactéries pathogènes : ont une virulence plus élevée et provoquent des infections (sporadiques ou épidémiques) quel que soit l'état immunitaire de l'hôte. Par exemple :

6.2.1 Les bacilles anaérobies à Gram positif : par exemple *Clostridium* provoquent la gangrène (**Fig02**).

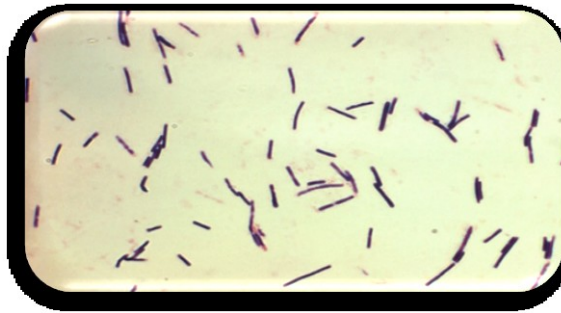


Figure 02 : observation microscopique de *Clostridium perfringens* (x100) [3].

6.2.2 Bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus* bactérie (**Fig 03**) cutanée qui colonise la peau et le nez du personnel hospitalier et des patients provoque une grande variété d'infections pulmonaires, osseuses, cardiaques et sanguines.

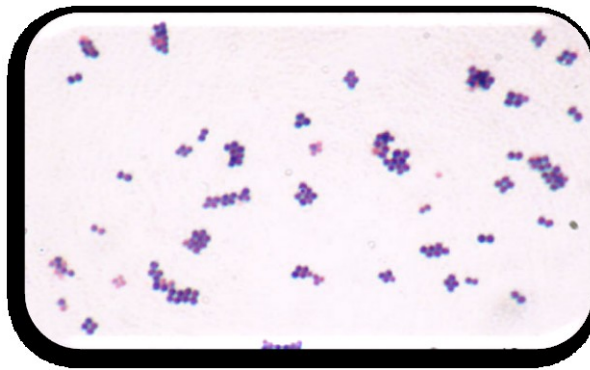


Figure 03 : observation microscopique de *Staphylococcus aureus* (x100) [4].

6.2.3 Bactéries à Gram négatif : les entérobactéries (par exemple *Escherichia coli* (**Fig 04**), *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia marcescens*) peuvent coloniser certains sites lorsque les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies.

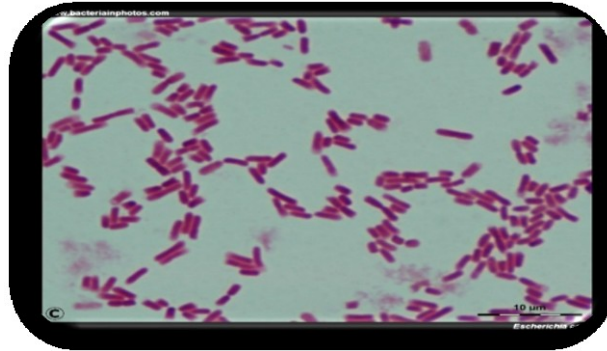


Figure 04: Observation microscopique d'*Escherichia coli* (x100) [5].

6.2.4 Les micro-organismes à Gram négatif: comme *Pseudomonas* spp (**Fig 05**) sont souvent isolés dans l'eau et les milieux humides. Ils peuvent coloniser les voies digestives des patients hospitalisés [2].

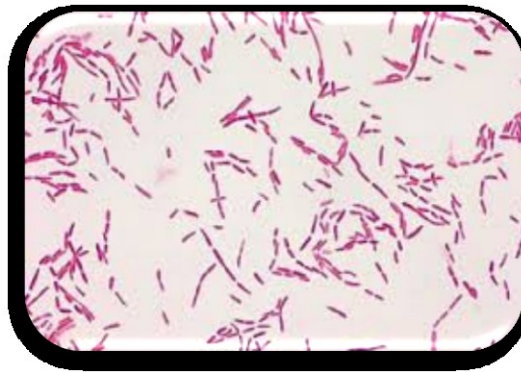


Figure 05 : Observation microscopique de *Pseudomonas aeruginosa* (x100) [6].

7. Prévention des infections nosocomiales

La prévention des infections nosocomiales nécessite un programme intégré, contrôlé, dont les éléments clés sont les suivants :

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

Chapitre I : Les infections nosocomiales

Tous les professionnels de santé: médecins, infirmiers, thérapeutes, pharmaciens, ingénieurs et autres, doivent être impliqués dans la lutte contre les infections nosocomiales [2].

1. Définition

A l'origine, le mot « antibiotique » désigne tout produit microbien qui, même à de très faibles concentrations, inhibe ou tue certains micro-organismes. On l'emploie maintenant dans un sens plus large qui inclut, en outre ; toute substance synthétique ou semi synthétique dotée de ces propriétés.

Les antibiotiques (ATB) peuvent être soit bactéricide, soit bactériostatique. Un ATB bactéricide à une certaine concentration peut s'avérer bactériostatique à concentration plus faible.

Dans certains cas, les ATB naturels (c'est à dire ceux qui sont produits par les microorganismes) ont été modifiés chimiquement en laboratoire. On a ainsi obtenu des ATB semi-synthétique dont le spectre d'activité diffère de celui du composé d'origine (**Singleton, 2004**).

2. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques ont la propriété d'interférer directement avec la prolifération des micro-organismes à des concentrations tolérées par l'hôte.

Les mécanismes d'action des antibiotiques sont très variables (**Fig 06**). Ils sont plus ou moins spécifiques de certaines familles bactériennes. Les antibiotiques naturels utilisés en thérapeutique sont produits par des bactéries ou des mycètes. Les antibiotiques synthétiques sont habituellement des analogues ou des dérivés d'antibiotiques naturels (**Rahal, 2013**).

2.1. Les antibiotiques agissant sur la paroi

La plupart des antibiotiques agissant sur la paroi des bactéries sont en réalité des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane, polymère formant la paroi des bactéries. Ils cassent alors cette paroi pour tuer la bactérie, ils sont donc des antibiotiques bactéricides. Parmi ces antibiotiques, on trouve les β -lactamines, les glycopeptides et les fosfomycine.

Exemple :

- Les β -lactamines, qui inhibent la transpeptidase intervenant dans la synthèse de la paroi.
- Les glycopeptides, qui se lient à un intermédiaire de synthèse du peptidoglycane.
- La fosfomycine inhibe la synthèse de précurseurs de la paroi [7].

2.2. Les antibiotiques agissant sur la membrane plasmique

La polymyxine B et colistine sont deux antibiotiques qui agissent sur la membrane, en perturbant la synthèse de celle-ci. Ils sont actifs sur les bacilles Gram-.

Exemple :

Les polymyxines, agissent comme des détergents cationiques, grâce à leurs caractères amphipathique, elles pénètrent dans la cellule bactérienne et s'insèrent parmi les phospholipides de la paroi, perturbant la perméabilité membranaire [8].

2.3. Les antibiotiques qui effectuent une inhibition de la synthèse protéique

C'est le cas par exemple des tétracyclines, aminosides, chloramphénicol, macrolides, acide fusidique, linézolide. Ceux-ci se fixent sur des constituants spécifiques du ribosome bactérien, ils empêchent ou gênent la traduction des ARNm (une "copie" d'un gène, destinée à être lue par les ribosomes pour permettre la synthèse d'une protéine) donc la formation de nouvelles protéines.

Exemple :

- Macrolides, Lincosamides, Streptogramines, Phenicole, Oxazolidinones: inhibent la sous-unité 50S.
- Tétracyclines, aminoglycosides : inhibent la sous-unité 30S [7].

2.4. Les antibiotiques qui inhibent la synthèse ou le fonctionnement des acides nucléiques

Les Rifampicines, Sulfamides, Quinolones et Triméthoprimes inhibent la synthèse ou même le fonctionnement des acides nucléiques de différentes façons selon les familles d'antibiotiques:

- Ansamycines : inhibe l'ARN polymérase.
- Quinolones et fluoroquinolones : Inhibent l'ADN Gyrase et de la topoisomérases [7].
 - Inhibition de la réplication de l'ADN.
 - Inhibition de la transcription / ARN polymérase.
 - Diminution de la synthèse des précurseurs nucléotidiques.

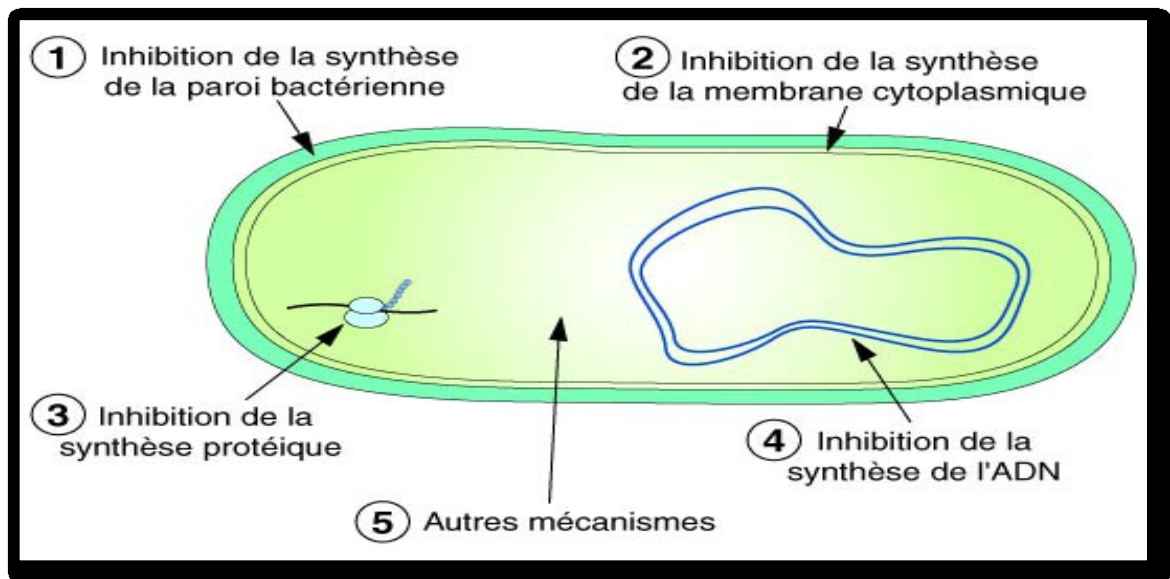


Figure 06: Principaux mécanismes d'actions des antibiotiques [9].

3. Critères de classification

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères différents:

3.1. Selon l'effet

- **Antibiotiques bactéricides** : (mort bactérienne) en fonction des concentrations, des temps de contact et du mode d'action de l'antibiotique exemple: (Béta-lactamines, Rifamycine...).
- **Antibiotiques bactériostatiques** : inhibition de la croissance bactérienne exemple: Cycline, phénécôlés (Claude, 2005).

3.2. Selon le spectre (Tableau 02)

- **Antibiotiques à large spectre** : Aminoglycosides, Sulfamide, Cycline, Quinolone...
- **Antibiotiques à spectre étroit** : Pénicilline... (Claude, 2005).

3.3. Selon l'origine

- **Antibiotiques naturels** : Pénicilline, Streptomycine.....
- **Antibiotiques semi synthétiques** : Bétalactamines.
- **Antibiotiques synthétiques** : sulfamides (Claude, 2005).

Chapitre II : La résistance bactérienne aux antibiotiques

Tableau 02 : Les grandes familles d'antibiotiques et leurs spectre d'activité (Rahal, 2013).

Familles d'ATB	Cible	Spectre d'activité
Bétalactamines	La paroi	-Cocci Gram+
Fosfomycine		-Bacilles Gram+ (pénicilline M et G)
Glycopeptides		-Bacilles Gram-
		-Spectre large: cocci Gram+, bacilles Gram-
		-Spectre étroit.
		-Les bactéries Gram+ staphylocoques et entérocoques.
		-Traitement de la colite pseudome membraneuse.
Polymyxines	La membrane	-Actifs sur les bacilles à Gram-.
Gramicidines et tyrocidine		-Spectre étroit : bactéries à Gram+.
Aminosides	Le ribosome	-Spectre large
		-Cocci et bacilles Gram+ et Gram-, mycobactéries.
		-Toutes les bactéries anaérobies sont résistantes.
Phénécolés		-Spectre large y compris rickettsies et chlamydiae.
Tétracyclines		-Spectre large mais résistances fréquentes, actives sur les germes à développement intracellulaire.
Acide fusidique		-Spectre limité surtout utilisé comme anti staphylocoque.
Oxazolidinones	-Spectre limité aux Gram+.	
Quinolones	L'ADN Polymérase	-Spectre limité aux bactéries Gram- à l'exception des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
Fluoroquinolone		-Spectre large au <i>Pseudomonas</i> et aux bactéries à Gram- et Gram+ notamment les staphylocoques.
Produits nitrés		-Spectre large.
		-Spectre limité aux bactéries anaérobies (surtout les bacilles Gram-, les bacilles Gram+ sporulés).
Rifampicines		-Spectre large: <i>mycobactéries</i> cocci Gram+ et bactéries à Gram+, divers bacilles à Gram-.

		-Sont actives sur les germes à développement intracellulaire
Sulfamides	La synthèse de l'acide folique	-Spectre large théoriquement large, mais résistances fréquentes.
Triméthoprimes		-Spectre large -résistances beaucoup -moins fréquentes

4. La résistance bactérienne aux antibiotiques

4.1. Définition

La résistance aux antibiotiques est l'aptitude d'un micro-organisme à survivre et à se reproduire lorsqu'il est exposé à ces molécules qui, normalement, le détruisent ou l'empêchent de se multiplier. Elle se distingue par son mécanisme et son support génétique. Parfois, la résistance à un antibiotique confère de la résistance à un autre antibiotique, et c'est ce que l'on appelle la résistance croisée. Les bactéries sont dites multi-résistantes lorsqu'à la suite d'une accumulation de résistances, elles ne sont sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques, elles sont alors résistantes à plusieurs antibiotiques (**Anssour, 2016**).

4.2. Origine génétique de la résistance et modalités de transfert génétique

La résistance bactérienne à un antibiotique est d'origine génétique. Les gènes de résistance se trouvent soit dans le chromosome (résistance chromosomique), soit dans un élément mobile, comme les plasmides, les éléments transposables ou les intégrons (résistance extra chromosomique) (**Sylvie, 2009**).

4.3. Types de résistance

Les bactéries deviennent résistantes aux antimicrobiens par différentes manières, quelques micro-organismes sont naturellement résistants mais d'autres, ont une résistance acquise.

4.3.1. Résistance naturelle

On parle de la résistance naturelle lorsque toutes les souches de la même espèce sont résistantes à un antibiotique donné. Ce type de résistance est détecté dès les premières études réalisées sur l'antibiotique afin de déterminer son activité et contribue à définir son spectre antibactérien. Cette résistance peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique, à une faible affinité de la cible pour l'antibiotique ou encore à l'absence de la cible. Par exemple, la résistance des entérobactéries et du *Pseudomonas* aux macrolides ou des bactéries

à Gram négatif à la vancomycine est naturelle. La résistance bactérienne naturelle est permanente et d'origine chromosomique. La résistance naturelle est stable, transmise à la descendance (transmission verticale) lors de la division cellulaire, mais elle n'est généralement pas transférable d'une bactérie à l'autre (transmission horizontale) (**Meziani, 2012**).

4.3.2. Résistance acquise

Les bactéries peuvent développer de la résistance à un antibiotique préalablement sensible, ce qui implique des changements génétiques. Cette résistance est souvent instable. Ces changements peuvent être de deux types : soit une mutation spontanée, soit l'acquisition de gènes par un autre micro-organisme.

A) Mutation chromosomique spontanée (évolution verticale)

La mutation chromosomique spontanée constitue un mécanisme de résistance aux antibiotiques chez environ 10 à 20 % des bactéries. Les gènes de résistance se situent alors dans le chromosome de la bactérie. Une mutation n'affecte qu'un caractère, et la résistance ne concerne généralement qu'un antibiotique ou qu'une famille d'antibiotiques ayant le même mécanisme d'action. L'utilisation d'une association de deux ou de plusieurs antibiotiques semble pouvoir prévenir l'émergence de mutants résistants. Par exemple, la résistance à la rifampicine et aux quinolones résulte toujours d'une mutation (**Sylvie, 2010**).

B) Acquisition de gènes de résistance par un autre organisme (évolution horizontale)

La résistance bactérienne par acquisition d'information génétique exogène représente la majorité des cas isolés en clinique et s'observe aussi bien chez les bactéries à Gram positif qu'à Gram négatif. L'acquisition de nouveau matériel génétique peut se faire soit par échange direct de matériel chromosomique, soit par échange d'éléments mobiles. Dans ce dernier cas, les gènes de résistance se trouvent dans un fragment d'ADN bactérien situé à l'extérieur et sur certains éléments mobiles du chromosome, tels les plasmides. Cette forme de résistance est transférable d'une bactérie à l'autre et même à des bactéries d'espèces différentes. Le transfert d'un seul plasmide augmente aussi le risque d'une résistance à plusieurs médicaments. Par exemple, *Shigella*, responsable de la diarrhée, peut transférer un plasmide avec résistance à quatre ou cinq antibiotiques différents (**Sylvie, 2010**).

5. Les principaux mécanismes de résistance (Tableau 03)

5.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

Il existe de nombreuses enzymes qui détruisent l'antibiotique par divers mécanismes chimiques (hydrolyse, acétylation, phosphorylation....), ces enzymes peuvent être encodées dans des gènes chromosomiques ou plasmidiques. Certains de ces enzymes sont inductibles. On appelle inductible une résistance qui se produit à la suite d'une exposition à un agent d'une classe pharmacologique donnée et constitutive lorsque les gènes à l'origine de la résistance s'expriment en permanence, même en l'absence de tout antibiotique exemple: β lactamase (**Rahal ,2013**).

5.2. Modification de la cible

Ce type de la résistance se produit lorsqu'une bactérie contourne le mode d'action de l'antibiotique. Elle peut alors posséder une version modifiée de la cible d'un antibiotique, ou acquérir une voie métabolique complète pour contourner l'effet de l'antibiotique (**Bennabou, 2012**).

Les cibles subissent des mutations entraînant l'apparition d'une nouvelle cible non reconnue par l'antibiotique. À cause d'une moindre affinité, l'efficacité sera réduite, c'est-à-dire les bactéries s'adaptent en synthétisant des récepteurs modifiés qui ne fixent plus l'antibiotique. Voici quelques exemples de ce mécanisme de résistance:

- Altération des protéines de liaison aux pénicillines (PLP) aussi connues sous PBP (PenicillinBindingProtein)

Ce phénomène réduit l'affinité de la cible (PLP) pour les β -lactamines. Soit par une mutation des gènes chromosomiques, soit par l'acquisition des gènes supplémentaires exprimant de nouvelle PLP. Ce mécanisme de résistance est important chez les cocci à Gram positif, comme les *Staphylococcus aureus* et le *Streptococcus pneumoniae*, alors qu'il serait beaucoup plus rare chez les bactéries à Gram négatif, la résistance par altération des PLP s'observe chez les espèces du genre *Neisseria* et, plus rarement, chez l'*Haemophilus influenzae*.

- Altération des précurseurs cibles de la paroi cellulaire bactérienne

Ce phénomène peut être induit par l'utilisation de la vancomycine, comme pour l'entérocoque résistant à la vancomycine.

- Altération des sites des liaisons ribosomiaux

L'altération cellulaire de la sous-unité ribosomale ciblée dans la bactérie peut atténuer les effets antibactériens des macrolides, des aminosides, ou du chloramphénicol. Cette

altération cause une inhabilité de la synthèse protéique de la croissance bactérienne pour les antibiotiques qui ne peuvent plus se lier au site ribosomal.

- Altération de l'ADN-gyrase et la topoisomérase

L'ADN gyrase est une enzyme de la famille des ADN topoisomérases de classe II. Des mutations spontanées d'un seul acide aminé de l'ADN gyrase en gendre de la résistance. Il en est de même pour les topoisomérase IV (**Bennabou ,2012**).

5.3. Modification de l'ARN polymérase

Les mutations qui vont porter sur la chaîne β de l'ARN polymérase confèrent aux bactéries qui la portent une résistance aux rifampicines (**Bennabou ,2012**).

5.4. Modification des enzymes impliquées dans la synthèse des folates

Des modifications au niveau de la dihydroptérate synthétase(DHPS) procurent aux bactéries une résistance aux sulfamides, de même que les modifications au niveau de la dihydrofolate réductase(DHFR) leur procurent une résistance au triméthoprimes (**Bennabou ,2012**).

5.5. Imperméabilité membranaire

Par diminution quantitative ou modification des porines (canaux de pénétration des antibiotiques à travers la membrane externe de la bactérie) provoquant la résistance par défaut de pénétration passive de l'antibiotique (**Rahal, 2013**).

5.6. Efflux actif

Ce sont des protéines qui agissent comme des pompes insérées dans la membrane cytoplasmique et externe, elles expulsent les antibiotiques dans le milieu extérieur en utilisant l'énergie produite par la membrane cytoplasmique.

Les mécanismes d'efflux peuvent être spécifiques d'un antibiotique ou d'une classe thérapeutique (ex : protéine CmlA qui excrète les phénécólés) ou se comporter comme des systèmes de résistance multiple conférant une résistance plusieurs groupes d'antibiotiques (**Rahal, 2013**).

Tableaux 03 : Les différents mécanismes de résistance (Sylvie, 2010).

Mécanisme de résistance	Conséquence
Inhibition enzymatique	- Production d'une enzyme qui inactive ou détruit l'antibiotique ; Mécanisme de résistance 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 liaison ciblés par l'antibiotique	- Baisse de l'affinité de l'antibiotique pour son site d'action.
Pompes à efflux	- Antibiotique éjecté de la cellule par transport actif et site d'action devenant inaccessible.

6. Les bactéries multirésistantes (BMR)

Les bactéries multirésistantes (BMR) sont des bactéries qui, du fait de l'accumulation de résistance naturelle et acquises, ne sont plus sensibles qu'à un nombre réduit d'antibiotiques parmi la gamme de molécule habituellement actives en thérapeutique.

Les BMR connaissent actuellement une émergence mondiale, aussi bien en milieu communautaire qu'hospitalier (Rahal, 2013).

Parmi les bactéries impliquées dans les infections communautaires :

6.1. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM)

Bactéries commensales douées d'un fort pouvoir pathogène chez l'homme, les SARM sont caractérisées par une diffusion clonale en milieu hospitalier et depuis quelque temps, en milieu communautaire.

En effet, longtemps confinés dans le rôle de bactéries nosocomiales, les SARM ont émergé au sein de la communauté, causant des infections souvent spectaculaires chez des patients jeunes et immunocompétents (Rahal, 2013).

6.2. Les entérobactéries multirésistantes

Ce sont bactéries commensales douées de plusieurs mécanismes de résistance aux antibiotiques et qui posent des problèmes thérapeutiques quand elles sont impliquées dans des infections, surtout à l'hôpital. Certaines d'entre-elles sont sensibles à l'état sauvage (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Salmonelles*.) mais ils ont acquis des gènes de résistances portés par des plasmides ou transposants. D'autres ont, à l'état sauvage des résistances naturelles, qu'elles associent à des résistances acquises par mutation ou par des gènes plasmidiques ou transposoniques (Rahal, 2013).

6.3. *Pseudomonas aeruginosa* Multirésistant (PAR)

C'est, à l'instar des autres BMR à Gram négatif, une bactérie saprophyte pathogène opportuniste possédant de nombreuses résistances naturelles et acquises faisant d'elle un microorganisme difficile à éradiquer.

Elle est impliquée dans les infections urinaires sur sonde à demeure, les infections respiratoires sur respirateur, les différentes formes de sepsis surtout sur terrain fragilisé (brulé, polytraumatisé, diabétique.), les suppurations de plaies d'amputation.etc.

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques de cette bactéries sont souvent intriqués et difficiles à déterminer (**Rahal, 2013**).

1. Définition

Le terme « biocide » est composé du préfix « bio » du grec ancien « *bios* » qui signifie la vie, et l'existence du suffixe « cide » du latin « *caedo* » qui exprime l'idée de tuer (Gefflot, 2014).

Les biocides désignent une famille de substances développées pour détruire, repousser ou rendre inoffensives des espèces nuisibles ou, plus exactement, considérées comme telles par les humains. Cette catégorie réunit des substances aussi diverses que les désinfectants, les agents conservateurs ou les produits antiparasitaires (Chèvre *et al.*, 2011).

2. Classification des biocides

L'activité antibactérienne des biocides est déterminée par leur réactivité chimique avec certaines fonctions organiques. Les biocides ne font aucune sélection entre les groupements libres et ceux liés à la cellule. De plus, selon les concentrations utilisées, ils ont un effet différent. Ces agents antimicrobiens peuvent être classés en deux groupes (Tableau 04):

2.1 Les produits non létaux mais seulement inhibiteurs de croissance (agissant à faibles concentrations)

L'effet bactériostatique sera observé, empêchant la multiplication et la reproduction des bactéries. Il dépend essentiellement du temps de contact. Ils comprennent essentiellement les métaux (mercuriels, dérivés du cuivre, du zinc, de l'argent...) et les colorants.

2.2 Les produits potentiellement létaux (agissant à des fortes concentrations)

L'effet bactéricide sera observé, éliminant les microorganismes. La prolifération des bactéries est stoppée mais celle-ci reprendra dès que les conditions défavorables auront disparues. Certaines bactéries peuvent former des spores et résister ainsi aux conditions défavorables à leur développement. Ce groupe se divise en deux catégories :

2.2.1 Des composés chimiquement stables à action plus spécifique

Ce groupe comprend entre autres les ammoniums quaternaires, les dérivés phénoliques, la Chlorhexidine et ses dérivés.

Chapitre III : L'activité antibactérienne des biocides

2.2.2 Les composés chimiquement très réactifs

Tels que l'eau oxygénée, les halogénés, les acides et bases fortes, les aldéhydes, se caractérisant par une action brutale, rapide, temporaire et souvent non spécifique (**Allion, 2004; Putois, 2012**).

Tableau 04: Aperçu de mécanismes d'action de quelques biocides et de leur utilisation. (**Mounier et al, 2009**).

Famille	exemples	mécanisme	Utilisations/spécificités
Alcools	Ethanol isopropanol	Dénaturation des protéines (en présence d'eau) = interférence avec le métabolisme et lyse cellulaire	Seul ou associé (favorise l'évaporation) Conservateur Inflammable Antiseptie Désinfection
Aldéhydes	Glutaraldéhyde	Interaction avec les peptides des parois, inhibition du transport des métabolites, des acides nucléiques et de la synthèse des protéines	Désinfection du matériel thermosensible Toxique, usage limité
Biguanides	Chlorhexidine	Diffuse jusqu'à la membrane cytoplasmique pour favoriser la fuite des constituants cellulaires À concentrations élevées : coagulation du cytoplasme	Antiseptiques Conservateurs
Halogénés	Dérivés chlorés (eau de javel)	Oxydant Dénaturation des protéines Inactivation d'acides nucléique Sporicide par action létale sur le cortex	Désinfection
	Dérivés iodés (povidone iodée)	Oxydant À faible concentration : actif sur les protéines, les acides nucléiques et les acides gras	Antiseptie

Chapitre III : L'activité antibactérienne des biocides

Phénols	Phénol Thymol Bis phénol (Triclosan)	Dénaturation des protéines et de la membrane cytoplasmique À faible concentration : inhibition de la synthèse enzymatique	Désinfectant Conservateur
Oxydants	Eau oxygénée Acide peracétique	Radicaux libres (OH) : action sur les composés cellulaires essentiels (lipides, protéines, acides nucléiques) Dénaturation des protéines et des enzymes, augmentation de la perméabilité cellulaire (fuite des composés intracellulaires)	Spectre limité car inactivation par les enzymes types catalase ou peroxydases Désinfection du matériel Thermosensible
Ammoniums quaternaires	Cétrimide Chlorure de benzalkonium.	Diffusion plus ou moins facile au travers des parois pour atteindre la cible : membrane cytoplasmique : action cytolytique Activité dépend du pH, de la température, de la concentration, du temps de contact, de l'inoculum bactérien. . .	Action détergente et désinfectante

Compte tenu des finalités d'application choisies dans ce travail, nous nous intéresserons plus particulièrement au deuxième groupe de produits : les produits létaux non spécifiques.

2.2.2.1 Les oxydants

Les agents Oxydants les plus utilisés sont l'ozone (O₃), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'acide peracétique (CH₃-CO-O-OH). Leur mode d'action est basé sur la libération d'oxygène entraînant l'oxydation des systèmes enzymatiques. Ainsi les agents

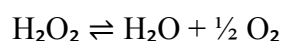
Chapitre III : L'activité antibactérienne des biocides

oxydants tel que l'acide peracétique, agissent sur les lipides, les liaisons sulfurées, les acides nucléiques et les systèmes enzymatiques. Ils entraînent une désorganisation de la membrane cellulaire.

Ces composés oxydant ont l'avantage de présenter un large spectre d'activité, une absence de résidus finaux, un faible pouvoir corrosif aux concentrations d'usage et ils sont facilement éliminables par rinçage. Ils sont cependant toxiques aux fortes concentrations et instables pendant leur stockage (Allion, 2004).

a) Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène ou l'eau oxygénée est un liquide incolore, commercialement vendu sous différentes concentrations (3 à 70 %). Il est considéré comme 'écologique' car il peut rapidement se dégrader en eau et oxygène; selon la réaction suivante :



Il est généralement utilisé comme agent d'oxydation. Grâce son potentiel d'oxydation élevé, il peut oxyder un grand nombre de composés organiques et minéraux (Putois, 2012).

b) Le mode d'action de peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est fréquemment utilisé comme biocide pour la désinfections, la stérilisation, ou comme antiseptique. Il inhibe la croissance et/ou inactive les microorganismes pathogènes comme les champignons, les virus, les bactéries, et les levures lorsqu'il est utilisé à des concentrations appropriées (Putois, 2012).

2.2.2.2 Alcools

L'éthanol, l'isopropanol et le n-propanol sont les alcools les plus couramment utilisés, particulièrement en Europe, ils sont généralement plus actifs sur les bactéries à Gram négatif que sur celles à Gram positif.

Leur efficacité bactéricide est favorisée en présence d'eau. Ces agents antimicrobiens perturbent le métabolisme bactérien en induisant des lésions au niveau de la membrane et par dénaturation des protéines. Leur activité est optimale pour une concentration en alcool comprise entre 60 et 90%. Ils sont souvent utilisés en synergie avec d'autres désinfectants, et en particulier avec la chlorhexidine (Allion, 2004).

a) Ethanol (C₂H₆O)

L'alcool éthylique possède un spectre antibactérien large et rapide; ce produit est bactéricide vis à vis d'un grand nombre d'espèces bactériennes à Gram positif et négatif. Il semble que la concentration la plus efficace se situe autour de 70 % : une certaine hydratation facilite, en effet, la pénétration de l'éthanol dans les cellules bactériennes. Mais l'alcool éthylique est très volatil, et s'évapore rapidement en laissant la peau sèche peu de temps après son application ; son activité antibactérienne est donc éphémère (**Fourtillan, 2012**).

b) Le mode d'action de l'éthanol

L'éthanol (de formule chimique C₂H₆O) est plus efficace contre la plupart des bactéries et des champignons ainsi que contre de nombreux virus (il est par contre inefficace contre les spores bactériennes). L'éthanol tue les organismes en dénaturant leurs protéines et en dissolvant leurs lipides.

L'alcool a pour inconvénient de brûler les plaies; il ne doit jamais être appliqué sur des muqueuses [10].

3. Les principales applications des biocides

3.1. Dans les établissements de soins de santé

Les biocides sont indispensables pour prévenir et contrôler les infections, les désinfectants sont utilisés pour décontaminer les surfaces, les instruments et la peau des patients et du personnel soignant. Généralement, plus le risque d'infection est élevé, plus la méthode de désinfection utilisée sera forte, tandis que les antiseptiques sont utilisés pour traiter les infections des plaies de surface.

3.2. Dans l'industrie alimentaire

On utilise communément des biocides pour désinfecter les installations et tout appareil qui entre en contact avec des denrées alimentaires. On s'en sert également dans des produits alimentaires comme agents conservateurs, et dans l'eau potable comme désinfectants.

3.3. Dans l'élevage du bétail

Les animaux eux-mêmes, leurs produits et tous les logements et les appareils utilisés sont généralement traités avec des biocides pour les décontaminer, empêcher la croissance de micro-organismes potentiellement nocifs et protéger les animaux contre les maladies.

3.4. Les stations d'épuration des eaux

On ajoute des biocides à l'eau traitée avant que celle-ci ne quitte la station afin d'éviter la diffusion d'organismes nuisibles dans l'environnement.

Parmi les autres applications industrielles de plus en plus courantes, on peut citer l'usage intensif de biocides dans les tours de refroidissement afin d'éviter la propagation des légionelles [11].

4. Facteurs affectant l'activité des biocides

L'activité des biocides est affectée par plusieurs facteurs: le pH, la concentration, le temps de contact, la capacité du biocide à diffuser à travers la membrane de la cellule cible, la présence des matières organiques interférentes, le type cellulaire, l'état physiologique du microorganisme (kystes ou spores) et les conditions de croissance des microorganismes (sessile, planctonique ou intracellulaire).

4.1. Influence du pH et de la concentration

La concentration et le pH font partie des facteurs les plus importants de l'activité des biocides. Pour que les microorganismes soient affectés, il faut que le biocide atteigne les cibles à concentration suffisante, dite efficace, pour induire des dommages cellulaires. Cela dépendra de la réactivité des biocides avec le milieu ou avec les polymères des cellules, et de leur capacité à diffuser à travers les membranes.

4.2. Influence du type cellulaire et de l'état physiologique

En effet, la membrane est l'une des premières cibles des biocides et, de ce fait, constitue une propriété intrinsèque de la résistance aux biocides puisqu'elle va agir comme une barrière imperméable qui va réduire l'entrée du biocide dans la cellule.

D'après la classification proposée par Russell et al en 1997, adaptée par Maillard, les prions seraient les microorganismes les plus résistants et les grands virus enveloppés (HIV) seraient les plus sensibles aux biocides. Cette classification a été établie sur la base de la composition des membranes cellulaires de ces microorganismes (Mogoa, 2010).

5. Mécanisme de résistance aux biocides

On peut différencier trois mécanismes de résistance aux biocides :

5.1. La résistance naturelle : propriété intrinsèque naturelle des microorganismes, qui correspondent au spectre théorique d'activité des biocides.

Chapitre III : L'activité antibactérienne des biocides

Elle est innée, immuable. Elle dépend du microorganisme et du produit. Elle entraîne l'inactivité totale ou partielle d'un produit ou le plus souvent d'une famille de produits.

5.2. La résistance acquise : résultante de l'acquisition de matériel génétique mobile ou de mutations qui entraîne une modification significative de la sensibilité par rapport aux souches sauvages.

Elle est imprévisible et a pour conséquence l'apparition au sein d'une espèce d'une (ou de quelques) souche(s) ayant une sensibilité diminuée vis-à-vis d'un principe actif.

5.3. L'adaptation à l'environnement : résultante d'organisations structurées des microorganismes (biofilms) qui les rendent inaccessibles aux agents antimicrobiens et qui, contrairement aux deux autres types de résistance, n'est pas transmissible à la descendance (**Mounier et al, 2009**).

Ce travail consiste à évaluer *in vitro* l'activité antibactérienne de deux biocides (le peroxyde d'hydrogène, et l'éthanol) vis-à-vis trois souches bactériennes responsables des infections nosocomiales en milieu sanitaire par la méthode de diffusion des disques et de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) en bouillon MH.

Il a été réalisé au niveau de laboratoire de microbiologie de l'université de 08 Mai 1945 de Guelma.

I. Matériel

1. Les souches bactériennes utilisées

Les germes utilisés sont des souches de référence ATCC. Elles ont été fournies par le laboratoire de bactériologie de l'hôpital Ibn Zohr Guelma, et constituent d'excellents modèles pour la recherche de l'effet antibactérien des substances naturelles ou de synthèses.

- *Escherichia coli* ATCC 25922 (bactérie à Gram négative).
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (bactérie à Gram négative).
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (bactérie à Gram positive).

Ces souches ont été conservées dans des géloses inclinées à 4°C.

2. Les caractères biologiques des souches testées

2.1 *Escherichia coli*

E.coli est une bactérie communément trouvée dans les intestins de mammifères, humains compris. Il en existe différentes formes dont certaines sont pathogènes, provoquant des infections intestinales, infections urinaires ou génitales.

Il s'agit d'un bacille Gram- en forme de bâtonnet (cylindrique), à une extrémité arrondie, uniformément coloré non sporulé. Il se présente soit seul ou regroupé le plus souvent par deux (diplobacille), très rarement rencontré en amas, mobile par ciliature péritriche, à catalase positif et oxydase négatif (**Delarras, 2007**).

2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

C'est une bactérie aérobie ubiquiste considérée comme pathogène opportuniste. Sa résistance supérieure aux autres bactéries vis-à-vis certaines désinfections peut conduire à sa présence lors d'infections en milieu hospitalier. Elle conduit à des surinfections graves (les infections des plaies, de l'utérus ou des poches gutturales.....).

P.aeruginosa ou bacille pyocyanique (bacille du pus bleu) se présente comme des bacilles à Gram-, non sporulés, très mobile grâce à un cil polaire, à oxydase et catalase positif (Delarras, 2007).

2.3 *Staphylococcus aureus*

S. aureus est une bactérie commensale de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux (rhino-pharynx, intestins). C'est le premier pathogène responsable d'infections nosocomiales, éliminé dans le milieu extérieur, cette bactérie peut survivre longtemps dans l'environnement.

S. aureus, espèce de *Staphylococcus* est comme tous les staphylocoques, une coque à Gram positif à catalase positive, et oxydase négatif, apparaissant en amas (grappe de raisin), Il est immobile, non sporulé et ne présente pas de capsule visible au microscope optique (Delarras, 2007).

3. Les milieux de culture

Selon les techniques employées, les milieux de culture utilisés sont les suivants:

- **Gélose nutritive (GN):** un milieu d'isolement non sélectif utilisé dans le but de repiquer la bactérie ou de la purifier, si elle est contaminée.
- **Le milieu Mueller Hinton (MH):** reconnu par tous les experts comme étant le milieu de référence pour l'étude de la sensibilité des germes aux ATB et toutes autres substances qui possèdent une activité antibactérienne comme «les biocides».
- **Le bouillon nutritif:** constitue un milieu d'utilisation générale pour un grand nombre de microorganisme ne présentant pas d'exigences particulières.
- **Le milieu de Chapman:** est le milieu sélectif des bactéries halophiles et plus particulièrement fermentant le mannitol. C'est un milieu semi-synthétique. Il est utilisé pour l'isolement des bactéries du genre *Staphylococcus*.

Chaque souche a été cultivée sur son milieu approprié

- Pour les bacilles à Gram-: *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, le milieu de culture utilisé est: la gélose nutritive.
- Pour les cocci à Gram+: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, le milieu de culture utilisé est celui de Chapman.

Les compositions des milieux de culture sont indiquées en annexe.

4. Les agents antibactériens testés

4.1 Les antibiotiques

Les antibiotiques utilisés sont : Gentamycine, Pénicilline, Vancomycine, Chloramphénicol, Erythromycine, Amoxiciline, et Céfotaxime.

4.2 Les biocides

Les biocides utilisés sont le peroxyde d'hydrogène (oxydant) et l'alcool éthylique (antiseptique); à différentes concentrations.

II. Méthode

1. Repiquage des souches bactériennes

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées (la méthode des stries), puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures, afin d'obtenir une culture jeune et des colonies bien isolées qui ont servi à préparer l'inoculum bactérien.

2. Test de sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques (Antibiogramme) a été réalisée avec la méthode classique de diffusion des disques d'antibiotiques en milieu Mueller-Hinton selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2013).

2.1 Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure de 18 h sur milieu d'isolement, des colonies parfaitement identiques et bien isolées ont été raclées à l'aide d'une anse de platine puis déchargées dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%, la suspension bactérienne est ensuite homogénéisée. Son opacité doit être équivalente à 0,5 McFarland ou à une D.O de 0,08 à 0,13 lue à 625 nm (**Meziani, 2012**).

NB: l'ensemencement a été effectué dans les 15 minutes qui ont suivi la préparation de l'inoculum.

2.2 Ensemencement de la gélose de l'antibiogramme par écouvonnage

Le milieu de culture gélosé Mueller Hinton (MH) a été coulé aseptiquement en surfusion, dans les boîtes de pétris.

Après refroidissement et solidification, un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne préparée, puis frotté sur la totalité de la surface gélosée de haut en bas, en stries serrées.

L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois, et en pivotant l'écouvillon sur lui-même. L'ensemencement est finalisé en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 30 minutes avant l'application des disques d'antibiotiques (**Courvaline, 2012**).

2.3 Application des disques d'antibiotique

Les disques d'antibiotiques ont été déposés sur les boîtes de Pétri, à l'aide d'une pince stérile. Pour chaque boîte de 90 mm de diamètre, un nombre ne dépassant pas 6 disques a été respecté. Les disques d'ATB ont été espacés de 24 mm, centre à centre, une fois appliqué, le disque n'a pas été déplacé.

Les boîtes ont été ensuite incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.

La liste des ATB a été testée selon la bactérie isolée (**Courvaline, 2012**).

● **Pour *E.coli*:** Gentamycine, Pénicilline, Vancomycine, Chloramphénicol, Erythromycine, Amoxiciline, et Céfotaxime.

● **Pour *S.aureus*:** Gentamycine, Pénicilline, Vancomycine, Chloramphénicol, Erythromycine, Amoxiciline, et Céfotaxime.

● **Pour *P.aeruginosa*:** Gentamycine, Pénicilline, Vancomycine, Chloramphénicol. Les antibiotiques testés pour chaque souche bactérienne étudiée sont représentés dans le tableau ci-après.

Tableau 05: Listes des antibiotiques utilisés pour l'évaluation de l'antibiorésistance (CA-SFM, 2013).

Antibiotique	Famille	Code	Charge du disque
Chloramphénicol	Phénicol	C	30µg
Céfotaxime	β-lactamine	CTX	5µg
Gentamicine	Aminoside	CN	30 µg
Erythromycine	Macrolide	E	15 µg
Vancomycine	Glycopeptide	VA	30 µg
Pénicilline G	β-lactamine	P	10 µg
Amoxiciline	β-lactamine	AMC	30µg

2.4 Lecture interprétative

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition, qui se fait en millimètre avec précision à l'aide d'un pied à coulisse métallique ou d'une règle double

décimètre à l'extérieur de la boîte fermée, puis ils sont comparés aux diamètres conformément aux normes CASFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie). Il convient de noter toutefois, qu'une souche dont la sensibilité aux antibiotiques est ainsi évaluée peut être déclarée sensible, intermédiaire ou résistante (Fauchère, 2002).

3. Etude de l'activité antibactérienne des biocides

Ce travail consiste à évaluer l'activité antibactérienne des biocides (le peroxyde d'hydrogène, et l'éthanol) *in vitro* vis-à-vis des différentes souches bactérienne par la méthode de diffusion des disques puis de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) en bouillon MH.

3.1 Méthode de diffusion en gélose

3.1.1 Principe

Cette méthode permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des biocides par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque de papier whatman imprégné par les différentes dilutions de la solution à tester. (Fig 07).

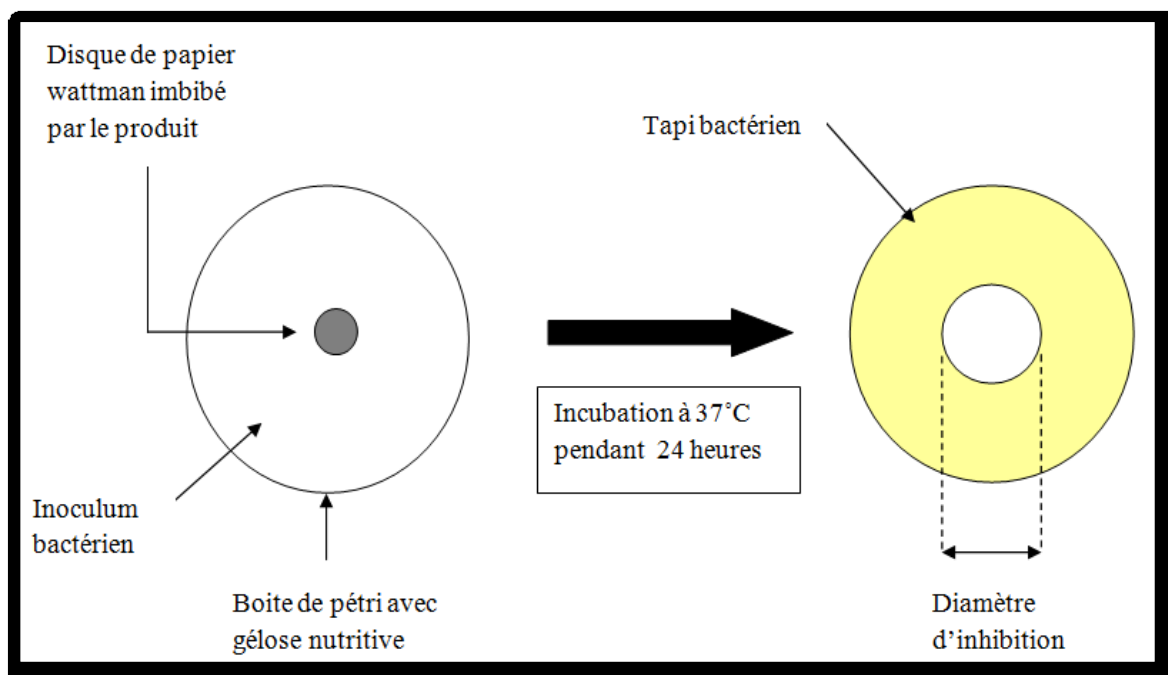


Figure 07: Principe de la méthode de diffusion par disque.

3.1.2 Préparation des disques

Les disques sont fabriqués à partir de papier Wattman (ou autre type de papier buvard), avec un diamètre de 5.5 mm suivant le diamètre de l'emporte pièce. Par la suite

ils sont mis dans un tube à essai (ou plus si nécessaire), et stérilisés à l'autoclave à 120 °C pendant 15 minutes.

Les disques sont imbibés de quelques gouttes des produits à tester dans notre cas, de peroxyde d'hydrogène (l'eau oxygénée), et l'éthanol.

3.1.3 Préparation de l'inoculum

Tout comme pour l'antibiogramme, à partir d'une culture ayant au maximum 24 heures, des colonies ont été prélevées et submergées dans de l'eau physiologique stérile à 0.9% (l'opacité doit être équivalente à 0.5 McFarland). L'ensemencement a été effectué dans les 15 minutes qui ont suivi la préparation de l'inoculum.

3.1.4 L'ensemencement

Le milieu Mueller-Hinton est fondu et ramené en surfusion puis coulé dans des boîtes de pétri. Après solidification, la surface de la gélose estensemencée par écouvillonnage avec l'inoculum.

3.1.5 Dépôts des disques

Après ensemencement, six disques de papier whatman stériles imbibés séparément par les différentes dilutions du peroxyde d'hydrogène et d'éthanol (**Tableau 06 et 07**), sont placés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérile.

Deux témoins négatifs, imprégné avec 1 ml d'eau distillée stérile, ont été déposés à la surface de la gélose contenant les souches testées.

Les boîtes sont fermées et incubées à une température ambiante pendant 30 min pour permettre la diffusion des biocides. Ensuite, elles sont mises à l'étuve à une température de 37°C pendant 24 heures. Pour chaque biocide deux essais sont réalisés.

Tableau 06: Les dilutions de peroxyde d'hydrogène H₂O₂.

N° de tube	Concentration de H ₂ O ₂ (%)
1	30
2	27
3	24
4	21
5	18
6	15

Tableau 07: Les dilutions de l'éthanol C₂H₆O.

N° de tube	Concentration de C ₂ H ₆ O (%)
1	96
2	86.4
3	76.8
4	67.2
5	57.6
6	48

3.1.6 Lecture

La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre d'inhibition, caractérisé par une zone n'ayant aucune croissance bactérienne autour du disque, à l'aide d'un pied de coulisse ou d'une règle en (mm).

3.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice(CMI) en milieu liquide

La concentration minimale inhibitrice(CMI) est la plus faible concentration de la substance pour laquelle il n'ya pas de croissance visible à l'œil nu après un temps d'incubation de 18 à 24 h. Sa détermination a été faite par observation du trouble induit la croissance des germes étudiés dans chaque tube (**Toty et al. 2013**).

Elles consistent à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations décroissantes de biocides selon les étapes suivantes:

3.2.1 Préparation de l'inoculum

Après incubation de la suspension de 0,5 McFarland pour chaque souche bactérienne à 37° pendant 24 h dans un incubateur/agitateur jusqu'à ce qu'elle devienne trouble; des dilutions en série de l'inoculum, de la dilution 10⁻¹ à la dilution 10⁻⁴ ont été réalisées en bouillon Mueller-Hinton.

NB: La turbidité peut être diminuée en ajoutant plus de bouillon ou augmentée en ajoutant plus de suspension bactérienne.

3.2.2 Préparation de la gamme

A. Pour le peroxyde d'hydrogène H₂O₂

Une série de huit dilutions, allant de 30%, jusqu'à 9% a été réalisée (**Tableau 08**).

B. Pour l'éthanol C₂H₆O

Une série de dix dilutions, allant de 96 %, jusqu'à 9.6 % a été réalisée (**Tableau 08**).

Tableau 08 : Détermination de la CMI avec les différentes dilutions.

N° de tube	Concentration de H ₂ O ₂	Concentration de C ₂ H ₆ O
	(%)	(%)
1	9	9.6
2	12	19.2
3	15	28.8
4	18	38.4
5	21	48
6	24	57.6
7	27	67.2
8	30	76.8
9	/	86.4
10	/	96

/ : Non effectuer.

Pour chaque suspension bactérienne (10⁻⁴ pour *P.aeruginosa*, *E. coli* et 10⁻² pour *S.aureus*) un volume de 1 ml a été répartie dans chaque tube avec 1ml de chaque dilution des deux biocides testés séparément.

Après incubation à 37°C pendant 24h, la CMI est déduite à partir du premier tube de la gamme dépourvu de croissance bactérienne (premier tube clair).

NB: La gamme établie à partir de la suspension bactérienne utilisée comme inoculum (10⁻¹,10⁻²,10⁻³,10⁻⁴) estensemencée sur un milieu solide (MH) sous forme des stries individuelles, puis incubée pendant 24 h à 37°C.

3.3 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La concentration minimale bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en biocide capable de tuer 99,9% de l'inoculum bactérienne initial (soit moins de 0,01% de survivants). Elle est réalisée à partir de chacun des tubes qui ont permis de déterminer la CMI. Elle consiste à ensemencer de chacun des tubes sur un milieu solide (MH) sous forme des stries individuelles puis à incuber les boites de pétri à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Chapitre IV : Matériel et méthodes

Après incubation, le nombre de colonies apparues sur chacune des stries est comparé au nombre de colonies observées sur le strie (10^{-4}).

I. Résultats

1. L'antibiogramme

Tous les résultats obtenus concernant la détermination de la sensibilité des souches bactériennes concernées par cette étude, aux antibiotiques précités dans la section méthode sont résumés dans la **Figure 08** et le **Tableau 09**.

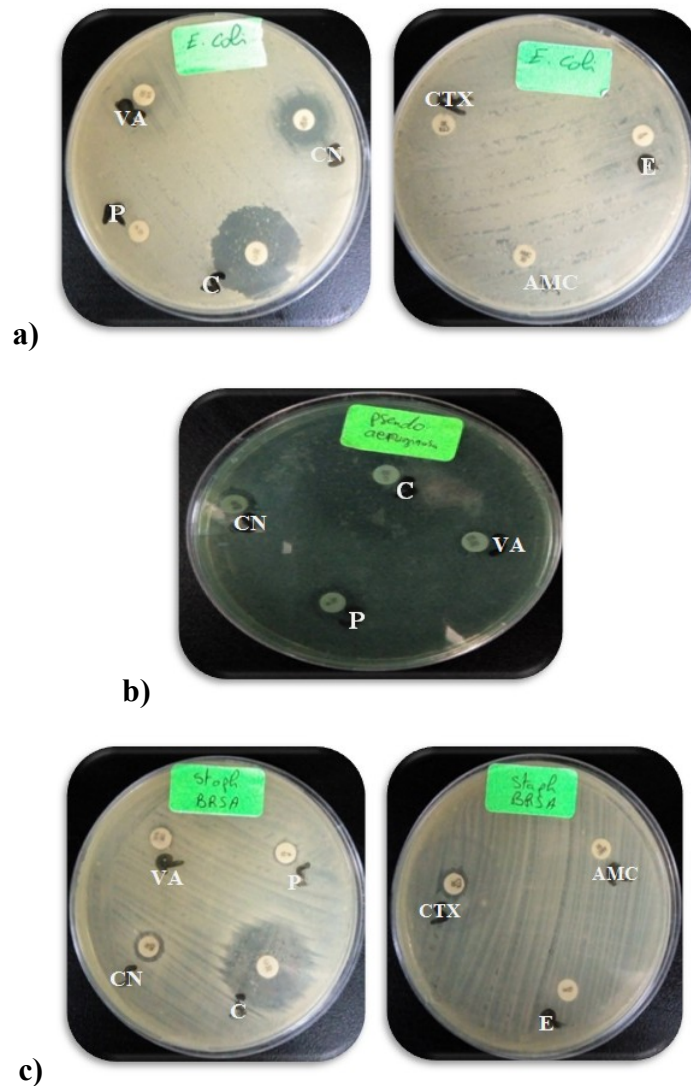


Figure 08: AntibioGramme des souches a) *E.coli* b) *P.aeruginosa* c) *S aureus*.

Les souches *E.coli* et *S.aureus* ont montré une sensibilité à deux antibiotiques seulement (Gentamycine, chloramphénicol) pour *E.coli*, et (Chloramphénicol, Céfotaxime) pour *S.aureus*.

Concernant *P.aeruginosa* on observe que cette souche présente une multirésistance aux quatre antibiotiques (Gentamycine, pénicilline, vancomycine, chloramphénicol).

Chapitre V: Résultats et discussion

Tableau 09: Résultat de l'antibiogramme pour les trois souches.

Antibiotique	Charge du disque (μg)	<i>E.coli</i>		<i>P.aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
		Diamètre (mm)	Catégorie clinique	Diamètre (mm)	Catégorie clinique	Diamètre (mm)	Catégorie clinique
VA	30	-	R	-	R	-	R
CN	30	19	S	-	R	-	R
C	30	25	S	-	R	27	S
P	10	-	R	-	R	-	R
CTX	5	-	R	-	R	10	S
AMC	30	-	R	-	R	-	R
E	15	-	R	-	R	-	R

(-): aucune zone d'inhibition. **R:** Résistante. **S:** Sensible.

2. Résultat de l'évaluation de l'activité antibactérienne des biocides

2.1 Méthode de diffusion en gélose

Les **Tableaux 10** et **11**; ainsi que les **Figures 09** et **10** représentent les diamètres (mesurés à l'aide d'une règle) des zones d'inhibition propre à chaque échantillon utilisé, à savoir le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'éthanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$).

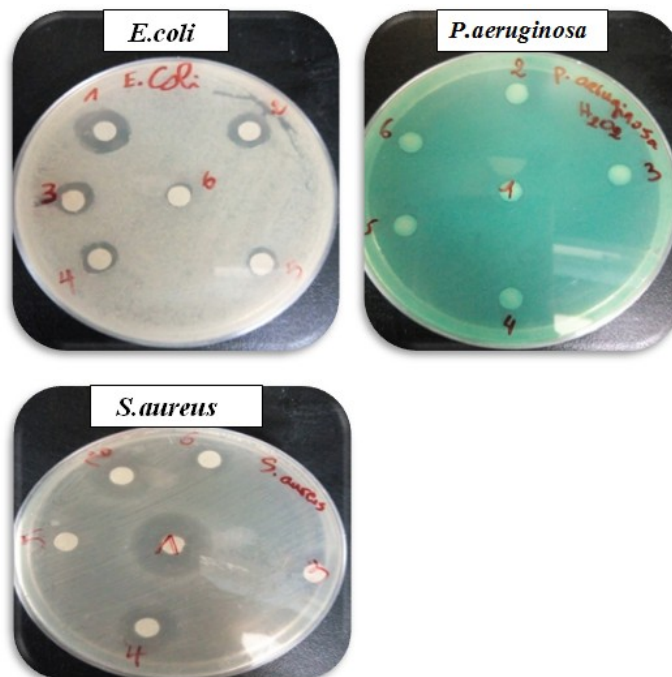


Figure 09: L'effet de l' H_2O_2 sur *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*.

Chapitre V: Résultats et discussion

Tableau 10: Diamètre de la zone d'inhibition de H₂O₂ à différentes concentrations.

Numéro de disque	Concentration de H ₂ O ₂ (%)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)		
		<i>E. coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>
1	30	14	12	20
2	27	12	08	16
3	24	11	06	16
4	21	09	–	15
5	18	09	–	10
6	15	08	–	09

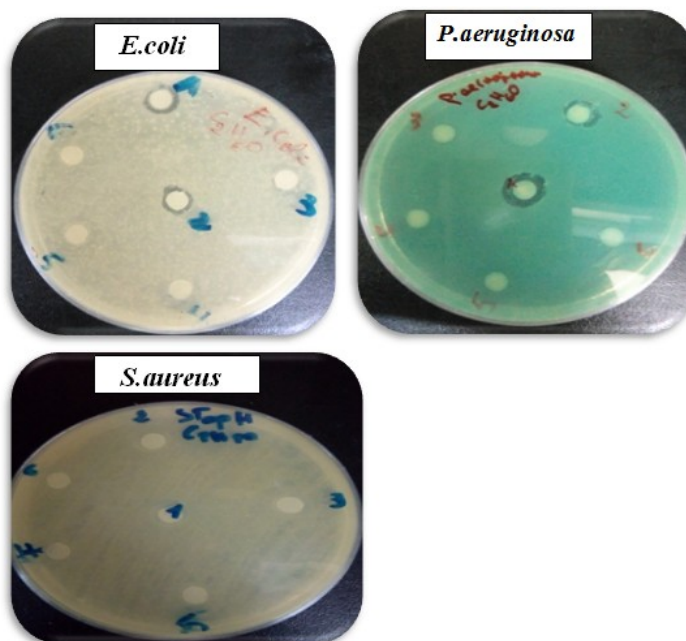


Figure 10: L'effet de C₂H₆O sur *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*.

Selon les résultats on observe une apparition des zones d'inhibition variables selon les concentrations pour les trois souches, avec un effet plus actif sur *E.coli*, ainsi que *S.aureus* pour le peroxyde d'hydrogène.

Par contre une absence d'effet inhibiteur sur *S.aureus*, et un effet plus marquant sur *P.aeruginosa* pour l'éthanol.

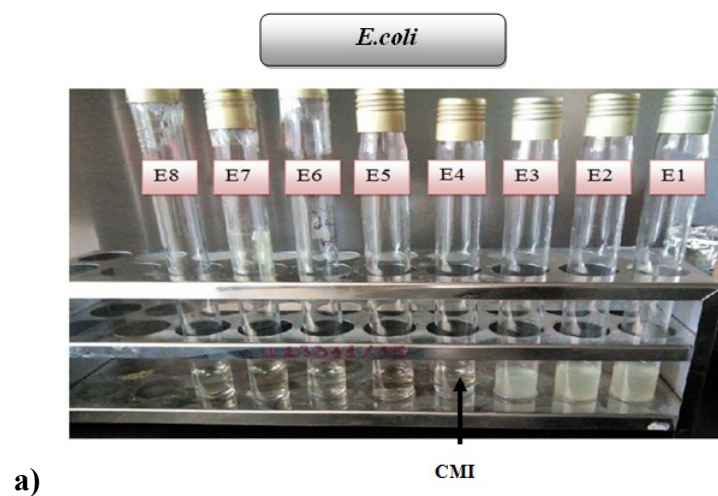
Tableau 11: Diamètre de la zone d'inhibition du C₂H₆O à différentes concentrations.

Numéro de disque	Concentration de C ₂ H ₆ O (%)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)		
		<i>E. coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>
1	96	09	12	–
2	86.4	07	09	–
3	76.2	–	–	–
4	57.6	–	–	–
5	48	–	–	–
6	38.4	–	–	–

2.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrice et bactéricide du peroxyde d'hydrogène.

2.2.1 Détermination de la CMI du peroxyde d'hydrogène.

La CMI est définie comme étant la plus petite concentration d'un agent nécessaire pour inhiber la croissance d'une bactérie. Les résultats de ce paramètre ont révélé une CMI qui diffère selon l'espèce bactérienne en question. En effet, elle est supérieure pour la souche *P.aeruginosa* comparant aux autres souches. Les **Figures 11** et **13** révèlent les CMI respectives pour chaque souche bactérienne utilisée.



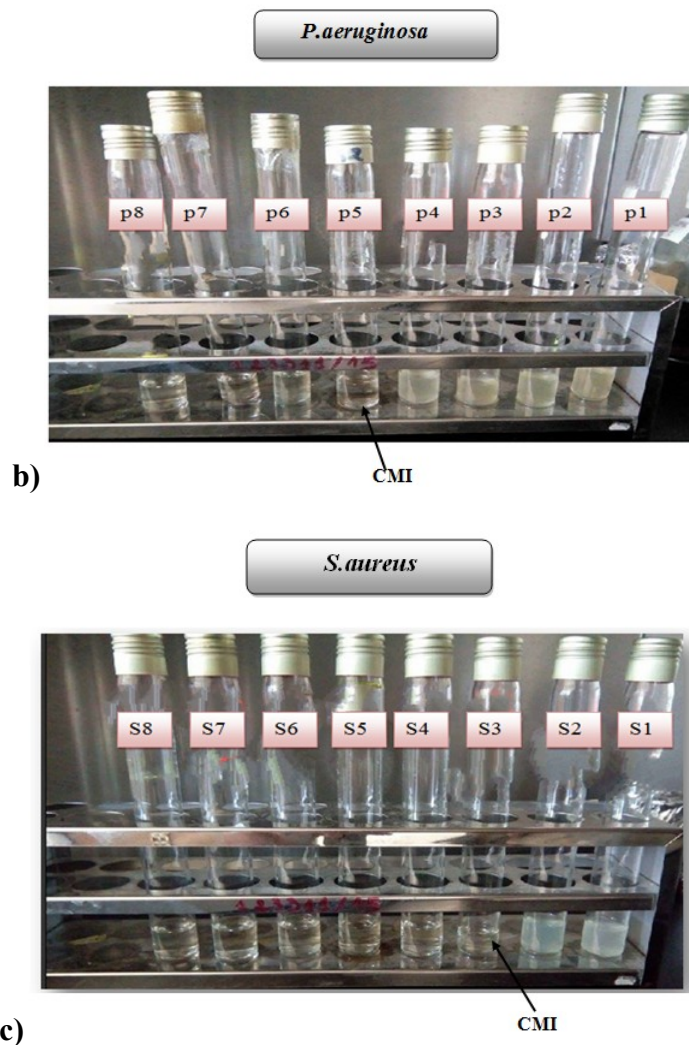


Figure 11: Détermination de la CMI du peroxyde d'hydrogène observée chez les trois souches étudiées (après 24h)

Tableau 12: Détermination de la CMI de l' H₂O₂.

Concentration %	9	12	15	18	21	24	27	30
Souches	9	12	15	18	21	24	27	30
<i>E. coli</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>P.aeruginosa</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>S.aureus</i>	+	+	-	-	-	-	-	-

2.2.2 Détermination de la CMB du peroxyde d'hydrogène.

Tous les résultats obtenus concernant la concentration minimale bactéricide de H₂O₂ sont représentés dans les **Figures 12** et **13**.

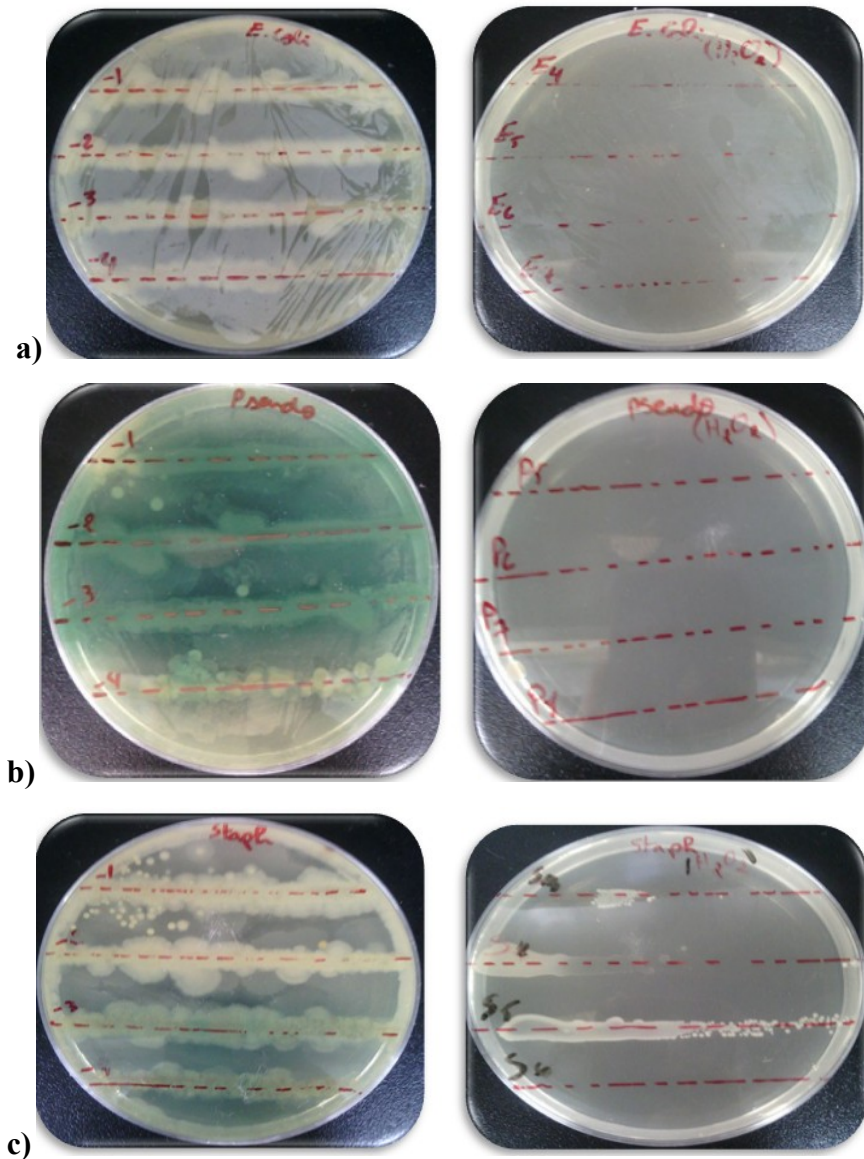


Figure 12: Détermination de la CMB du peroxyde d'hydrogène observée chez les trois souches étudiées.

La figure ci-après récapitule les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides respectives du peroxyde d'hydrogène utilisé dans cette étude. D'après le graphe, il s'est avéré que ce biocide est plus actif sur *E. coli*

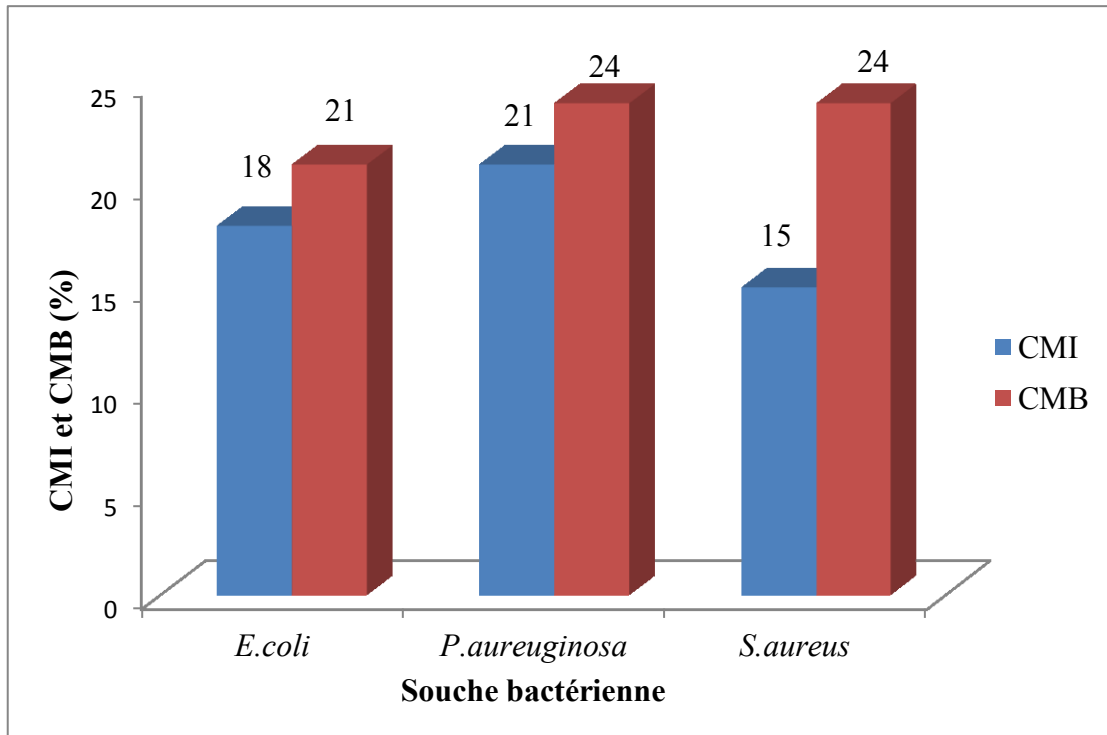


Figure 13: Représentation graphique récapitulatif de la détermination de la CMI et CMB pour le peroxyde d'hydrogène.

D'après la présentation graphique, la plus faible concentration minimale inhibitrice est observée chez la souche *S.aureus*, tandis que la plus faible concentration minimale bactéricide est marquée chez *E.coli*.

2.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrice et bactéricide de l'éthanol

2.3.1. Détermination de la CMI de l'éthanol

Les résultats de ce paramètre ont révélé une CMI qui diffère selon l'espèce bactérienne en question. En effet, elle est supérieure pour la souche *P.aeruginosa* ainsi que pour *S.aureus* par comparaison à *E.coli*. Les **Figures 14** et **16** démontrent les CMI respectives pour chaque modèle bactérien utilisé.

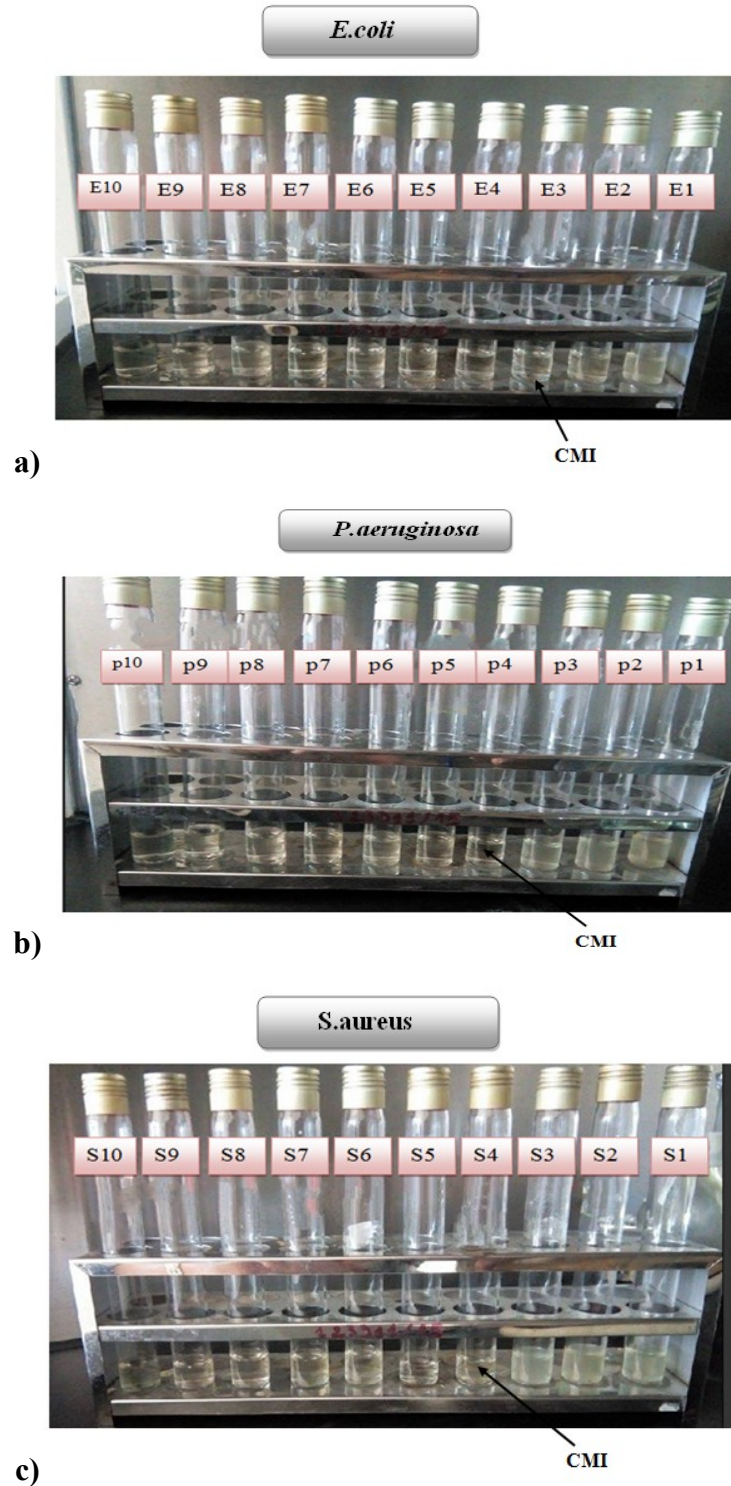


Figure 14: Détermination de la CMI de l'éthanol observée chez les trois souches étudiées (après 24h).

Tableau 13: Détermination de la CMI du C₂H₆O.

Concentration%										
	9.6	19.2	28.8	38.4	48	57.6	67.2	76.8	86.4	96
Souches										

Chapitre V: Résultats et discussion

<i>E. coli</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>P.aeruginosa</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-

2.3.2: Détermination de la CMB de l'éthanol

Tous les résultats obtenus concernant la concentration minimale bactéricide du C_2H_6O sont représentés dans les **Figures 15** et **16**.

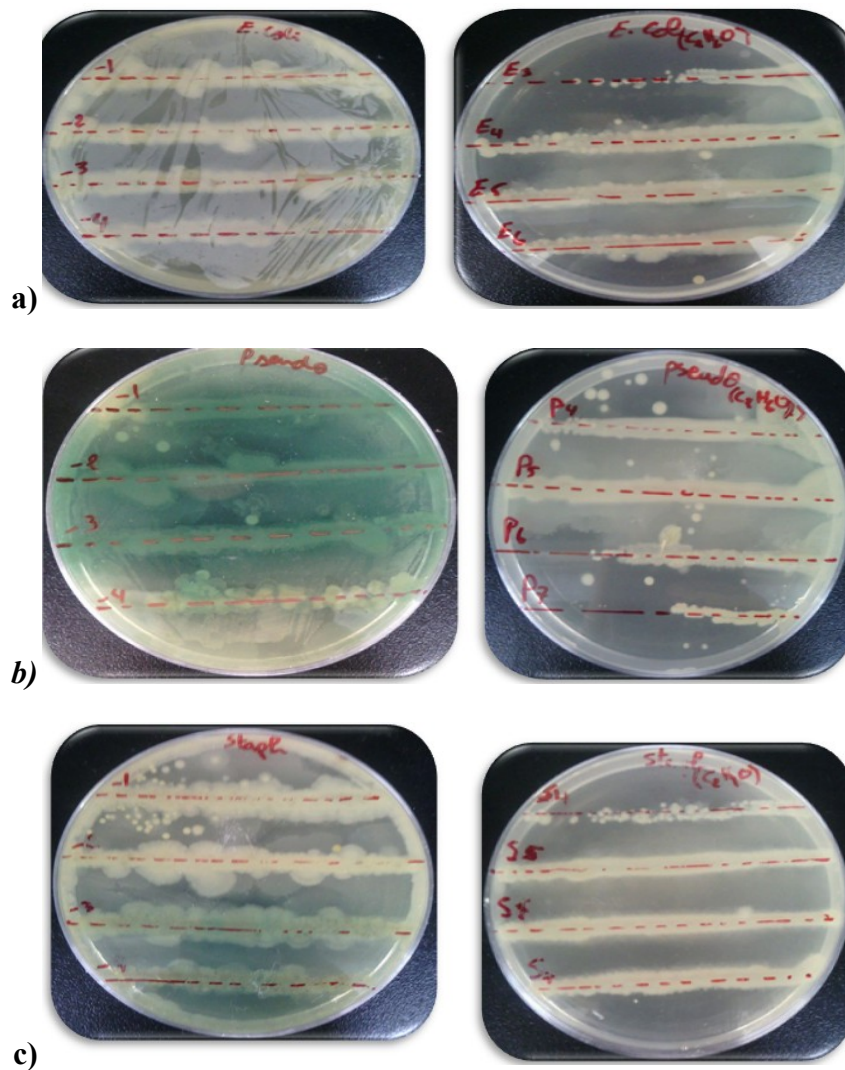


Figure 15: Détermination de la CMB de l'éthanol observée chez les trois souches étudiées.

La figure ci-après résume les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides respectives de l'éthanol utilisé dans cette étude. D'après le graphe, il s'est avéré que ce biocide est plus actif sur *E.coli*

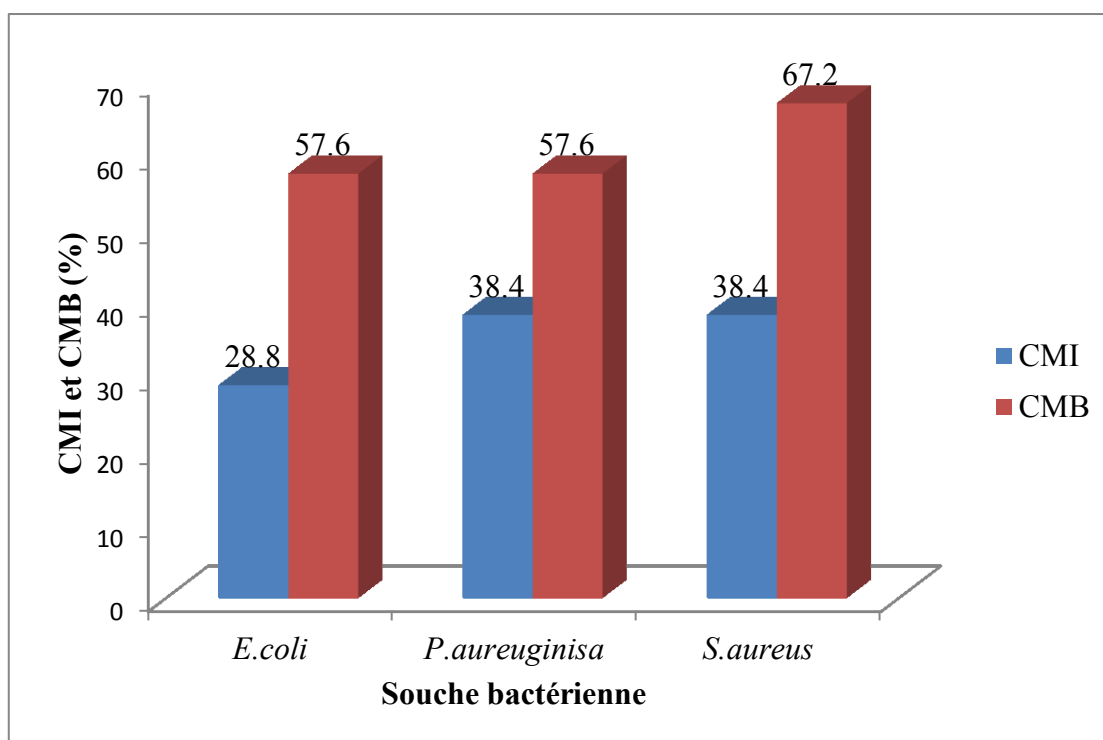


Figure 16: Représentation graphique récapitulatif de la détermination de la CMI et CMB pour l'éthanol

D'après la présentation graphique, la plus faible concentration minimale inhibitrice est observée chez la souche *E.coli*, tandis que la plus faible concentration minimale bactéricide est marquée chez *E.coli* et *P.aeruginosa*.

II. Discussion

L'activité antibactérienne du peroxyde d'hydrogène ainsi que de l'éthanol a été testée sur trois souches de références: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. L'évaluation de cette activité a été effectuée par la méthode de diffusion en milieu gélosé suivie d'une détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides.

Avant de procéder à cette évaluation, il nous est paru nécessaire de connaître la sensibilité des microorganismes utilisés dans cette étude, à une liste d'antibiotiques. En tenant compte des lignes directrices du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

Selon les résultats de l'antibiogramme présentés dans le **Tableau 9**, les souches *E. Coli* et *S.aureus* ont montré une sensibilité à deux antibiotiques seulement sur les sept utilisés (Gentamycine, Pénicilline, Vancomycine, Chloramphénicol, Erythromycine, Amoxiciline, et Céfotaxime), avec un diamètre d'inhibition plus large pour le chloramphénicol qui est de 25 mm pour la première souche (*E.coli*) et 27 mm pour la deuxième souche (*S.aureus*).

Concernant *P.aeruginosa*, la **figure 08.b** a montré que cette souche présente une multirésistance vis-à-vis aux quatre ATB testés: Gentamycine, Pénicilline, Vancomycine, Chloramphénicol.

Ces mécanismes différentiels de réponse entre les souches cibles vis-à-vis des antibiotiques dépendent principalement de la structure de la bactérie. En général, les antibiotiques qui agissent sur la paroi bactérienne ou sur la membrane cytoplasmique (protoplasmique), sont bactéricides, et ceux qui agissent par inhibition de la synthèse des protéines et /ou des acides nucléiques, sont bactériostatiques [12].

Le chloramphénicol est un antibiotique bactériostatique empêchant la formation de la liaison peptidique, donc il bloque la progression de la croissance peptidique. Actuellement, il est connu que la souche *Pseudomonas aeruginosa* est devenue résistante au chloramphénicol (Claude, 2005).

Un des objectifs de notre étude était de tester l'effet inhibiteur des deux biocides en question par la méthode de diffusion en gélose. Les résultats avaient montré que ces agents avaient un effet inhibiteur sur les bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et Gram négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*), dont les diamètres des zones d'inhibition sont variables d'une souche à une autre. Les résultats montrent que toutes les concentrations testées du peroxyde d'hydrogène étaient plus actifs sur les souches *S.aureus*

Résultats et discussion

et *E.coli* à l'inverse de l'éthanol où il a montré un effet plus marquant sur la souche *P.aeruginosa*.

Cette activité antibactérienne du peroxyde d'hydrogène est probablement due à l'inhibition enzymatique et la modification structurales des protéines des bactéries modèles (**Putois, 2012**). Par contre l'effet inhibiteur de l'éthanol pourraient être du soit à la dénaturation des protéines bactériennes et/ou la solubilisation des lipides membranaires (**Fourtillan, 2012**).

Au cours de cette étude il est apparu que l'effet antibactérien des produits testés diminue avec la diminution de leur concentration. D'une manière générale, les biocides s'attaquent aux composés fonctionnels de la cellule provoquant un stress chez les microorganismes. En effet, leurs cibles sont les composés de la membrane cytoplasmique ou le cytoplasme lui-même.

Mais avant de pouvoir les atteindre, ils doivent d'abord traverser la paroi pour ensuite atteindre le site voulu, tout en conservant une concentration minimale afin d'avoir une efficacité visible (**Putois, 2012**).

De a fait, nos résultats rejoignent ceux de la littérature concernant les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides relatives aux biocides utilisés à savoir 10% pour le peroxyde et 70% pour l'éthanol (**Allion, 2004; Gefflot, 2014**).

Ainsi, le peroxyde d'hydrogène s'avère être plus actif sur *E.coli*, où les CMI et CMB les plus faibles (18% et [18; 21%] respectivement) ont été enregistrées. Tandis que pour l'éthanol une CMI de 38.4 % et une CMB de 67.2 % ont été reportées traduisant ainsi une faible activité antibactérienne vis-à-vis des souches cibles comparée à celle de l'eau oxygénée.

Selon les résultats obtenus, la CMB des deux biocides est supérieure à leur CMI, ce qui veut dire qu'à des concentrations élevées, les biocides testés sont bactéricides tandis qu'à des concentrations plus faibles ils sont bactériostatiques. Ceci est concordant avec ce qui est rapporté dans littérature [13].

Conclusion et perspective

Le présent travail avait pour but l'évaluation de l'effet antibactérien de deux biocides, le peroxyde d'hydrogène et l'éthanol, sur des espèces bactériennes de référence souvent incriminées dans la survenue des infections nosocomiales dans le milieu sanitaire, à savoir: *E.coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*.

L'antibiogramme effectué avec les antibiotiques choisis révèle une sensibilité et/ou une résistance variable en fonction des souches, signalant toute fois la résistance marquée de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* à la Gentamycine, la Pénicilline, la Vancomycine et le Chloramphénicol.

Il a été démontré par la méthode de diffusion en gélose, que les produits utilisés étaient actifs sur toutes les souches bactériennes testées avec des diamètres variables; vu que des zones d'inhibition ont été observées pour les différentes concentrations choisies. Par ailleurs ces deux agents ont présenté une activité antibactérienne, particulièrement intéressante et différentielle; le peroxyde d'hydrogène a montré un effet plus marquant contre *S.aureus* alors que celui de l'éthanol était plus important contre *P.aeruginosa*.

De plus, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) obtenues n'étaient pas si différentes de celles reportées en littérature.

Au terme de cette étude, nous constatons que les biocides testés constituent des agents antimicrobiens puissants qui ne devraient pas être utilisés que quand la nécessité se présente. Quand on en a recours, il faudrait que les concentrations soient suffisamment élevées pour tuer toutes les bactéries auxquels elles seront exposées et réduire le risque du développement d'une résistance bactérienne.

Le présent travail a pu vérifier certaines notions déjà présentes dans la littérature, une étude complémentaire serait la bienvenue pour répondre aux suivants:

- L'évaluation du pouvoir antibactérien des biocides, en particulier le peroxyde d'hydrogène et l'éthanol vis-à-vis d'autres bactéries.
- Etudier une population bactérienne résistante incriminée dans les maladies nosocomiales.
- Mettre en place un réseau de surveillance des bactéries antibiorésistantes.

Références bibliographiques



ALLION, A., (2004). Environnement des bactéries et sensibilités aux biocides
Thèse de doctorat. Ecole doctorale agriculture biologie et santé. 188p.



ANGLARET, X., MORTIER, E., (2002). Maladies infectieuses, Éditions
ESTEM, Éditions MED-LINE.375p.



ANSSOUR, L., (2016). Evaluation de la résistance aux antibiotiques chez des
bacilles à Gram négatif isolés de rejets hospitaliers. Thèse de doctorat. Université des
Sciences et de la Technologie Houari Boumediene.163p.



BENNABOU, T.A., (2012). “Antibiorésistance des bactéries lactiques isolées de
produits artisanaux algériens.” Mémoire de MAGISTER en biotechnologie, Université
d’Oran.113p.



BERCHE, P., GALLARD, J.L., SIMONNET, M., (1988).les infections
nosocomiales d’origine bactérienne et leur prévention. Bactériologie des infections
humaines de la biologie à la clinique. Paris : Flammarion, 199p.



BRUCKER, G., (1998). Infections nosocomiales et environnement hospitalier.
Page : 6-24.



CATTOIR, V., (2012). L’antibiogramme. 3ème éd. Paris, 654p.
ISBN : 978-7472-1600-5



CHEVRE, N., SUREN. E., (2011).Alerte aux micropolluants: pesticides biocides,
détergents, médicaments et autre substances chimiques dans l’environnement. Edition
universitaire européennes .142p. ISBN : 978-2-88074-938-5 (18.03.2017)



CLAUDE, M., (2005).Principes de réanimation chirurgicale.Arnette.France.1425p.



COURVALINE, P., LECLREQ R. (2012). Antibiogramme.3eme édition. ESKA.
Paris. 687p.





DELARRAS, C., (2007). Microbiologie Pratique Pour Le Laboratoire D’analyse
Ou de Contrôle Sanitaire. Tec et doc. Paris. 476p.





FAUCHERE, J.L., J.L. (2002). "Bactériologie générale et médicale" Ellipses
Editions Paris, 365p.


Références bibliographiques


 **FOURTILLAN, E.**, (2012). Traitements des infections cutanées bactériennes superficielles. Enquête auprès des médecins généralistes du Cher, au cours de l'année 2010. Thèse de doctorat. Université François-Rabelais, paris.125p.


 **GEFFLOT, A.**, (2014). Les biocides: conseil à l'officine. Thèse de doctorat. Université de Nantes, paris.140p.


 **LACHASSINNE, E., LETAMENDIA-RICHARD, E., GAUDELUS, J.**, (2004). Épidémiologie des infections nosocomiales en néonatalogie. Archives de Pédiatrie 11, 229–233.


 **MCHICH, A.**, (2002). Les infections nosocomiales à propos de 55 cas colligés au Maroc. Thèse de doctorat. Université de cheikh Anta Diop de Dakar. 157p.


 **MEZIANI, M.**, (2012). Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques: Cas des Entérobactéries et Pseudomonas. Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine. 68p.


 **MOGOA, E.**, (2010). Etude du mécanisme d'action de biocides oxydants sur *acanthamoeba castellanii*. Thèse de doctorat. Université de Poitiers. 207p.

 **MOUNIER, M., PESTOURIE, N., PLOY, M.-C., DENIS, F.**, (2009). Les détergents et les désinfectants : rôle en médecine (1re partie). Antibiotiques, 11, 177–184.


 **PETIGNAT, C., BLANC, D., BALLY, F.**, (2006). Microbiologie pathogénèse de l'infection, cours assistant stérilisation I.P 9


 **PUTOIS, T.**, (2012). “Etude du traitement de désinfection des eaux de refroidissement par le couplage H₂O₂/UV: Application à une tour aéro-réfrigérantes.” Thèse de doctorat, UNIVESITE DE GRENOBLE. 211p.


 **RAHAL, K.**, (2013). Les antibiotiques. Office des publications universitaire, Alger, 2013, 135p. ISBN:978.9961.0.1705.0


 **SINGLETON, P.**, (2004). Bactériologie pour la médecine, la biologie, et les biotechnologies, éd. Dunod, paris. 454-455 ; 542 p .ISBN 210 0488732

Références bibliographiques

 **SYLVIE, C., PHARM, B.,** (2010).Le parrainage des antimicrobiens ; Pharmactuel Vol. 42 Supplement 2 Décembre 2009.

 **TALBERT, M., WILLOQUET, G., GERVAIS, R.,** (2009). Pharmaco clinique, Wolters Kluwer France. P 641, 648,655 06-04-2017

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

 **TOTY, A., GUESSENND, N., BAHI, C., KRA, A.M., OTOKORE, D.A., DOSSOM.**(2013).Evaluation in-vitro de l'activité d'extrait aqueux de l'écorce de tronc de Harungana madagascarien sur la croissance de résistantes Bulletin de la société Royale des science de Liège ,82,12-21.

Références bibliographiques

Sites web:

[1]:http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.12fr.pdf
(Consulté le : 23-4-2017).

[2]:http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69751/1/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.12_fre.pdf (Consulté le : 15-4-2017).

[3]:https://fr.wikipedia.org/wiki/Clostridium_perfringens (Consulté le : 02-06-2017).

[4]:https://fr.wikipedia.org/wiki/Staphylocoque_doré (Consulté le : 02-06-2017).

[5]:<http://www.bacteriainphotos.com/Escherichia%20coli%20light%20microscopy.html>
(Consulté le : 02-06-2017).

[6]:http://microbecanvas.com/admin/uploads/image/bacterien/pseudomonas-fluorescens/pseudomonas-fluorescens_nf51_cult_gram-1_f-350x220.jpg. (Consulté le : 02-06-2017).

[7]: <http://www.123bio.net/cours/antibio/modeaction.html> (Consulté le 03-03-2017)

[8]:<http://www.technoscience.net/?onglet=glossaire&definition=1039> (Consulté le : 03-03-2017).

[9]:<http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/.../desc2015-action-et-resistance-atb-mainardi.p>. (Consulté le : 28-03-2017).

[10]:http://www.ratoupeia.org/archive/Antiseptique_et_d%C3%A9sinfectant/index.html
(Consulté le : 28-05-2017).

[11]:<http://copublications.greenfacts.org/fr/biocides-resistance-antibiotiques/> (Consulté le : 19_02_2017).

[12]:http://www.medbc.com/meditline/review/brulures/vol_1/num_3/text/vol1n3p141.asp.
(Consulté le: 15-05-2017).

Annexe

Les compositions des milieux utilisés :

1. Composition de la gélose Nutritive (GN) en g/l

- Extrait de viande.....3 g/l.
- Extrait de levure.....3 g/l.
- Peptone.....10 g/l.
- Chlorure de sodium.....5 g/l.
- Agar.....18 g/l.
- Eau distillée.....1 litre.
- pH = 7,3

2. Composition de la gélose Chapman en g/l

- Peptone.....10 g
- Extrait de viande de bœuf.....1 g.
- Chlorure de sodium.....75 g.
- Mannitol:.....10g.
- Rouge de phénol:.....0,025g.
- Agar-agar:.....15g.
- Eau distillée:.....1 litre.
- pH = 7,4

3. Composition de la gélose Muller Hinton (MH) en g/l

- Extrait de viande de bœuf.....3 g/l.
- Hydrolysate de caséine.....17.5 g/l.
- Agar.....18 g/l.
- Eau distillée.....1 litre.
- pH = 7.4

4. Composition de bouillon de Mueller Hinton (MH) en g/l

- Hydrolysate de caséine8.5 g/l.
- Extrait de viande2.43 g/l.
- Eau distillée.....0.486 litre.
- pH = 7.4

5. Composition de bouillon de bouillon nutritif en g/l

- Milieu nutritif déshydraté3.9 g/l.
- Eau distillée.....0.3 litre.
- pH = 7.4