

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: Sciences Biologiques
Spécialité/Option: Microbiologie appliquée
Département: Ecologie et Génie d'Environnement

Thème

**Profil de résistance aux antibiotiques et capacité de
formation de biofilm chez des bactéries isolées du milieu
hospitalier**

Présenté par :

- BRAHIMI Nawel
- CHERAFA Safa
- ESSALHI Houda

Devant le jury :

Dr. AISSAOUI R.
Dr. BENHALIMA L.
Dr. AMRI S.

Président
Promotrice
Examinatrice

Université de Guelma
Université de Guelma
Université de Guelma

Septembre 2020

Remerciements

Nous commençons par remercier ALLAH le tout puissant de nous avoir fait naître musulmanes. Qui nous a donné le courage, la volonté, la patience pour faire ce modeste travail.

*Nous adressons nos sincères remerciements à Monsieur **Aissaoui R.**, Docteur à l'université de Guelma, pour l'honneur qu'elle nous a fait en présidant ce jury.*

*Nous remercions Madame **Amri S.**, Docteur à l'université de Guelma pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nous tenons particulièrement à remercier notre promotrice et directrice de mémoire Madame **Benhalima L.**, Nous la remercions pour sa patience, sa confiance, sa gentillesse et sa disponibilité à tout moment durant la réalisation de ce travail et la rédaction de notre mémoire. Notre tâche n'aurait jamais été accomplie sans sa précieuse orientation, Merci pour son appui qui nous a permises de continuer notre travail sans se lasser, avec notre plus profond respect.*

Nous remercions nos très chers parents qui nous ont fourni au quotidien un soutien et une confiance sans faille et de ce fait, nous ne saurions exprimer notre gratitude seulement par des mots.

Grand merci à tous les enseignants et toutes les personnes qui ont intervenu par leurs conseils et leurs savoirs, durant notre parcours académique.

À la fin nous remercions chaleureusement toutes les personnes qui nous ont encouragé et ont cru de nos capacités.

***Il faut persévérer même si l'on arrive déchiré
car la joie de la réussite nous fera
oublier les souffrances.***

Dédicace

Je voudrais dédier cet humble travail :

À Allah qui m'a réconcilié à accomplir ce travail.

À Mon très cher père Mouhamed

École de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé toute au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger. Aucune dédicace ne pourra exprimer le respect que je lui éprouve.

À ma très chère maman Malika

À celle qui m'a transmise la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, a ma mère. Source de ma vie aimable vous représentez pour moi le réseau de vivre, vous n'avez pas cessé de m'encourager et de prier chaque jour pour moi. Vous savez maman aucune dédicace ne serait expérimente et suffisante pour tous les sacrifices que vous avez faits. Je ne pourrais jamais vous remercier pour le bonheur et le soutien que vous avez consenti depuis ma naissance.

Que dieux vous garde, vous comble de santé et vous donne une longue vie.

À mes Très Chères Sœurs

Selma, Sara et leurs maris Mounir et Sohaib, Houta sans oublier ma petite nièce Sirine, je les remercie pour tous le soutien qui m'ont donnée. Je leurs souhaite la réussite et la prospérité dans leurs vie.

À mon cher fiancé Alla

Mon cher partenaire, la source de ma vie, symbole du courage et de responsabilité. Je le remercie pour son soutien et pour sa patience qu'il a exprimée au cours de mon parcours, Que dieu tu garde et te donne longue vie, ainsi que sa famille en particulier ma belle mère Zbida et mon beau père Larbi.

À mes trinômes Nawel et Safa qui ont partagé avec moi les moments difficiles de ce travail.

À toutes ma famille paternelle et maternelle

À mes adorables amies «Aida, Ilham, Khawla, Yasmine, Nessrine et Amira»

À mes chères collègues «Chifa, Awatef, Oumaima et Zeyneb»

À mes anciens enseignants en particulier messieurs Bezazi et Hfidil, Madame, Kouachi, et Madame Boudraa qui trouvent ici l'expression de ma gratitude.

Houda

À ma mère

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

J'espère que je réalise aujourd'hui un de tes rêves et que ce travail soit à tes yeux le fruit de tes efforts et un témoignage de ma profonde affection.

Qu'ALLAH te bénisse et t'alloue bonne santé, bonheur et longue vie afin que je puisse à mon tour te combler.

À mon père

Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

À mes grands-parents

Je les remercie pour leurs prières et leur tendresse. Puisse Dieu leurs prêtes beaucoup de santé. À mes tantes et oncles, leurs époux et épouses.

*À mes frères **Bilel** et **Achref** qui m'ont soutenue tout au long de ce travail par leurs précieux encouragements.*

*À ma sœur **Chahed**, je te remercie pour tous les dérangements et pour les papiers que tu as déchirés chaque nuit, tu étais à mes côtés. Ta présence m'a fortifiée. Merci d'être là. Que Dieu te guérisse et prenne soin de toi.*

*À mon trinôme **Houda** et **Safa** qui ont partagé avec moi les moments difficiles de ce travail.*

*À mes proches, tante **Samia**, et oncle **Farid**, **Manel**, **Nawel** et **Taoufik**»*

*À mes chères collègues« **Awatef**, **Chifa**, **Zeyneb**, **Oumaima**, **Sara**, **Kahina**, **Yassmine**, **Chaïma** et **Roumaïssa** »*

Nawel

Je dédie ce modeste travail

*À la mémoire de mon **cher père**, Depuis que Dieu vous a choisi pour rejoindre la vie éternelle, il y a cinq ans, sachez que je pense à vous toujours, vous n'avez pas de siège aujourd'hui parmi l'assistance mais vous siégez dans mon cœur, vous êtes pour moi un exemple de force et persévérance, tout simplement, un exemple que j'aimerais devenir.*

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

que Dieu tout puissant vous accueille dans son vaste paradis.

*J'adresse ma plus profonde gratitude et tout mon amour à ma très **chère mère**, vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager je vous remercie pour vos sacrifices tout au long de mon parcours, sans vous ce travail n'aurait pas été possible, que Dieu, vous préserve et vous accorde santé, longue vie et bonheur.*

*À mon cher frère **Khaled** et à mes adorables sœurs **Nadjette, Aïda, Imene** qui m'ont toujours aidée et supporté ainsi que leurs maris.*

*À ma nièce **Belkisse**, mes neveux **Iyad, Foued, Racim et Zayd**.*

À toutes mes amies, je les remercie pour le sourire qu'elles ont su toujours dessiner sur mon visage.

*À mon trinôme **Nawel et Houda** je les remercie pour la patience et le soutien moral qu'elles m'ont prouvé en toutes circonstances.*

À tous ceux qui m'ont aidé dans mes études.

À tous ceux qui me sont chers et qui m'aiment.

Safa

Résumé en français

Résumé en anglais

Résumé en arabe

Liste des figures

Liste des tableaux

Symboles et abréviations

Introduction 1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.	Environnement hospitalier: Facteur d'infection	3
I.1.	Bactéries présentes dans l'environnement hospitalier	3
I.2.	Rôle du milieu hospitalier dans la survenue des infections nosocomiales	3
I.3.	Diffusion des bactéries multirésistantes dans l'environnement hospitalier	4
II.	Bactéries responsables des infections nosocomiales	5
II.1.	Entérobactéries	5
II.1.1.	Classification	5
II.1.2.	Caractères généraux	6
II.1.3.	Pouvoir pathogène	7
II.1.4.	Résistance des entérobactéries aux agents antibactériens	8
II.1.4.1.	Résistance aux antibiotiques	8
II.1.4.2.	Résistance à autres agents antibactériens	9
II.2.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	9
II.2.1.	Classification	9
II.2.2.	Caractères généraux	10
II.2.3.	Pouvoir pathogène	10
II.2.4.	Résistance d' <i>Acinetobacter baumannii</i> aux agents antibactériens	11
II.2.4.1.	Résistance aux antibiotiques	11
II.2.4.2.	Résistance à autres agents antibactériens	11
II.3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
II.3.1.	Classification	12
II.3.2.	Caractères généraux	12
II.3.3.	Pouvoir pathogène	13
II.3.4.	Résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux agents antibactériens	13
II.3.4.1.	Résistance aux antibiotiques	13
II.3.4.2.	Résistance à autres agents antibactériens	14
II.4.	<i>Aeromonas hydrophila</i>	14
II.4.1.	Classification	14
II.4.2.	Caractères généraux	15
II.4.3.	Pouvoir pathogène	15

II.4.4. Résistance d' <i>Aeromonas hydrophila</i> aux agents antibactériens	15
II.4.4.1. Résistance aux antibiotiques	15
II.4.4.2. Résistance à autres agents antibactériens	16
II.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	16
II.5.1. Classification	16
II.5.2. Caractères généraux	16
II.5.3. Pouvoir pathogène	17
II.5.4. Résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> aux agents antibactériens	17
II.5.4.1. Résistance aux antibiotiques	17
II.5.4.2. Résistance à autres agents antibactériens	18
II.6. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	18
II.6.1. Classification	18
II.6.2. Caractères généraux	19
II.6.3. Pouvoir pathogène	19
II.6.4. Résistance de <i>Streptococcus pneumoniae</i> aux agents antibactériens	20
II.6.4.1. Résistance aux antibiotiques	20
II.6.4.2. Résistance à autres agents antibactériens	20
III. Biofilm et environnement hospitalier	20
III.1. Mécanisme de formation des biofilms	20
III.2. Diversité des bactéries dans les biofilms du milieu hospitalier	22
III.3. Stratégies antibiofilm	23

Chapitre 2 : Étude expérimentale

I. Cadre d'étude	25
II. Échantillonnage et technique de prélèvement	26
II.1. Échantillonnage	26
II.2. Technique de prélèvement	26
III. Méthodologie	27
III.1. Isolement et identification phénotypique des souches bactériennes	27
III.1.1. Isolement des souches bactériennes	27
III.1.2. Identification phénotypique des souches bactériennes	29
III.1.2.1. Identification morphologique	29
III.1.2.2. Recherche des enzymes respiratoires	31
III.1.2.3. Identification biochimique	32
III.1.3. Conservation des souches bactériennes	35
III.2. Étude de la résistance des bactéries aux antibiotiques	35
III.2.2. Antibiotiques testés	36
III.3. Étude de la capacité de formation de biofilm	37

Chapitre 3 : Résultats et Discussion	
I. Isolement et identification phénotypique des isolats bactériens	39
I.1. Identification morphologique	39
I.2. Enzymes respiratoires	42
I.3. Identification biochimique	44
I.3.1. Biotypage par galerie biochimique classique	44
I.3.2. Biotypage par microgalerie API	45
I.4. Discussion	47
II. Étude de la résistance des bactéries aux antibiotiques	51
II.1. Bacilles à Gram négatif	51
II.2. Cocci à Gram positif	53
II.3. Discussion	54
III. Capacité de formation de biofilm : étude synthétique	57
III.1. Bacilles à Gram négatif	57
III.2. Cocci à Gram positif	59
Conclusion et perspectives	61
Références bibliographiques	62
Annexes	73

Résumé

Ce travail a été réalisé sur 15 prélèvements environnementaux provenant de trois établissements hospitaliers situés dans la région de Guelma. Notre étude a porté sur l'identification des souches bactériennes en se basant sur leurs caractères cultureux et biochimiques, sur l'étude de leur résistance aux antibiotiques par méthode de diffusion en milieu gélosé et leur capacité à former un biofilm par la technique de microplaque. L'identification phénotypique a révélé la présence de 5 bacilles à Gram négatif 'BGN' (*Pasteurella pneumotropica*, *Citrobacter freundii*, *Serratia odorifera*, *Vibrio vulnificus* et *Chryseobacterium indologenes*) et 4 cocci à Gram positif 'CGP' (*Staphylococcus sciuri*, *Micrococcus luteus* et 2 *Micrococcus varians*). La lecture et l'interprétation des antibiogrammes ont montré que 100 % des BGN sont résistantes aux bêta-lactamines. Concernant les CGP, une résistance totale (100 %) au vancomycine, à la colistine et à la ceftazidim, suivi par une résistance importante au chloramphénicol et à la cefazoline (75 %) ont été révélés. La prévalence des bactéries multi-résistantes (BMR) est de 22,22 %. Une forte probabilité de la capacité de formation de biofilm par les bactéries isolées a été démontrée par une étude synthétique. Ces BMR probablement formatrices de biofilms constituent un problème préoccupant en milieu hospitalier d'où la nécessité de l'application rigoureuse des règles hygiène.

Mots-clés : Milieu hospitalier, bactéries, résistance aux antibiotiques, biofilm.

This work was carried out on 15 environmental samples from three hospitals located in the Guelma region. This study focused on the identification of bacterial strains based on their cultural and biochemical characteristics, on the study of their resistance to antibiotics by diffusion method on agar medium and their ability to form a biofilm by Microtiter plate technique. Phenotypic identification revealed the presence of 5 Gram negative bacilli 'GNB' (*Pasteurella pneumotropica*, *Citrobacter freundii*, *Serratia odorifera*, *Vibrio vulnificus* and *Chryseobacterium indologenes*) and 4 Gram positive cocci 'GPC' (*Staphylococcus sciuri*, *Micrococcus luteus* and 2 *Micrococcus varians*). Reading and interpreting the antibiograms has showed that 100% of the GNBs are beta-lactam resistant. For GPC, total resistance (100%) to vancomycin, colistin and ceftazidim, followed by significant resistance to chloramphenicol and cefazoline (75%) were revealed. The prevalence of multi-resistant bacteria (MRB) is 22,22 %. A high probability of biofilm formation capacity by isolated bacteria was demonstrated by a synthetic study. These MRBs which are probably biofilm-forming constitute a worrying problem in hospitals, hence the need for the rigorous application of hygiene rules.

Keywords: Hospital environment, bacteria, antibiotic resistance, biofilm.

أجري هذا العمل على 15 عينة بيئية معزولة من ثلاثة مستشفيات تقع في منطقة قالمة. ركزت دراستنا على تحديد السلالات البكتيرية بناءً على خصائصها الزراعية والبيوكيميائية ودراسة مقاومتها للمضادات الحيوية عن طريق انتشارها في وسط الزرع وقدرتها على تكوين الأغشية الحيوية باستخدام تقنية صفيحة المعايرة الدقيقة. كشف تحديد النمط الظاهري عن وجود 5 عصيات سالبة الجرام "BGN" (*Citrobacter freundii*، *Pasteurella pneumotropica*) و 4 مكورات إيجابية الجرام "CGP" (*Staphylococcus sciuri*، *Micrococcus luteus*، و *Micrococcus varians*). أظهرت قراءة وتفسير المضادات الحيوية أن 100% من BGN مقاومة للبيتا لكتام. فيما يتعلق ب CGP، تم الكشف عن المقاومة الكلية (100%) لفانكوميسين، كوليسيتين وسيفتازيديم، تليها مقاومة كبيرة لكلورامفينيكول وسيفازولين (75%). إن نسبة انتشار البكتيريا متعددة المقاومة (BMR) هو 22,22%. أثبتت الدراسة النظرية أن هناك احتمالية عالية لقدرة هذه البكتيريا المعزولة على تكوين الأغشية الحيوية. تشكل هذه البكتيريا متعددة المقاومة و التي ربما تكون غشاء حيوي مشكلة مقلقة في المستشفيات، وهذا يستدعي إلى تطبيق صارم لقواعد النظافة.

الكلمات المفتاحية: بيئة المستشفيات، البكتيريا، مقاومة المضادات الحيوية، غشاء حيوي.

Figure	Titre	Page
Figure 1	Étapes de la formation d'un biofilm bactérien (Douarche et al., 2018).	21
Figure 2	Aspect macroscopique des isolats bactériens appartenant aux bacilles à Gram négatif.	41
Figure 3	Aspect macroscopique des isolats bactériens appartenant aux cocci à Gram positif.	41
Figure 4	Présence et/ou absence des enzymes respiratoires chez certains isolats bactériens.	43
Figure 5	Profils biochimiques des cocci à Gram positif isolés de l'environnement hospitalier.	45
Figure 6	Résistance aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif.	51
Figure 7	Antibiogramme des différents bacilles à Gram négatif isolés des sites hospitaliers.	52
Figure 8	Résistance aux antibiotiques des cocci à Gram positif.	53
Figure 9	Antibiogramme des cocci à Gram positif isolés des sites hospitaliers.	54

Liste des schémas

Schéma	Titre	Page
Schéma 1	Isolement et identification des souches bactériennes.	28

Tableau	Titre	Page
Tableau 1	Caractères biochimiques des principaux genres de la famille des <i>Enterobacteriaceae</i> (Avril <i>et al.</i> , 1992).	7
Tableau 2	Sites de prélèvement au niveau des sanitaires de différents établissements hospitaliers.	26
Tableau 3	Aspect macroscopique des bactéries apparaissant sur les milieux de culture sélectifs utilisés (Guiraud, 2003 ; Rodier <i>et al.</i> , 2005 ; Delarras, 2007).	29
Tableau 4	Recherche des enzymes respiratoires.	31
Tableau 5	Tests biochimiques utilisés pour l'identification des cocci à Gram positif.	32
Tableau 6	Préparation et inoculation de galeries biochimiques miniaturisés API (http://www.biomerieux.com).	34
Tableau 7	Critères des antibiotiques testés sur les souches bactériennes (CA-SFM, 2019).	37
Tableau 8	Aspects macroscopiques et microscopiques des bacilles à Gram négatif et des cocci à Gram positif isolés à partir de l'environnement hospitalier de certains établissements publics de la région de Guelma.	39
Tableau 9	Aspect microscopique des isolats bactériens.	42
Tableau 10	Recherche des enzymes respiratoires des isolats bactériens.	43
Tableau 11	Tests biochimiques classiques des cocci à Gram positif isolés des milieux hospitaliers.	44
Tableau 12	Profils biochimiques des bacilles à Gram négatif isolés de l'environnement hospitaliers.	45
Tableau 13	Espèces bactériennes isolées à partir de l'environnement des établissements publics hospitaliers de la région de Guelma.	47
Tableau 14	Profils antibiotypiques associés aux bacilles à Gram négatif isolés des sites hospitaliers.	52
Tableau 15	Profils antibiotypiques associés aux cocci à Gram positif isolés des sites hospitaliers.	53
Tableau 16	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E (http://www.biomerieux.com).	78
Tableau 17	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 NE (http://www.biomerieux.com).	79

ADH : Arginine Dihydrolase	M9 : M9 Minimal medium
ADN : Acide désoxyribonucléique	MI : Millilitre
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire	Mm : Millimètre
ADNe : Acide désoxyribonucléique électronique	NaCl : Chlorure de sodium
AmpC : Adénosine monophosphate cyclique	Nm : Nanomètre
API : Analytical Profile Index	ODC : Ornithine décarboxylase
ARN : Acide ribonucléique	OmpA : Outer membrane protéine A
ARNr : Acide ribonucléique ribosomique	ONPG : Ortho-Nitrophényl-β-D-galactosidase
BGN : Bacilles à Gram négatif	ORL : Oto-rhino-laryngologie
BLSE : Béta-lactamases à spectre élargi	PAC : Phényl-acétate
BMR : Bactéries multirésistantes	pH : Potentiel Hydrogène
C° : Degré Celsius	PLP : Protéines de liaison à la pénicilline
CAT : Chloramphenicol acétyltransférase	R : Résistance
CG : Cytosine-guanine	S : Sensible
CGP : Cocci à Gram positif	SCN : <i>Staphylocoque</i> à coagulase négative
CMI : Concentration minimale inhibitrice.	SS : <i>Salmonella-Shigella</i>
DiGMP : Diguanosine monophosphate	TDA : Tryptophane désaminase
DO : Densité optique	TSB : Tryptone soja
g/l : Gramme par litre	TSI : Triple Sugar Iron
GLU : Glucose	UFC/ml : Unité formant colonie par millilitre
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène	WC : Water closet
H₂S : Hydrogène sulfuré	µg/ml : Microgramme par millilitre
LB : Luria Bertani	µL : Microlitre
LDC : lysine décarboxylase	
LPS : Lipopolysaccharides	

Introduction

L'environnement hospitalier est un réservoir d'une population diversifiée de microorganismes qui sont dispersés dans l'air, l'eau, les dispositifs médicaux, le linge, les aliments, et même les sanitaires (Tortora *et al.*, 2003 ; Jalalpoor, 2011).

Les surfaces inanimées sont fréquemment impliquées dans la transmission de plusieurs bactéries pathogènes et par conséquent le développement des infections nosocomiales. Ces infections constituent un problème majeur de santé publique avec comme impact une augmentation de la durée des hospitalisations, une majoration importante des coûts des soins, des taux de morbidité et de mortalité (Talon, 1999).

Parmi les bactéries souvent impliquées dans les infections causées par les fomites, les entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et *Staphylococcus aureus* (Ghernaout, 2013 ; Vasudevan *et al.*, 2014). Ces bactéries sont généralement résistantes aux antibiotiques. Malheureusement, l'émergence et la progression de ce phénomène conduisent à une impasse, face à des germes indociles à tous types de traitement limitant les schémas thérapeutiques (Vasudevan *et al.*, 2014). L'antibiorésistance peut également se répéter sur des populations bactériennes présentant déjà une ou plusieurs résistances à d'autres antibiotiques, menant à l'accumulation de résistances chez certaines bactéries qui sont alors nommées bactéries multirésistantes (BMR), ces dernières posent un grand problème de santé publique (Magiorakos *et al.*, 2012).

En Algérie, les bactéries multi-résistantes sont la cause d'un taux important d'infections nosocomiales (fréquence estimée entre 20 et 30 %) et possèdent généralement un pronostic sévère (Touati *et al.*, 2012). Selon des études récentes, les bacilles à Gram négatif et les cocci à Gram positif résistantes aux antibiotiques sont responsables de plusieurs infections nosocomiales causées par leur transmission à partir du matériel médical, des surfaces proches du patient et des sanitaires (Debabza, 2015 ; Bouguenoun, 2017).

Un autre problème se pose aussi dans le milieu hospitalier est la formation de biofilm qui sont des communautés de micro-organismes, adhérant entre eux et à une surface, grâce à la sécrétion d'une matrice adhésive offrant une protection contre la dessiccation, les défenses de l'hôte et un grand nombre d'agents antimicrobiens.

La préoccupation principale des hôpitaux en regard des biofilms est directement liée à leur implication dans diverses pathologies infectieuses (Dunny *et al.*, 2014).

Cette situation nous a amené à fixer les objectifs suivant :

- Caractérisation phénotypique des bactéries isolées à partir des sanitaires, de trois établissements hospitaliers de la wilaya de Guelma ;
- Détermination du profil antibiotypique des souches bactériennes isolées ;
- Évaluation de leur capacité à former des biofilms *in vitro*.

En effet nous rapportons dans cette étude deux parties :

- La première est attribuée à une synthèse bibliographique comportant une description de l'environnement hospitalier et son rôle dans l'apparition des infections nosocomiales, les caractères généraux des principales bactéries responsables de ces infections et leur résistance aux agents antibactériens et le concept de biofilm ;
- La deuxième relate notre travail expérimental, commençant par la présentation des méthodes utilisées, suivie des résultats obtenues et des discussions engendrées par ces résultats, et enfin nous terminerons cette étude par une conclusion et les perspectives proposées.

Chapitre I :

Synthèse

bibliographique

I. Environnement hospitalier : Facteur d'infection

I.1. Bactéries présentes dans l'environnement hospitalier

L'environnement hospitalier est composé de l'ensemble des éléments solides, liquides, ou gazeux qui environnent ou entrent en contact avec les visiteurs, les patients ou le personnel dans une structure hospitalière. L'air (médical ou atmosphérique), les eaux (de réseau, d'appareillage), les surfaces inertes (mobilier, linge, instrumentation...), les surfaces vivantes (les mains du personnel), les solutés et l'alimentation sont les principaux constituants de l'environnement hospitalier (Le Heurt *et al.*, 1995).

Le milieu hospitalier constitue un immense réservoir de divers agents pathogènes (bactéries, levures, champignons filamenteux, virus et parasites) qui peuvent appartenir aussi bien aux espèces opportunistes qui ne manifestent leur virulence que sur un organisme dont les défenses immunitaires sont affaiblies, qu'aux espèces habituellement pathogènes pour l'homme (CTIN, 2002).

Les bactéries jouent un rôle potentiel dans les infections hospitalières dont l'origine peut être humaine et/ou environnementale :

- La flore commensale de la peau et des muqueuses des porteurs sains et/ou malades sont la principale source humaine des bactéries parmi lesquelles des bactéries multirésistantes aux antibiotiques comme *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) et les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (EBLSE) (Talon, 1999).
- La flore saprophyte de l'environnement (air, eau, sol) comme les bacilles à Gram négatif (BGN), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, et *Legionella pneumophila* colonise fréquemment le milieu hospitalier (Talon, 1999; Rampling *et al.*, 2001).

I.2. Rôle du milieu hospitalier dans la survenue des infections nosocomiales

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les infections nosocomiales sont des infections survenant chez un patient au sein d'un hôpital ou d'un autre établissement de santé et chez qui cette infection n'était ni présente ni en incubation au moment de

l'admission. Ce sont des infections contractées à l'hôpital mais qui se déclarent après la sortie (Ducel *et al.*, 2002).

Les éléments de l'environnement hospitalier constituent un milieu favorable pour la propagation de ces infections nosocomiales lorsque les conditions d'hygiène et les pratiques d'asepsie ne sont pas respectées (Mbutshu *et al.*, 2013) :

- **L'eau** : Joue le rôle de transmetteur de plusieurs bactéries, par exemple la présence de *Legionella* dans les réservoirs d'eau chaude ainsi que la colonisation des siphons d'installation sanitaire, des brise-jets des robinets et des extrémités des canalisations par *Pseudomonas aeruginosa* (Bertrou *et al.*, 2000).
- **L'air** : Les microorganismes de l'air sont véhiculés sur les poussières, les squames cutanées (dans les services de grands brûlés), les gouttelettes ou les microgouttelettes de salive émises lors de la toux, des éternuements et de la parole et les noyaux de condensation issus de ces gouttelettes, donc l'air de l'hôpital intervient dans les conditions habituelles comme un meilleur transporteur de bactéries (Barbut et Neyme, 2006).
- **Les surfaces** : Sont contaminées soit par contact (patients infectés, personnel médical) ou par sédimentation des microorganismes présents dans l'air ; selon l'état de la surface les bactéries peuvent être adhérentes et former des biofilms (Lucet et Astragneau, 1998). Ainsi, les surfaces proches d'un patient servent généralement à un réservoir de bactéries multirésistantes (Barbut et Neyme, 2006).

1.3. Diffusion des bactéries multirésistantes dans l'environnement hospitalier

Les bactéries sont dites multirésistantes aux antibiotiques (BMR) lorsqu'elles ne sont sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutique (Veysiere, 2019). En effet, la multirésistance est considérée comme la résistance à au moins 3 familles d'antibiotiques (Anses, 2014).

Pendant longtemps le problème de la résistance bactérienne aux antibiotiques était lié au milieu hospitalier, ce dernier constitue un environnement propice au développement et à la dissémination de plusieurs BMR à savoir *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (EBLSE),

entérocoque résistant à la vancomycine (ERV), *Acinetobacter baumannii* multirésistant (résistant à la ticarcilline) (ABR) et *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant (PAR) (Fines et Leclercq, 2004).

Parmi les facteurs contribuant non seulement à amplifier le processus de l'antibiorésistance mais aussi à sa diffusion dans le milieu hospitalier (Byarugaba, 2004 ; Sirinavin et Dowell, 2004) :

- L'utilisation massive des antibiotiques et le traitement des patients avec des antibiothérapies inadéquates et parfois avec des doses sous optimales ;
- Le manque d'infrastructure pour le diagnostic étiologique et l'évaluation de la résistance aux antibiotiques ;
- L'absence de réseaux nationaux et régionaux de surveillance de la résistance ;
- L'absence de réglementation pour l'acquisition des antibiotiques.

II. Bactéries responsables des infections nosocomiales

Dans la présente étude, nous nous limitons à décrire les principaux bacilles à Gram négatif et les cocci à Gram positif.

II.1. Entérobactéries

II.1.1. Classification

Les entérobactéries sont en général des hôtes normaux ou pathologiques, suivant les espèces bactériennes, du tube digestif de l'homme et des animaux. Ces bactéries peuvent proliférer en abondance dans l'environnement (sols et eaux) et participer aux grands cycles de dégradation des matières organiques (Prescott *et al.*, 2010).

La classification actuelle des entérobactéries basée sur la génétique moléculaire est la suivante (Delarras, 2007 ; Denis *et al.*, 2007) :

- Règne : *Bacteria*
- Phylum XII : *Proteobacteria*
- Classe : *Gammaproteobacteria*
- Ordre : *Enterobacteriales*
- Famille : *Enterobacteriaceae*

- Genre : Les genres de cette famille sont regroupés en six tribus, d'après leurs propriétés fermentatives : *Escherichiae*, *Klebsielleae*, *Salmonelleae*, *Proteae*, *Yersinia*, *Erwiniae*
- Espèce : 130 espèces sont actuellement répertoriées. Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent aux genres : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* et *Yersinia*.

II.1.2. Caractères généraux

Les entérobactéries sont généralement des bacilles ou des coccobacilles, de taille variant de 2 à 3 µm de long sur 0,4 à 0,6 µm de large. Les espèces sont mobiles grâce à une ciliature péritriche tandis que certaines sont immobiles (Abbott, 2007). Quelques unes possèdent une capsule visible au microscope et la plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des fimbriae ou pili qui sont des facteurs d'adhésion (Bakhoum, 2004 ; Freney, 2007).

Les entérobactéries se croissent facilement sur les milieux ordinaires en 24 heures à 37°C en aérobiose et en anaérobiose, à un pH optimum entre 3,5 et 6,5 et une concentration en NaCl inférieure à 0,2 M. Les colonies d'entérobactéries sont habituellement lisses, brillantes, sur les milieux gélosés de structure homogène (forme S: smooth) qui peut évoluer après cultures successives pour donner des colonies à surface sèche rugueuse (type R: rough) (Denis et al., 2007).

Les caractères biochimiques des entérobactéries étudient principalement le métabolisme protéique (présence d'uréase, production d'indole, dégradation du tryptophane), la fermentation des sucres (glucose, lactose, saccharose etc.), la capacité d'utiliser le citrate, la présence d'enzymes (décarboxylases, désaminases) et la production d'hydrogène sulfuré (Avril et al., 1992). Le tableau 01 représente les principaux caractères biochimiques des principaux genres des entérobactéries.

Tableau 01 : Caractères biochimiques des principaux genres de la famille des *Enterobacteriaceae* (Avril et al., 1992).

	<i>Escherichia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Salmonella</i>
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	-	+	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	-	-
Indole	+	-	+/-	+/-	+	+/-	-
VP	-	-	+/-	+	-	-	-
Citrate	-	+	-	+	-	+/-	+/-
Mobilité	+	+	+/-	-	+	+	+
Urée	-	-	+	+	-	+	-
H ₂ S	-	+/-	-	-	+	+/-	+

(+): test positif, (-): test négatif, ONPG: orthonitrophenyl B-D-galactopyranoside , VP: Voges Prauskauer , H₂S : Hydrogène sulfuré.

II.1.3. Pouvoir pathogène

Les entérobactéries pathogènes sont responsables des infections urinaires, infections intra-abdominales (cholicystites, appendicites), pneumopathies, bactériémies, septicémies et des surinfections respiratoires (Mamod, 2016).

Elles possèdent de nombreux facteurs de virulence qui leur permettent d'exercer une pathogénicité, à titre d'exemple ; les espèces *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* possèdent des adhésines, des sidérophores, des polysaccharides capsulaires et des lipopolysaccharides de surface cellulaire (LSP), qui aident ces bactéries d'attaquer et d'adhérer aux cellules épithéliales des voies respiratoires supérieures, aux cellules du tractus gastro-intestinal, aux cellules endothéliales ou aux cellules uroépithéliales, avant de coloniser les muqueuses, à les quels s'ajoute des toxines cytotoxiques. Les salmonelles disposent aussi d'un arsenal de facteurs de virulence jouant un rôle à différentes étapes du processus infectieux (Janda et Abbott, 2006).

II.1.4. Résistance des entérobactéries aux agents antibactériens

II.1.4.1. Résistance aux antibiotiques

Il existe deux types de résistance aux antibiotiques, la résistance naturelle qui est commune à toutes les bactéries d'une même espèce ou d'un même genre bactérien (due à la présence de gènes chromosomiques communs et transmise à la descendance) et la résistance acquise qui désigne des processus permettant à des bactéries appartenant à une espèce originellement sensible de devenir résistante à un ou plusieurs antibiotiques (due soit par mutation chromosomique, soit par acquisition de matériel génétiques exogènes) (Freney *et al.*, 2000 ; Chopra *et al.*, 2003).

Plusieurs mécanismes soient souvent impliqués simultanément dans la résistance des entérobactéries aux antibiotiques :

- **Résistance aux β -lactamines** : La diminution de la perméabilité (par l'altération des porines par mutation, la modification structurale d'une porine essentielle, ou la diminution quantitative des porines), l'excrétion par des systèmes d'efflux (pompes métaboliques assurant l'expulsion active des produits toxiques), et la production de β -lactamases (enzymes hydrolysant les β -lactamines en ouvrant le cycle Bétalactame et menant à la perte d'un groupement carboxyle, provoquant l'inactivation de l'antibiotique en question) sont les mécanismes les plus répandus (Livermore, 2003 ; Kumar et Schweizer, 2005 ; Robin *et al.*, 2012).
- **Résistance aux aminosides** : Les trois mécanismes de résistance aux aminosides employés par les entérobactéries sont l'altération de la cible ribosomale ou la méthylation de l'ARNr 16S au sein de la sous-unité 30S, le système de transport actif de l'antibiotique et l'inactivation enzymatique qui est le mécanisme le plus fréquent en impliquant les phospho-transférases (catalysent la phosphorylation des groupements hydroxyls), les adényl-transférases (catalysent l'adénylation des groupements hydroxyls) et les acétyl-transférases (catalysent l'acétylation des groupements aminés) (Doi et Arakawa, 2007 ; Durante-Mangoni *et al.*, 2009 ; Baba Ahmed *et al.*, 2014).

- **Résistance aux quinolones** : La résistance aux quinolones est principalement chromosomique, généralement due à une diminution d'affinité de l'antibiotique pour sa cible. Ceci est dû à une modification de l'ADN gyrase et/ou de la topoisomérase IV par mutations ponctuelles. Des gènes de support plasmidique transférable horizontalement ont été également décrits chez des souches d'entérobactéries d'origine hospitalière produisant des BLSE (Belbel *et al.*, 2014 ; Batah *et al.*, 2015).
- **Résistance aux phénicoles** : Certaines entérobactéries résistent au chloramphénicol grâce à une résistance plasmidique due à la production d'enzyme CAT "chloramphénicol acétyltransférase" (Freney *et al.*, 2000).

II.1.4.2. Résistance à autres agents antibactériens

La membrane externe des bactéries à Gram négatif joue le rôle d'une barrière qui inhibe l'entrée des molécules désinfectantes hydrophobes par le biais du lipopolysaccharides. Ce phénomène a été démontré par l'étude de souches d'*Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* mutées au niveau d'un facteur surfacique (McDonnell *et al.*, 1999).

Les entérobactéries peuvent résister aussi aux métaux qui sont utilisés depuis longtemps comme des agents antibactériens. *E.coli* possède de nombreux gènes impliqués dans la résistance au cadmium tel que: *zntA* et *capB*. Ainsi, la surexpression de knock-out et la mutation des gènes *htpX* (qui code pour une protéine de choc thermique membranaire intégrale) et *gor* (qui code pour la glutathion réductase) contribuent positivement à la résistance aux métaux chez *E. coli* (Qin *et al.*, 2019).

II.2. *Acinetobacter baumannii*

II.2.1. Classification

Acinetobacter baumannii est une bactérie ubiquitaire dans l'environnement (Zahoun *et al.*, 2010). Elle fait partie de la flore cutanée normale de l'homme et de l'animal, l'oropharynx et le tube digestif de l'homme (Lambert, 2007). Dans les hôpitaux, ces bactéries sont dispersées chez le patient et son environnement (lit, matelas, tables...) et

dans l'environnement humide (siphons de lavabo, linge humide...) ainsi que sur les mains des soignants (Wendt *et al.*, 1997).

Sa taxonomie est la suivante (Kim *et al.*, 2014) :

- Embranchement : *Proteobacteria*
- Classe : *Gammaproteobacteria*
- Ordre : *Pseudomonadales*
- Famille : *Moraxellaceae*
- Genre : *Acinetobacter*
- Espèce : *Acinetobacter baumannii*.

II.2.2. Caractères généraux

Les *Acinetobacter* sont des coccobacilles courts (les cultures âgées sont très polymorphes), à Gram négatif, non sporulés, parfois capsulés, immobiles (mais pouvant présenter une mobilité par saccade résultant de la présence de fimbriae polaires dans les milieux semi-solides) (Peleg *et al.*, 2008).

Leur culture s'effectue à une température comprise entre 30 et 37 °C sur des milieux conventionnels (gélose au sang, gélose chocolat, gélose trypticase soja, etc.) et sur des milieux sélectifs des bacilles à Gram négatif comme la gélose de Mac Conkey (Denis *et al.*, 2007).

A. baumannii est aérobic stricte, possède une catalase positive et dépourvue d'oxydase (Vanechoutte *et al.*, 2011), nitrates réductase et indole négative (Doughari *et al.*, 2011).

II.2.3. Pouvoir pathogène

A. baumannii est un pathogène nosocomial opportuniste qui infecte majoritairement des patients dont l'état de santé est critique, notamment ceux en soins intensifs (Agodi *et al.*, 2013). Cette espèce est principalement à l'origine d'infections nosocomiales du système respiratoire, de bactériémies, d'infections de plaies ou des infections du système urinaires. De manière moins fréquente, elle est également associée à des cas de méningites (Chopra *et al.*, 2014 ; Freire *et al.*, 2016).

Les principaux facteurs de virulence décelés chez *A. baumannii* sont:

- La protéine OmpA (Outer membrane protéine A): joue un rôle dans l'adhésion aux cellules épithéliales des voies respiratoires, induit l'apoptose, la résistance à certains antibiotiques (par la diminution de la perméabilité membranaire) comme elle participe dans la formation du biofilm (Gaddy *et al.*, 2009 ; Smani *et al.*, 2014 ; Asif *et al.*, 2018) ;
- L'antigène O constitué les lipopolysaccharides (LPS) qui recrute des cellules inflammatoires (Asif *et al.*, 2018).

II.2.4. Résistance d'*Acinetobacter baumannii* aux agents antibactériens

II.2.4.1. Résistance aux antibiotiques

- **Résistance aux β -lactamines** : Cette espèce produit une β -lactamase de type céphalosporinase qui hydrolyse les aminopénicillines et les céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} génération. La résistance naturelle d'*A. baumannii* à certaines β -lactamines se fait par la combinaison de plusieurs mécanismes incluant la taille réduite des protéines de membrane externe et la production limitée des porines (Figueiredo, 2011).
- **Résistance aux aminosides** : Elle est liée à l'inactivation de l'antibiotique par quelques enzymes de modification de type aminoside et à la présence des pompes d'efflux (Cho *et al.*, 2009 ; Moniri *et al.*, 2010 ; Decré, 2012).
- **Résistance aux quinolones** : Elle est due aux mutations dans les gènes *gyrA* et *parC* (Bakour *et al.*, 2014). Toutefois, la résistance aux quinolones pourrait également être due à une diminution et / ou augmentation de l'efflux de quinolones (Jain et Danziger, 2004).

II.2. 4.2. Résistance à autres agents antibactériens

A. baumannii résiste généralement à plusieurs antiseptiques grâce à des pompes d'efflux codées par les gènes *qac* situés sur des éléments mobiles tels qu'intégrons et transposons (Babaei *et al.*, 2015 ; Wassenaar *et al.*, 2015) ;

Cette espèce s'est révélée aussi résistante à divers métaux tels que le mercure, l'argent et l'arsenic (Lima de Silva *et al.*, 2012 ; El-Sayed, 2016).

II.3. *Pseudomonas aeruginosa*

II.3.1. Classification

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie ubiquiste et qui peut être commensal du tube digestif. Elle se multiplie dans des solutions antiseptiques conservées trop longtemps ou dans le matériel hospitalier, tel que les endoscopes (Sorin *et al.*, 2001 ; Lie, 2002).

La classification de cette bactérie est la suivante (Delarras, 2014):

- Règne : *Bacteria*
- Phylum XII : *Proteobacteria*
- Classe : *Gammaproteobacteria*
- Ordre : *Pseudomonadales*
- Famille : *Pseudomonadaceae*
- Genre : *Pseudomonas*
- Espèce : *Pseudomonas aeruginosa*.

II.3.2. caractères généraux

Les *Pseudomonas* sont des bâtonnets à Gram négatif, ils ont une longueur de 1,5 à 3 µm et un diamètre de 0,5 à 0,8 µm, dépourvus de spores et de capsule, mobiles grâce à un flagelle monotriche polaire (Floret *et al.*, 2009).

Les *Pseudomonas aeruginosa* se développent très facilement sur un milieu ordinaire parce-queelles sont oligotrophes, ou sur milieux sélectifs par addition d'inhibiteur (tel que cétrimide), l'incubation se fait à 37°C pendant 24h (Wolfgang *et al.*, 2000). Elles supportent des moindres variations de pH (6,5 à 7,5) avec un pH optimal de 7,2 (Delarras, 2014).

Les *P. aeruginosa* réduisent les nitrates en nitrites, possèdent une oxydase et une gélatinase, les tests indole, H₂S, ONPG sont négatifs ; plusieurs autres caractères sont nécessaires pour le diagnostic d'espèce : TDA, LDC, ODC négatifs et ADH positif (Lie, 2002). *P. aeruginosa* est distinctive grâce à la production des pigments précisément : la pyocyanine

(bleu-vert), la fluorescéine (jaune vert fluorescent) et la pyorubine (brun-rouge) (Khalilzadeh, 2009).

II.3.3. Pouvoir pathogène

P. aeruginosa est responsable d'une liste d'infection longue et non-exhaustive. En tant que pathogène opportuniste, cette bactérie infecte préférentiellement les sujets immunodéprimés ou affaiblis comme les grands brûlés et les cancéreux ce qui explique notamment sa prévalence en milieu hospitalier. La bactérie cause alors préférentiellement l'infection de zones cutanées humides de plaies ou de brûlures ; L'inhalation d'aérosols contaminés constitue une voie de pénétration chez certains individus, notamment des patients atteints de mucoviscidose. Elle peut être aussi à l'origine d'infections digestives (Oie et al., 2008 ; Kerr et al., 2009).

P. aeruginosa possède plusieurs facteurs de virulence (Prescott, 2009 ; Cady, 2006) : des flagelles et des pilis qui lui confèrent d'adhérer aux cellules épithéliales et aux surfaces abiotiques dans la formation du biofilm (Vallet, 2001 ; Lazdunski, 2003), des lipopolysaccharides (LPS) qui protègent la bactérie contre la lyse, des exoenzymes, des exotoxines et des hémolysines (phospholipase C).

II.3.4. Résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux agents antibactériens

II.3.4.1. Résistance aux antibiotiques

Trois familles d'antibiotiques peuvent être utilisées pour lutter contre les infections à *P. aeruginosa* :

- **Résistance aux β -lactamines** : *P. aeruginosa* peut produire un nombre important de bêta-lactamases mais aussi les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu. L'imperméabilité membranaire et les pompes d'efflux sont aussi décrites (Thomson et Bonomo, 2005 ; Barbier et al., 2010).
- **Résistance aux aminosides** : Nombreux mécanismes de résistance à savoir des enzymes modificatrices des aminoglycosides, surexpression des systèmes d'efflux, la modification des ARNr 16S cible des aminosides, ou encore l'imperméabilité (Sohidul, 2008 ; Strateva et Yordanov, 2009).

- **Résistance aux quinolones:** *P. aeruginosa* résiste contre ces antibiotiques, soit par des mutations au niveau de l'ADN gyrase et l'ADN topoisomérase IV, soit par la surexpression d'efflux actif (Akasaka *et al.*, 2001; Mérens et Aurélie, 2010).

II.3.4.2. Résistance à autres agents antibactériens

P. aeruginosa apparaît généralement comme la bactérie la plus résistante aux désinfectants et aux détergents. Cette résistance est due à la combinaison de l'imperméabilité de la membrane externe et la présence de multiples pompes à efflux (Russell, 2002).

Le gène *CopR* est responsable de la résistance des *P. aeruginosa* au cuivre et la tolérance au zinc en régulant le système CzcRS (un système à deux composants régulant la transcription) (Caille *et al.*, 2007).

Un autre mécanisme important de résistance aux différents agents antibactériens pour la bactérie *P. aeruginosa* est sa forte capacité à former des biofilms (Mah et O'toole, 2001).

II.4. *Aeromonas hydrophila*

II.4.1. Classification

Aeromonas hydrophila est d'origine hydrique, largement retrouvées dans les environnements aquatiques et terrestres (Nam et Joh, 2007). Sa classification est la suivante (Harf-Monteil *et al.*, 2007) :

- Règne : *Bacteria*
- Phylum XII : *Proteobacteria*
- Classe : *Gammaproteobacteria*
- Ordre : *Aeromonadales*
- Famille : *Aeromonadaceae*
- Genre : *Aeromonas*
- Espèce : *Aeromonas hydrophila*.

II.4.2. caractères généraux

Aeromonas hydrophila est un bacille à extrémités arrondies ou coccobacille, Gram négatif, mobile, non capsulé. Elle a la capacité de se croître sur gélose Columbia au sang, Mac Conkey, éosine bleu de méthylène et Drigalski. (Mary *et al.*, 2002 ; Danielle, 2010).

A. hydrophila possède un métabolisme aéro-anaérobie facultatif, fermente le glucose mais ne fermente pas le lactose, aussi son identification repose sur la positivité des tests de l'oxydase, catalase, production de gaz, indole, ADH, LDC, VP, ONPG, gélatine, saccharose, D-Mannitol et bêta-hémolyse. (Harf-Monteil et Monteil, 2007).

II.4.3. Pouvoir pathogène

La bactérie cause principalement des gastroentérites, des infections cutanéomuqueuses, des infections hépatobiliaires, des infections des voies urinaires chez le nouveau-né, des toxi-infections alimentaires et plus rarement des bactériémies, des septicémies et des méningites surtout chez les immunodéprimés (Laganowska et Kaznowski, 2004 ; Hochedez *et al.*, 2009 ; Tena *et al.*, 2009).

L'espèce *A. hydrophila* possède plusieurs facteurs de virulence parmi lesquels les flagelles polaires et les pilis responsables de l'adhérence aux érythrocytes et aux cellules épithéliales, des capsules qui montrent une activité anti-phagocytaire, augmentant l'adhérence et la résistance au système du complément, ainsi la bactérie a des hémolysines et des aérolysines (Sechi *et al.*, 2002).

II.4.4. Résistance d'*Aeromonas hydrophila* aux agents antibactériens

II.4.4.1. Résistance aux antibiotiques

- **Résistance aux β -lactamines** : *A. hydrophila* résiste à cette famille par la production de trois types de β -lactamases : une céphalosporinase, une oxacillinase et une carbapénèmase ;
- Pour les autres familles d'antibiotique tel que les fluoroquinolones et les aminosides, les *Aeromonas* sont sensibles à ces molécules (Danielle, 2010).

II.4.4.2. Résistance à autres agents antibactériens

A. hydrophila résiste aux désinfectants en empêchant leur entrée grâce à la membrane externe de ces bactéries (McDonnell *et al.*, 1999). En revanche, plusieurs études ont montrés que l'hypochlorite de sodium à 1 %, glutaraldéhyde à 2 %, l'éthanol à 70 %, produits iodés, composés phénoliques, formaldéhyde, l'argent dissous dans l'eau et le chlore libre ont une activité biocide sur cette espèce (Massa, 2003 ; Silvestry-Rodriguez *et al.*, 2007).

D'autres études ont montrés une résistance aux métaux lourds (plomb, cuivre) et une sensibilité au cadmium chez *A. hydrophila* (Akinbowale *et al.*, 2007).

II.5. *Staphylococcus aureus*

II.5.1. Classification

Staphylococcus aureus est une espèce ubiquiste et elle fait partie de la flore commensale normale des mammifères. Selon la 9^{ème} édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, les staphylocoques sont classés parmi les bactéries à Gram positif pauvres en GC dans (Prescott *et al.*, 2010):

- Phylum : *Firmicutes*
- Classe : *Bacilli*
- Ordre : *Bacillales*
- Famille : *Staphylococcaceae*
- Genre : *Staphylococcus*
- Espèce : *Staphylococcus aureus*.

II.5.2. Caractères généraux

S. aureus est un cocci à Gram positif (sous forme de grappes de raisin) a un diamètre de 0,5 à 1,5µm, immobile, non sporulé, majoritairement capsulé mais il peut perdre sa capsule après culture (Batard *et al.*, 2007 ; Robert, 2013).

Les staphylocoques dorés sont des germes peu exigeants qui se cultivent facilement sur milieux ordinaires à des températures optimales de 30 à 37 °C et un pH optimal compris

entre 7 à 7,5, également ces bactéries peuvent développées sur le milieu sélectif Chapman (7,5 % de NaCl) (Ananthanarayan et Paniker, 2006 ; Denis *et al.*, 2007).

Les *S. aureus* ont un métabolisme aérobie prédominant et anaérobie facultatif, elles possèdent une catalase, coagulase, et une nucléase thermostable positive, mais ne produisent pas l'oxydase. Elles se caractérisent aussi par une acétone, uréase, VP et RM positifs, produisant de l'ammoniaque à partir de l'arginine, réduisant le téllurite de potassium et les nitrates en nitrites (Freney *et al.*, 1999 ; Figarella, 2004).

II.5.3. Pouvoir pathogène

S. aureus est pathogène surtout pour les âgées, les enfants ou les immunodéprimés, ayant un système immunitaire moins compétents et plus affaibli (Maltezou et Giamarellou, 2006).

Elle est responsable des infections de la peau et des tissus mous, d'endocardites et de pneumonies, des bactériémies et des toxi-infections alimentaires (Boucher et Corey, 2008).

S. aureus possède certains facteurs responsables de sa virulence: une capsule ou une couche externe polysaccharidique dénommée "slime" qui facilite son adhérence aux cellules endothéliales épithéliales et aux monocytes et confère à la bactérie une résistance contre le système immunitaire de l'hôte et des antigènes pariétaux constitués par le peptidoglycane. (Freney *et al.*, 2000 ; Cunnion *et al.*, 2003). Les acides teichoïques (composés des polymères linéaires à base de polyribitol) sont impliqués dans la formation de biofilm et la résistance aux β -lactames dans les souches résistantes à la méticilline (Xia *et al.*, 2010).

II.5.4. Résistance de *Staphylococcus aureus* aux agents antibactériens

II.5.4.1. Résistance aux antibiotiques

- **Résistance aux β -lactamines** : Les staphylocoques résistent à la pénicilline G et V, les aminopénicillines, les carboxypénicillines et les ureidopénicillines par ouverture du cycle β -lactame grâce à la production d'une pénicillinase codée par le gène plasmidique *blaZ* (Robert, 2013). Une hyperproduction de la pénicillinase ou une modification des protéines de liaison à la pénicilline endogènes sont des mécanismes de résistance chez les *S.aureus* vis-à-vis de la méticilline (Denis *et al.*, 2016).

- **Résistance aux glycopeptides** : Multiples mutations chez les *S. aureus* conduit à une diminution de la pénétration des glycopeptides ce qui augmente le nombre des sites D-alanine-D-alanine disponibles pour fixer principalement la vancomycine (Cosgrove *et al.*, 2004).
- **Résistance aux aminosides**: Elle est liée à l'acquisition via des transposons ou des plasmides d'enzymes inactivant ces antibiotiques et à l'altération de la cible ribosomale (Rebiahi, 2012).

II.5.4.2. Résistance à autres agents antibactériens

La résistance des bactéries à Gram positif aux biocides est assurée par la rigidité de la paroi cellulaire qui est constituée de peptidoglycanes formée de chaînes polysaccharidiques linéaires (Hancock, 1991). Parmi les gènes impliqués à la résistance aux biocides: le gène *psk* code pour la résistance à la chlorhexidine, gène *qac* code pour la résistance aux ammoniums quaternaires et à la chlorhexidine et le gène *mer* code pour la résistance aux dérivés mercuriels (Crémieux et Freney, 1995).

Certaines études ont montré que *S.aureus* est plus résistante au cadmium, et au zinc (DagmarChudobova *et al.*, 2014). Par contre, Weaver *et al.* (2010) ont montré que le cuivre a un effet néfaste sur le matériel génomique de souches de *S.aureus* résistantes à la méthicilline.

II.6. *Streptococcus pneumoniae*

II.6.1. Classification

Streptococcus pneumoniae colonise fréquemment les voies respiratoires de l'homme. Son habitat principal est constitué par le rhino- pharynx (Avril *et al.*, 2000).

La position taxonomique de *St. pneumoniae* est la suivante (Brisou *et al.*, 2004) :

- Règne : *Bacteria*
- Phylum : *Firmicutes*
- Classe : *Bacilli*

- Ordre : *Lactobacillales*
- Famille : *Streptococcaceae*
- Genre : *Streptococcus*
- Espèce : *Streptococcus pneumoniae*.

II.6.2. Caractères généraux

Le pneumocoque se présente comme un cocci Gram positif, généralement capsulé d'allure lancéolée (en flamme de bougie), typiquement groupé par deux (diplocoque) ou parfois de manière isolée en chaînette (Vergnaud *et al.*, 2001).

La culture de *St. pneumoniae* nécessite l'adjonction de facteurs de croissance. Les milieux de cultures les plus utilisés sont la gélose Columbia, la gélose Trypticase soja et la gélose Chocolat incorporés de 1 % d'hémoglobine et un mélange poly vitaminique (Thierry *et al.*, 2007).

Les pneumocoques sont catalase et oxydase négative, fermente le lactose, le raffinose, le saccharose et le glucose sans production de gaz. Cependant, *St. pneumoniae* provoque une acidification et une coagulation du lait (Avril *et al.*, 2000 ; Bere, 2010).

II.6.3. Pouvoir pathogène

St. pneumoniae est un pathogène majeur, responsable d'infections communautaires à type de pneumonies, de bactériémies, de méningites, d'otites et de sinusites, bronchites et aussi des arthrites, urétrites et péritonites (Bouskraoui *et al.*, 2017).

Les propriétés antigéniques de pneumocoque responsables de sa virulence sont : les antigènes capsulaires, les antigènes somatiques qui synthétisent ou détruisent le peptidoglycane, les autolysines, les protéines de structure, et les protéines liantes la pénicilline (Bere, 2010). Aussi, une capsule qui assure la résistance à la phagocytose des macrophages dans les alvéoles pulmonaires, une pneumolysine responsable d'une diminution de l'activité bactéricide des monocytes et des polynucléaires neutrophiles (Rieux, 2002).

II.6.4. Résistance de *Streptococcus pneumoniae* aux agents antibactériens

II.6.4.1. Résistance aux antibiotiques

- **Résistance aux β -lactamines** : La diminution de la sensibilité aux β -lactamines chez *St. pneumoniae* provient de modifications qualitatives et quantitatives de leurs cibles et des protéines de liaison à la pénicilline (PLP) (Varon et Houssaye, 2006).
- **Résistance aux aminosides** : *St. pneumoniae* résiste naturellement aux aminosides, exceptionnellement à la gentamicine et fréquemment à la kanamycine, la résistance à la kanamycine est due par le gène de résistance *tet M* et *erm B* (Chardon, 2008).
- **Résistance aux fluoroquinolones** : Elle est liée à des mutations dans l'une ou l'autre des deux cibles qui sont la gyrase et la topoisomérase IV et à l'augmentation d'un efflux actif (Gillespie et al., 2003).

II.6.4.2. Résistance à autre agents antibactériens

St. pneumoniae utilise du glutathion pour se défendre contre les concentrations toxiques d'ions métalliques (Adam et al., 2012).

Malgré la structure de la paroi des *S. pneumoniae*, mais cette espèce est sensible à plusieurs désinfectants comme le Glutaraldéhyde à 0,5 %, l'hypochlorite de sodium à 1 %, l'iode, l'éthanol à 70 % et le formaldéhyde surtout à des températures au-dessus de 20 °C (Moreland et Bailey, 2006).

III. Biofilm et environnement hospitalier

III.1. Mécanisme de formation des biofilms

Les biofilms sont généralement définis comme des agrégats de cellules microbiennes attachés à une surface et enrobés d'une matrice polymérique extracellulaire. Cette organisation permet aux bactéries de se maintenir dans une niche écologique et de résister à de nombreux stress environnementaux (Hall-Stoodley et al., 2004 ; Hall-Stoodley et Stoodley, 2009).

Les différentes études montrent que les biofilms se forment de la même manière quel que soit l'environnement qu'ils colonisent. Les étapes de leur formation sont les suivantes (Figure.01) (John *et al.*, 2006):

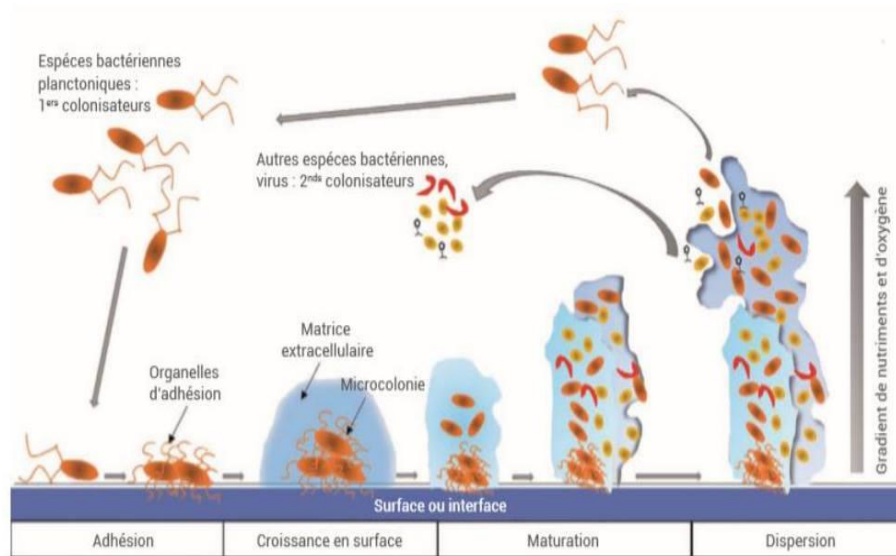


Figure 01 : Étapes de la formation d'un biofilm bactérien (Douarche *et al.*, 2018).

- **Conditionnement des nutriments et transfert des cellules bactériennes sur la surface :**

Les surfaces adsorbent généralement des molécules de faible poids moléculaire, des molécules hydrophobes, des polysaccharides complexes, des glycoprotéines, des lipides et des composés humiques ; Ce film peut constituer alors un micro-environnement favorable à l'adhésion stable des bactéries. Le transfert des cellules bactériennes est lié à des phénomènes de nature physicochimique et biologique (sédimentation, transport diffusif, mouvements flagellaires...) (Palmer *et al.*, 2007). Certaines bactéries sont capables d'établir un contact avec une surface par des mécanismes de signalisation et d'exprimer par la suite des adhésines à leur surface. Ce mécanisme est appelé « *Quorum Sensing* » (Wang *et al.*, 2004).

- **Adhésion des microorganismes sur la surface conditionnée :**

Deux phases d'adhésion correspondent à une fixation active et spécifique des micro-organismes sur une surface : une adhésion réversible qui est le résultat de l'interaction entre

les bactéries et un substrat solide pendant un certain temps et les cellules peuvent se détacher, et une adhésion irréversible qui intervient dans un deuxième temps grâce à la sécrétion d'exo-polymères par les bactéries permettant de consolider leur fixation au support. Dans ce cas des interactions fortes s'établissent entre la bactérie et la surface avec des liaisons de type hydrophobe (Aye, 2015).

- **Croissance, colonisation et maturation:**

Après leur attachement à la surface, les bactéries vont se multiplier et s'accumuler. Cette phase est caractérisée par l'agrégation intercellulaire pouvant s'accomplir par une variété de molécules telles que les protéines d'adhésion ou le plus souvent par les exopolymères polysaccharidiques, et la structuration conduisant à l'obtention d'une communauté mature, multicouche contenant des canaux qui permettent le passage des nutriments pour les bactéries présentes à l'intérieur du biofilm (Otto, 2008).

- **Migration et déplacement des agrégats :**

C'est une phase de dispersion où les microorganismes redeviennent libres de circulation lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (diminution de la concentration ou modification de la nature des nutriments disponibles...). Ce phénomène permet ainsi aux cellules de migrer vers des niches plus favorables (Ardre, 2014 ; Yannick *et al.*, 2014 ; Aye, 2015).

III.2. Diversité des bactéries dans les biofilms du milieu hospitalier

Plusieurs bactéries sont responsables de la formation du biofilm en milieu hospitalier, le rôle de ce dernier dans l'apparition de maladies infectieuses a été clairement démontré par des épreuves épidémiologiques (Harriott et Noverr, 2011). Les bactéries formatrices de biofilm proviennent généralement de la flore du patient, de l'environnement ou de la microflore exogène transitoire véhiculée par le personnel hospitalier (Seghir *et al.*, 2016).

Parmi les bactéries formatrices de biofilm dans l'environnement hospitalier:

- **Entérobactéries** : Nombreux facteurs de virulence décrits chez les entérobactéries comme certaines souches d'*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* sont connus pour être impliqués à des degrés divers dans la formation de biofilms. Parmi ces facteurs :

les flagelles et les pilis, la présence des polysaccharides capsulaires, et l'intervention du système *Quorum Sensing* à travers une synthèse d'autoinducteurs (AL-2) (Goller, 2008 ; Sleen et al., 2012).

- ***Pseudomonas aeruginosa*** : De nombreux facteurs comme les fimbriaes et les flagelles participent à l'adhésion de cette bactérie soit sur les cellules soit sur les surfaces abiotiques. Le pili de type IV permette le rassemblement en micro colonies (Bricha et al., 2009 ; Xu et Wozniak, 2015).
- ***Legionella pneumophila*** : L'agent de légionellose a de nombreux facteur qui lui confère une capacité de formation de biofilm : une adhésine (Mallegol et al., 2012), un pilus de type IV (Yaradou et al., 2007) et des voies de signalisation utilisant le messenger secondaire diGMP cyclique qui a la capacité d'activer ou de réprimer l'expression de gène lorsque la bactérie se trouve à proximité d'une surface (Römling et al., 2013).
- ***Acinetobacter baumannii*** : Les souches cliniques peuvent former un biofilm sur les surfaces abiotiques (Wroblewska et al., 2008). L'opéron CsuA/BABCDE, la protéine Bap exprimée à la surface et le poly- β -1,6-N-acétylglucosamine (PNAG) jouent un rôle dans l'adhésion et la maturation du biofilm (Longo et al., 2014).
- ***Staphylococcus aureus*** : La capacité de former un biofilm chez *S. aureus* est liée à la présence des MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules), comme le fibrinogène ou la fibronectine, des acides teichoïques et lipotéichoïques qui joue un rôle dans l'attachement sur une surface (Gross et al., 2001 ; Gotz, 2002).

III.3. Stratégies antibiofilm

La lutte contre les biofilms peut se définir selon deux axes principaux : empêcher la formation de biofilms, et lorsqu'ils sont déjà présents, les détruire. Plusieurs moyens sont utilisés :

- Le nettoyage mécanique et la désinfection restent un moyen efficace pour détruire les biofilms indésirables. En revanche, la plupart des antiseptiques et désinfectants ont du mal à pénétrer au sein des biofilms ce qui diminue l'efficacité de cette méthode (Widmer et Dettenkofer, 2006) ;

- La modification physique de la surface est un bon moyen pour réduire l'interaction de la bactérie avec un support. Idéalement, la surface doit être la plus lisse possible puisque la rugosité favorise la colonisation microbienne (Little et Wagner, 1993). Des études montrent que le greffage des surfaces par de têtes lipidiques comme la phosphorylcholine limite l'adhésion irréversible des protéines sur la surface (Navarro et al., 2001) ;
- L'élaboration des surfaces à revêtements antimicrobiens par incorporation d'agents antimicrobiens via leur adsorption sur la surface après ou durant la fabrication du matériau. Cette stratégie a pour objectif non seulement de repousser les micro-organismes mais de les tuer (Malcher et al., 2008) ;
- Les peintures antifouling contenant un agent actif sont actuellement très utilisées pour empêcher la fixation des bactéries. De faibles concentrations de zinc ou de cuivre pouvaient inhiber la formation de biofilm chez diverses bactéries pathogènes (Wu et al., 2013) ;
- D'autres stratégies ont également montré une capacité de lutter contre la formation des biofilms à savoir l'utilisation de la furanone (molécule extraite d'une algue marine) et le miel de châtaignier qui contiennent un inhibiteur du *Quorum Sensing* pouvant réduire la formation d'un biofilm chez diverses bactéries à Gram-négatif (Truchado et al., 2009 ; Labrie et al., 2010). La dispersine B est une enzyme bactérienne capable de dégrader le polymère de N-acétyl-glucosamine de la matrice du biofilm de plusieurs espèces bactériennes dont *S. aureus*, *S. epidermidis* et *E. coli* (Kerrigan et al., 2008). Les bactériophages provoquent aussi la dispersion du biofilm mais un cocktail composé de plusieurs bactériophages soit nécessaire afin d'être efficace pour un groupe de bactéries bien précis (Donlan, 2009).

Chapitre II :

Étude

expérimentale

I. Cadre d'étude

Deux groupes bactériens ont été choisis pour la présente étude : les bacilles à Gram négatif et les cocci à Gram positif. Le choix de ces bactéries est basé sur:

- ✓ Leur caractère ubiquitaire dans l'environnement ;
- ✓ Leur sensibilité différente vis-à-vis aux agents antibactériens ;
- ✓ Leur capacité de former un biofilm.

Ces souches ont été isolées de divers sites de l'environnement hospitalier, en particulier au niveau des sanitaires de trois établissements publics hospitaliers, situés dans la commune de la Wilaya de Guelma:

- **Hôpital Ibn Zohr** : Établissement public hospitalier a une capacité d'accueil de 220 lits, il a différents services à savoir l'infectiologie, l'hématologie, la pneumo-phtisiologie, l'hémodialyse, service d'oncologie, d'acupuncture et physiothérapie et un nouveau service d'urgence ;
- **Hôpital El-hakim Okbi** : Il est constitué d'une structure de diagnostic, de soins, d'hospitalisation et de réadaptation médicale couvrant la population d'un ensemble de communes. Cet hôpital a une capacité d'accueil de 311 lits. Il comporte plusieurs services de médecine interne, de cardiologie, d'urgences médico-chirurgicales, d'hémodialyse, d'imagerie médicale, de gynécologie, de maternité, de néonatalogie, de chirurgie générale et urologie, d'orthopédie et traumatologie, d'ORL et Maxillo-faciale, d'ophtalmologie, de néphrologie et de réanimation médicale ;
- **Complexe Mère-enfant** : Établissement hospitalier spécialisé représente le service pédiatrique opérationnel.

Les dates et les sites de prélèvements réalisés au cours de cette étude sont détaillés dans le tableau 02. Les différentes manipulations microbiologiques ont été réalisées au niveau du Laboratoire de Microbiologie de Département de Biologie à l'Université 8 Mai 1945 de Guelma.

II. Échantillonnage et technique de prélèvement

II.1. Échantillonnage

Les prélèvements ont été réalisés à partir de 15 différents sites environnementaux (Tableau 02). Ces points de prélèvement sont classés parmi les zones à risque pour les patients et les visiteurs (Sefraoui, 2015 ; Zenati *et al.*, 2015). Les prélèvements ont été effectués le matin après le nettoyage et/ ou la désinfection quotidienne.

Tableau 02: Sites de prélèvement au niveau des sanitaires de différents établissements hospitaliers.

Établissement hospitalier	Numéro de prélèvement	Site de prélèvement	Matériaux du site de prélèvement	Date de prélèvement
Hôpital Ibn Zohr	P1	Poignée de la porte (WC)	Acier inoxydable	18/02/2020
	P2	Évier	Céramique	18/02/2020
	P3	Boite savon liquide (WC)	Plastique	18/02/2020
	P4	Avaloire de lavabo	Acier inoxydable	18/02/2020
	P5	Cuvette toilette	Céramique	18/02/2020
Hôpital El-hakim Okbi	P6	Évier	Céramique	18/02/2020
	P7	Réservoir chasse d'eau	Céramique	18/02/2020
	P8	Bac à ordures	Plastique	18/02/2020
	P9	Cuvette toilette	Céramique	18/02/2020
	P10	Poignée de la porte (WC)	Aluminium	18/02/2020
Complexe «Mère et enfant »	P11	Poignée de robinet	Acier inoxydable	18/02/2020
	P12	Évier	Céramique	18/02/2020
	P13	Avaloire de lavabo	Acier inoxydable	18/02/2020
	P14	Réservoir chasse d'eau	Céramique	18/02/2020
	P15	Cuvette toilette	Céramique	18/02/2020

II.2. Technique de prélèvement

La technique de prélèvement utilisée est la méthode d'écouvillonnage qui consiste à (Lebreton *et al.*, 1998) :

- Frotter sur la surface sèche à analyser, l'extrémité cotonnée de l'écouvillon préalablement humidifiée à l'aide d'eau physiologique ;
- Tremper l'écouvillon et agiter dans un tube contenant 10 ml du bouillon nutritif ;
Pour les surfaces humides, il suffit de frotter directement sans l'utilisation de l'eau physiologique.

Les échantillons ainsi prélevés ont été rapidement transportés au laboratoire de microbiologie où ils sont incubés à 37°C pendant 24 heures jusqu'à l'apparition de culture bactérienne. Cette étape permet la croissance des bactéries, ce qui facilitera leurs cultures sur les milieux d'isolement (Guiraud, 2003).

III. Méthodologie

III.1. Isolement et identification phénotypique des souches bactériennes

Le schéma 01 illustre l'étape d'isolement et d'identification des deux groupes bactériens à étudier.

III.1.1. Isolement des souches bactériennes

À partir des milieux d'enrichissements présentant une croissance bactérienne, nous avonsensemencé 03 milieux de culture :

- La gélose *Salmonella-Shigella* (SS) : c'est le milieu sélectif des salmonelles et des shigelles. Il contient du vert brillant, sels biliaires et de fortes concentrations en thiosulfates et en citrate inhibent totalement la croissance de la microflore secondaire Gram positive ainsi que celle de nombreux coliformes et *Proteus* (Larpent, 1997) ;
- La gélose Hektoen : C'est un milieu sélectif pour les entérobactéries pathogènes, il permet une première orientation quant à l'identification de l'espèce isolée sur la base de l'attaque de trois glucides : lactose, salicine et saccharose. Une différenciation supplémentaire (présence de thiosulfate et de citrate de fer dans le milieu) qui se traduit par des colonies à centre noir dû à la formation de sulfure de fer (Larpent, 1997) ;
- La gélose Chapman : C'est un milieu qui contient un inhibiteur de fortes concentrations en chlorure de sodium (75g.L⁻¹), ce qui permet un isolement sélectif de staphylocoques tolérant les fortes concentrations en NaCl (Delarras, 2014).

Tous les milieux ensemencés sont incubés à 37°C pendant 24 heures.

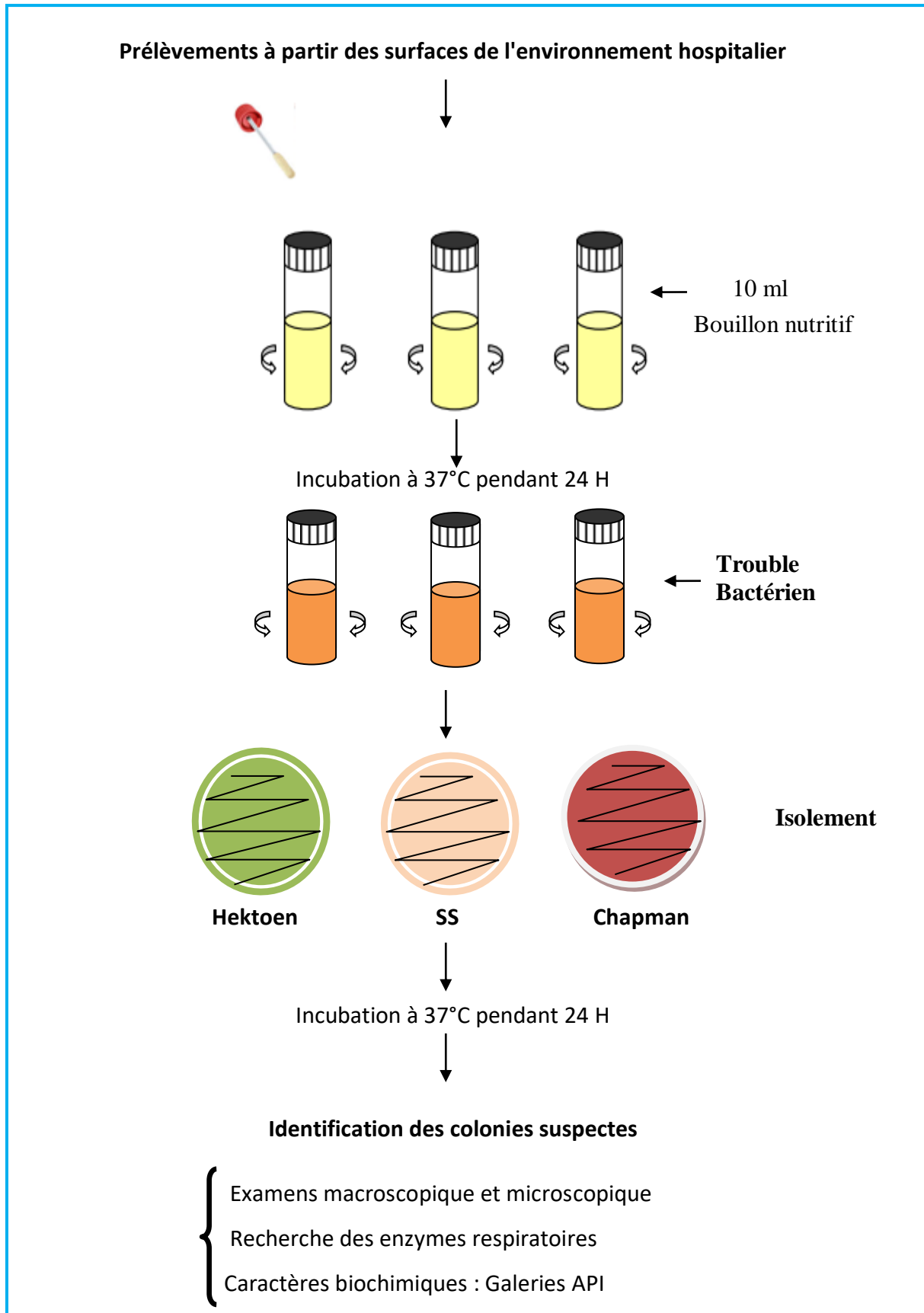


Schéma 01 : Isolement et identification des souches bactériennes.

III.1.2. Identification phénotypique des souches bactériennes

III.1.2.1. Identification morphologique

- **Examen macroscopique**

L'identification macroscopique des germes est basée sur l'observation de l'aspect macroscopique des colonies obtenues (la taille, la forme, la couleur, la consistance, l'opacité, l'allure du contour) (Delarras, 2007).

L'aspect des colonies qui apparaissent généralement sur chaque milieu de culture utilisé et les bactéries suspectes sont représenté dans le tableau 03.

Tableau 03 : Aspect macroscopique des bactéries apparaissant sur les milieux de culture sélectifs utilisés (Guiraud, 2003 ; Rodier *et al.*, 2005 ; Delarras, 2007).

Milieu d'isolement	Aspects des colonies	Bactéries suspectes
Hektoen	<ul style="list-style-type: none"> - Colonie jaune saumon sans centre noir. - Colonie jaune saumon à centre noir. - Colonie verte ou bleuâtre sans centre noir. - Colonie verte bleuâtre à centre noir. 	<ul style="list-style-type: none"> - Coliformes, <i>Serratia</i>, <i>Arizona</i>, <i>Levinea</i>, <i>Yersinia</i>. - <i>Chryseobacterium indologenes</i>. - <i>Citrobacter freundii</i>, <i>Proteus vulgaris</i>. - <i>Shigella</i>, <i>Salmonella</i> à H₂S (-), <i>Providentia</i>, <i>Proteus morganii</i>, <i>Proteus rettgeri</i>. - <i>Salmonella</i>, <i>Proteus mirabilis</i>.
<i>Salmonella</i>-<i>Shigella</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Colonie rouge. - Colonie rouge à centre noir. - Colonie incolore. - Colonie incolore à centre noir. 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Enterobacter</i>, <i>Klebsiella</i>, autres coliformes (<i>E.coli</i>). - <i>Citrobacter freundii</i>, <i>Arizona</i>. - <i>Salmonella</i> H₂S (-), <i>Shigella</i>, <i>Serratia</i>, <i>Alkalescens</i>, <i>Enterobacter hafniae</i>, <i>Proteus morganii</i>. - <i>Salmonella</i> H₂S (+), <i>Proteus vulgaris</i>, <i>Proteus mirabilis</i>.

Tableau 03 (Suite) :

Chapman	<ul style="list-style-type: none"> - Colonie jaune entouré d'une zone jaune, mannitol (+). - Colonie rose - rouge ou pourpre, mannitol (-). 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i>. - <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Staphylococcus scieri</i> <i>Micrococcus varians</i> <i>Micrococcus leteus</i>.
---------	---	---

- **Examen microscopique**

L'aspect microscopique des bactéries isolées a été observé par une coloration de Gram.

Coloration de Gram

Cette coloration aide à déterminer deux grands groupes bactériens : les Gram positif et les Gram négatif. Elle permet aussi de connaître la morphologie et le mode de regroupement des bactéries (Degrement, 1998).

Technique

La coloration de Gram ou coloration différentielle s'effectue de la manière suivante :

- Préparation d'un frottis bactérien : prélever la colonie bactérienne à identifier, et l'étaler sur une goutte d'eau physiologique déposée sur une lame propre puis la fixer par simple passage sur la flamme du bec bunsen ;
- Coloration par le violet : chaque frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de Gentiane, il est ensuite laver rapidement par l'eau courante ;
- Mordantage : traiter durant une minute par la solution de Lugol et laver à l'eau ;
- Décoloration : en traitant avec l'alcool, couler le solvant sur frottis pendant une à trois secondes puis laver immédiatement à l'eau courante. À ce stade, les cellules Gram négatives seront incolores, les cellules Gram positives restent violettes ;
- Recoloration : soumettre le frottis durant 30 secondes à une courte coloration par la fuchsine pour recolorer les cellules Gram négatives présentes puis rincer et sécher entre deux feuille de papier buvard propre ;
- Examiner le frottis, à immersion à l'objectif ×100.

Lecture

Les bactéries à Gram positif sont bien colorées en violet alors que les bactéries à Gram négatif sont bien colorées en rose (Prescott *et al.*, 1999).

III.1.2.2. Recherche des enzymes respiratoires

Trois enzymes respiratoires sont recherchées : l'oxydase, la catalase et la nitrate réductase (Tableau 04).

Tableau 04: Recherche des enzymes respiratoires.

Enzyme	Propriété	Technique	Lecture	Référence
Catalase	Dégrade le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	<ul style="list-style-type: none"> • Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur ; • Prélever un fragment de la colonie à étudier ; • Dissocier la colonie dans la goutte. 	<ul style="list-style-type: none"> • Catalase positive : Apparition des bulles de gaz, la bactérie possède la catalase. • Catalase négative : Absence des bulles de gaz, la bactérie ne possède pas la catalase. 	(Guiraud, 2003)
Oxydase	Catalyse les réactions d'oxydo-réduction	<ul style="list-style-type: none"> • Déposer le disque d'oxydase sur une lame propre, l'humidifier avec deux gouttes d'eau distillée stérile ; • Ecraser la colonie testée sur le disque. 	<ul style="list-style-type: none"> • Oxydase positif : Colonie prend une couleur violette. • Oxydase négatif : Colonie reste incolore, donc absence d'enzyme recherché. 	(Prescott <i>et al.</i> , 1999)
Nitrate réductase	Réduire le nitrate en nitrite	<ul style="list-style-type: none"> • Ensemencer le bouillon nitraté ; Après culture, ajouter à la surface du milieu 3 gouttes d'acide sulfanilique (NITI) puis 3 gouttes d'alpha naphtylamine (NIT II) ; • Mélanger et observer. 	<ul style="list-style-type: none"> • Le milieu devient rouge, présence de nitrite. La bactérie possède la nitrate réductase. • Pas de coloration, on ajoute la poudre du zinc : <ul style="list-style-type: none"> - milieu incolore : test (+); - Coloration rouge: test (-). 	(Guiraud, 2003)

III.1.2.3. Identification biochimique

L'étude des caractères biochimiques des différentes bactéries isolées a été réalisée grâce à la galerie biochimique classique pour les cocci à Gram (+) et par les galeries biochimiques miniaturisées API pour les bacilles à Gram (-).

- **Biotypage par galerie biochimique classique**

Les tests biochimiques qui ont été effectués dans la présente étude sont résumés dans le tableau 05.

Tableau 05: Tests biochimiques utilisés pour l'identification des cocci à Gram positif.

Test	But	Technique/ Lecture	Référence
Fermentation des sucres avec ou sans gaz + Production d'H₂S	Utilisation du glucose, saccharose et lactose. -Production d'H ₂ S. -Production de gaz	- Ensemencer la pente du milieu TSI par stries et le culot par simple pique ; - Après 24H à 37°C, la pente jaune = fermentation du lactose/saccharose ; culot jaune = fermentation du glucose ; noircissement= H ₂ S+, bulles gazeuses = production du gaz.	Delarras (2003)
RM (Rouge de Méthyl)	Mise en évidence de la voie des fermentations des acides mixte	- Ensemencer largement le milieu Clark et Lubs ; - Incuber à 37°C pendant 24 H; - Ajouter 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle ; - La lecture est immédiate : Milieu rouge : RM (+) ; Milieu jaune: RM (-).	Guiraud (2003)
VP (Voges Proskauer)	Production de l'acétoïne.	-Ensemencer largement le milieu Clark et Lubs. -Incuber à 37°C pendant 24H. Après culture : -Ajouter 2 à 3 gouttes de VPI et attendre 10 minutes ; puis ajouter 2 à 3 gouttes de VP II : <ul style="list-style-type: none"> • Milieu rouge : VP (+) ; • Milieu jaune: VP (-). 	Delarras (2003)
Citrate de Simmons	Utilisation du citrate comme seule source de carbone	- Ensemencer la pente du milieu Citrate de Simmons par une strie longitudinale ; - Incuber 24 H à 37°C ; - Virage de la couleur du milieu vers le bleu (alcalinisation de milieu) : résultat positive, la bactérie utilise le citrate.	Delarras (2003)

Tableau 05 (suite) :

Test	But	Technique/ Lecture	Référence
Urée Indole TDA	- Uréase - Formation d'indole - Tryptophane désaminase	- Faire une suspension en milieu Urée-indole ; - Incuber à 37° C pendant 24h ; - Uréase (+) : Apparition de couleur rose. - Indole(+) : Après l'ajout du réactif de Kowacs, apparition d'un anneau rouge à la surface. - TDA (+) : Après l'ajout du réactif TDA, apparition d'un précipité brun foncé.	Delarras (2003)
Mannitol Mobilité	-Fermentation du Mannitol -Mobilité	- Ensemencer le milieu Mannitol-Mobilité par piqûre centrale à l'aide d'un fil droit ; - Incuber à 37° C pendant 24 H ; - Mannitol (+): Apparition de couleur jaune. - Mobilité : Les bactéries très mobiles peuvent se déplacer dans la gélose molle (formation d'un voile autour de la piqure).	Guiraud (2003)
ONPG (ortho- nitrophényl- β- galactopyranoside)	Présence de β- galactosidase qui a la capacité d'hydrolyser la liaison osidique de β-galactoside donnant le galactose et le glucose.	- Réaliser une suspension épaisse des bactéries testées en eau distillée ; - Ajouter avec une pince flambée et refroidie un disque d'ONPG ; - Incuber à 37°C pendant 30 minutes ; - ONPG (+) : milieu de couleur jaune ; - ONPG (-): milieu sans couleur.	Delarras (2003)

- **Biotypage par microgalerie API**

Le système API (Appareillage et Procédé d'Identification) est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries (Freney *et al.*, 2000).

Deux galeries API ont été utilisées : l'API 20 E et l'API 20 NE pour l'identification des bacilles à Gram négatif.

La préparation et l'inoculation des galeries citées-ci-dessus sont résumées dans le tableau 06.

Tableau 06: Préparation et inoculation de galeries biochimiques miniaturisés API (source: <http://www.biomerieux.com>).

Type de l'API	Caractéristiques	Préparation Galerie/inoculum	Inoculation de la galerie	Lecture	Identification
API 20 E	- Comporte 20 tests - Destinée aux entérobactéries et à autre bacilles à Gram négatif.	-Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillé,e dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide ; -Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation ; - Faire une suspension bactérienne : cultures jeune dans un tube contenant 5 ml d'eau distillée stérile.	<ul style="list-style-type: none"> - Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne ; - Remplir uniquement les tubes des autres tests ; - Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine ; - Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures. 	<ul style="list-style-type: none"> - Lecture directe ou après addition de réactifs : se référant au tableau de lecture spécifique à chaque API* ; - Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1, 2 ou 4) est indiquée pour chacun. Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs. Un nombre à 7 chiffres est obtenu, il sert de code d'identification. 	L'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification apiwebTM**. Enter manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres.
API 20 NE	- Comporte 20 tests - Destinée aux bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux.		<ul style="list-style-type: none"> - Remplir uniquement les tubes des tests NO3 à PNPG ; - Créer une anaérobiose (par l'huile de paraffine) dans les tests : GLU, ADH, URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine ; - Remplir les tubes et les cupules des tests : GLU à PAC avec la suspension bactérienne ; - Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures. 		

*voir annexe II, ** Consulter : <http://www.biomerieux.com>.

III.1.3. Conservation des souches bactériennes

Les souches bactériennes isolées ont été purifiées par des repiquages successifs et conservées jusqu'à l'étude de la résistance aux agents antibactériens. La conservation des souches a été réalisée à la température ambiante, par ensemencement par stries sur la gélose nutritive inclinées en tubes à essai pour les bacilles à Gram (-) et sur le milieu Chapman pour les cocci à Gram (+) (Guiraud, 2003).

III.2. Étude de la résistance des bactéries aux antibiotiques

L'étude de la résistance aux antibiotiques a été réalisée par 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, 2019).

III.2.1. Technique de l'antibiogramme

- **Préparation de l'inoculum**
 - À partir d'une culture pure de 18 à 24 H sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'un écouvillon quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques ;
 - Bien décharger l'écouvillon dans 5 à 10 ml de bouillon Mueller Hinton ;
 - Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ($\sim 10^8$ UFC/ml).

- **Ensemencement de la gélose Mueller Hinton (MH)**
 - Couler la gélose MH en boîtes de Pétri, Laisser sécher et solidifier sur pailleasse avant utilisation ;
 - Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum préparé ($\sim 10^6$ UFC/ml pour les bacilles à Gram négatif et $\sim 10^7$ UFC/ml pour les cocci à Gram positif);
 - L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum ;
 - Frotter l'écouvillon sur la totalité de la gélose de haut en bas, en stries serrées ;
 - Répéter l'opération 2 fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon par la périphérie de la gélose ;

- Laisser les boîtes ensemencées 15 à 20 minutes sur paillasse ou dans l'étuve à 37°C avant l'application des antibiotiques.

- **Application des disques d'antibiotiques**

- Déposer les disques d'antibiotique sur la gélose à l'aide d'une pince flambée, en appuyant doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu ;
- Laisser les boîtes à une température ambiante pendant 30 minutes sur la paillasse pour permettre la diffusion de l'antibiotique dans la gélose ;
- Incuber (sans dépasser les 30 minutes) à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.

- **Lecture interprétative**

Les diamètres des zones d'inhibition autour des disques sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse en millimètre, puis ils sont comparés aux diamètres critiques conformément aux indications du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2019). Il convient de noter toutefois, qu'une souche dont la sensibilité aux antibiotiques est ainsi évaluée peut être déclarée " sensible, intermédiaire ou résistante".

III.2.2. Antibiotiques testés

Les antibiotiques qui ont été testés sur les différents groupes bactériens sont représentés dans le tableau 07.

Le choix des antibiotiques testés repose sur l'identification du genre et son profil habituel vis-à-vis des antibiotiques (résistances naturelles et résistances acquises possibles).

Tableau 07: Critères des antibiotiques testés sur les souches bactériennes (CA-SFM, 2019).

Groupe bactérien	Antibiotique	Famille d'antibiotique	Classe	Code	Charge du disque	Diamètres critiques (mm)	
						S ≥	R <
Bacilles à Gram négatif	Amoxicilline	Bêta -lactamines	Pénicillines	AMX	25 Unité	19	19
	Pénicilline G	Bêta -lactamines	Pénicillines	P	10	17	17
	Céfotaxime	Bêta -lactamines	Céphalosporines	CTX	5	20	17
	Ofloxacine	Quinolones	Fluoroquinolones	OFX	5	24	22
	Chloramphénicol	Phénicoles	Divers	C	30	17	17
Cocci à Gram positif	Ceftazidim	Bêta -lactamines	Céphalosporines	CAZ	30 Unité	21	15
	Cefazoline	Bêta -lactamines	Céphalosporines	CZ	30	18	12
	Colistine	Polymyxines	Pénicillines	CT	50	15	15
	Chloromphénicol	Phénicoles	Divers	C	30	23	29
	Vancomycine	Glycopeptides	Glycopeptides	VA	30	≥ 17	-

III.3. Étude de la capacité de formation de biofilm

Cette partie de l'expérimentation porte sur la détection de la capacité des souches bactériennes isolées des sites hospitaliers à former de biofilm. La technique utilisée est celle du « Test d'adhésion en microplaque par coloration au cristal violet » (Nagant *et al.*, 2010 ; Camps, 2011).

Cette méthode utilise la spectrophotométrie pour mesurer la capacité des souches bactériennes à adhérer à une surface et/ou à former un biofilm dans les puits des microplaques. Le cristal violet colore les bactéries et la matrice des biofilms (Pantarella *et al.*, 2013).

- **Préparation de la culture bactérienne**

- Préparer une culture bactérienne jeune dans le Bouillon Tryptone Soja (TSB) (Tré-Hardy et al., 2007) ;
- Centrifuger la culture bactérienne à 4000 g pendant 10 minutes ;
- Re-suspendre le culôt dans le TSB et ajuster la turbidité à 0,4 mesurée à une densité optique DO = 600 nm (Florence, 2014).

- **Inoculation de la microplaque**

D'après la technique de Rivas et al. (2007) :

- Répartir 200 µl de chaque suspension bactérienne dans les puits d'une microplaque de 96 puits à fond plat en polystyrène ;
- Répartir le même volume de témoin (milieu TSB sans culture) ;
- Incuber la microplaque à 37°C pendant 24 heures ;
- Après incubation, vider la microplaque délicatement et laver les puits trois fois avec une solution de NaCl (9 g/L) afin d'enlever les bactéries non adhérentes au support ;
- Sécher la microplaque à 50°C pendant 30 minutes afin de fixer les bactéries ;
- Introduire dans chaque puits une solution de cristal violet à 0,1 % pendant 15 minutes à la température ambiante ;
- Éliminer la solution de cristal violet ensuite rincer trois fois avec la solution de NaCl pour enlever le colorant en excès puis sécher 10 minutes à température ambiante ;
- Remettre en solution le cristal violet qui a pénétré dans les bactéries par l'ajout de 200 µL d'éthanol à 95 % dans chaque puits, ce qui permet d'améliorer la sensibilité de lecture avec le spectrophotomètre ;
- Après 10 minutes d'attente, lire l'absorbance à 595 nm. Chaque triplicat de mesures a été répété trois fois sur des cultures bactériennes indépendantes.

- **Détermination du pouvoir adhérent**

Les souches compte tenu de leur pouvoir adhérent, ont été classées en trois catégories: non adhérentes, faiblement adhérentes et hautement adhérente (Hola et Ruzicka, 2011) :

- $DO \leq DO_t$ (Témoin) : non formatrice du biofilm ;
- $DO_t \times 2 \leq DO \leq DO_t \times 4$: Modérée ;
- $DO_t \times 4 \leq DO$: Fortement formatrice du biofilm.

Chapitre III :

Résultats et

discussion

I. Isolement et identification phénotypique des isolats bactériens

Dans la présente étude, nous avons identifié et conservé 09 souches rattachées aux deux groupes bactériens, 05 souches des bacilles à Gram négatif et 04 souches sont des cocci à Gram positif.

I.1. Identification morphologique

Les aspects macroscopiques et microscopiques des colonies suspectes des bacilles à Gram négatif et des cocci à Gram positif sont représentés dans le tableau 08.

Tableau 08 : Aspects macroscopiques et microscopiques des bacilles à Gram négatif et des cocci à Gram positif isolés à partir de l’environnement hospitalier de certains établissements publics de la région de Guelma.

Groupe bactérien	Code de la souche	Site de prélèvement	Milieu de culture	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
Bacille à Gram (-)	BGN1	Évier	SS	Colonies moyennes crémeuses, de couleur rose et à contour irrégulier.	Bacilles à Gram négatif
	BGN2	Réservoir chasse d'eau	Hektoen	Colonies moyennes de couleur jaune, crémeuses, bombées et à contour régulier.	Bacilles à Gram négatif
	BGN3	Bac à ordure	Hektoen	Colonies moyennes de couleur jaune, crémeuses, bombées et à contour irrégulier.	Bacilles à Gram négatif
	BGN4	Cuvette toilette	SS	Petites colonies de couleur rose, crémeuses, aplaties et à contour régulier.	Bacilles à Gram négatif

Tableau 08 (Suite) :

Groupe bactérien	Code de la souche	Site de prélèvement	Milieu de culture	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
	BGN5	Poignée de la porte (WC)	Hektoen	Petites colonies crémeuses de couleur jaune, bombées et à contour régulier.	Bacilles à Gram négatif
Cocci à Gram (+)	CGP1	Avaloire de lavabo	Chapman	Petites colonies de couleur jaune, opaques, bombées et à contour régulier. Virage de la couleur du milieu	Cocci à Gram positif
	CGP2	Poignée de robinet	Chapman	Petites colonies de couleur jaune, crémeuses, bombées et à contour régulier. Virage de la couleur du milieu	Cocci à Gram positif
	CGP3	Évier	Chapman	Petites colonies crémeuses de couleur rose, bombées et à contour régulier.	Cocci à Gram positif
	CGP4	Cuvette toilette	Chapman	Petites colonies de couleur jaune, crémeuses, bombées et à contour régulier. Virage de la couleur du milieu.	Cocci à Gram positif

L'aspect macroscopique des bacilles à Gram (-) et des cocci à Gram (+) isolés est illustré par les figures 02 et 03.

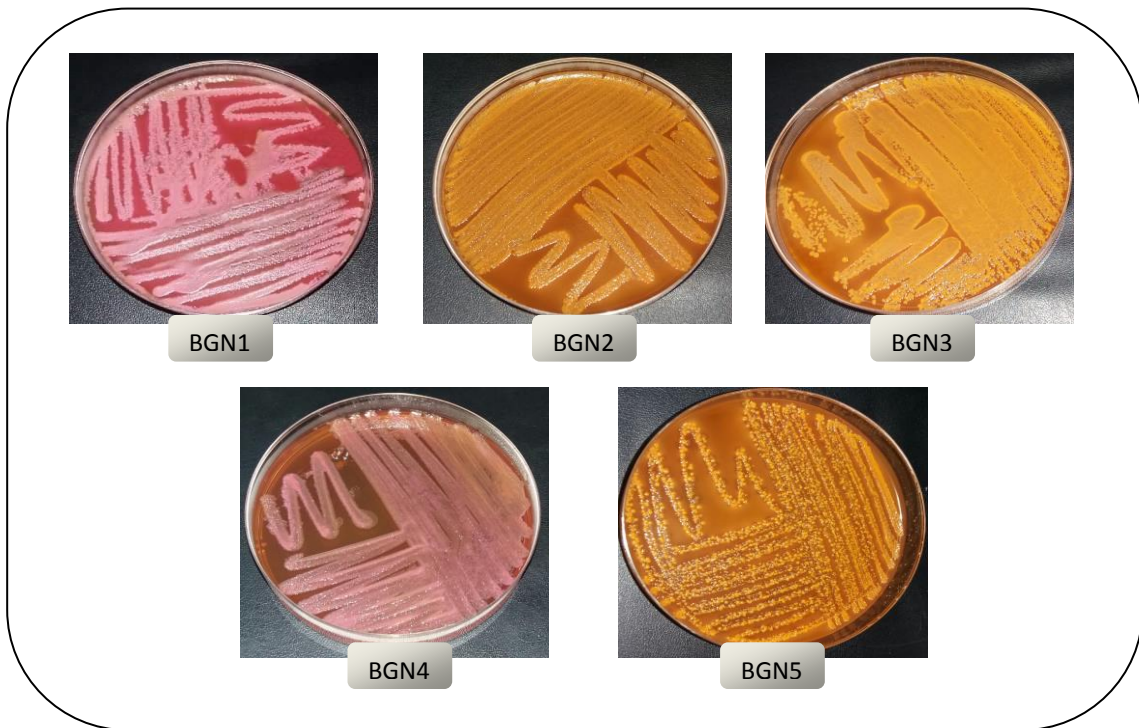


Figure 02 : Aspect macroscopique des isolats bactériens appartenant aux bacilles à Gram négatif.

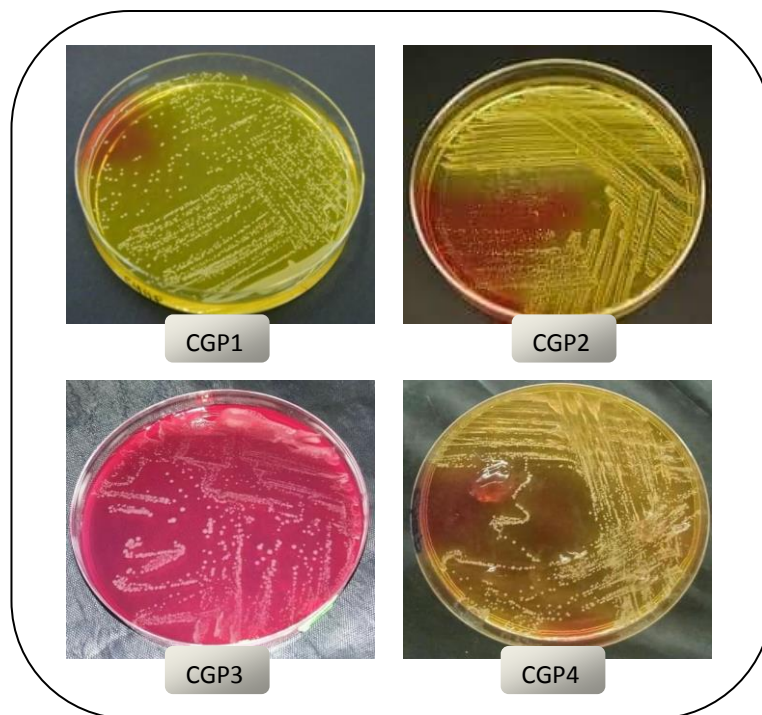

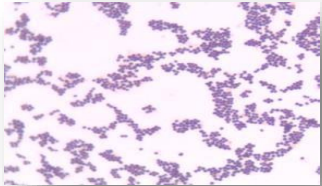


Figure 03 : Aspect macroscopique des isolats bactériens appartenant aux cocci à Gram positif.

L'aspect microscopique des bacilles à Gram (-) et des cocci à Gram (+) est illustré dans le tableau 09.

Tableau 09: Aspect microscopique des isolats bactériens.

Isolats bactériens	Aspect microscopique (Microscope optique ; Objectif (X100)).	
BGN1, BGN2, BGN3, BGN4, BGN5.	Bacilles isolés à Gram négatif.	
CGP1, CGP2, CGP3, CGP4.	Cocci à Gram positif.	

1.2. Enzymes respiratoires

Les résultats obtenus de la recherche des enzymes respiratoires sont représentés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Recherche des enzymes respiratoires des isolats bactériens.

Code de la Souche bactérienne	Catalase	Oxydase	Nitrate réductase
BGN1	+	-	/
BGN2	+	-	/
BGN3	+	-	/
BGN4	+	+	/
BGN5	+	+	/
CGP1	+	+	+
CGP2	+	+	-
CGP3	+	+	-
CGP4	+	+	-

(+) : test positif (-) : test négatif (/) : test non effectué

La figure 04 illustre l'aspect des tests positifs et négatifs des enzymes respiratoires.

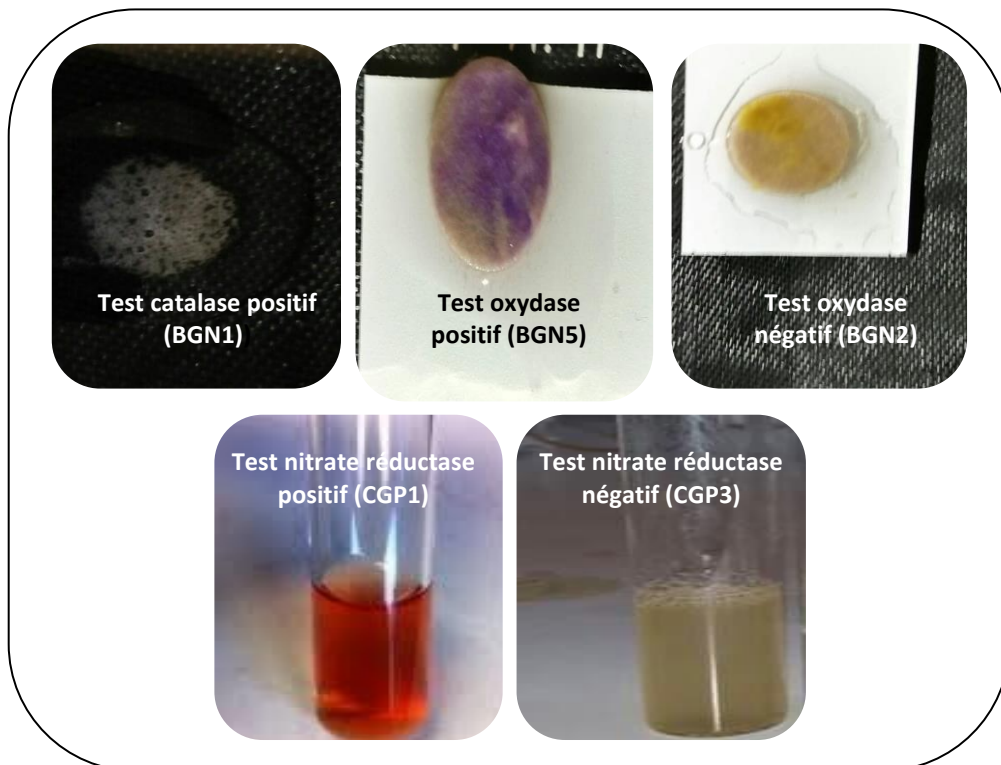


Figure 04: Présence et/ou absence des enzymes respiratoires chez certains isolats bactériens.

I.3. Identification biochimique

I.3.1. Biotypage par galerie biochimique classique

Les cocci à Gram (+) ont été identifiés par la galerie biochimique classique, les résultats sont mentionnés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Tests biochimiques classiques des cocci à Gram positif isolés des milieux hospitaliers.

Souches	Citrate de Simmons	TSI					Mannitol mobilité		Clarck et Lubs		Urée indole			ONPG
		H ₂ S	GAZ	GLU	SAC	LAC	MAN	MOB	VP	RM	URE	IND	TDA	
CGP1	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	
CGP2	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	
CGP3	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	
CGP4	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	

(+) = test positif ; (-) = test négatif

Les profils biochimiques des cocci à Gram (+) obtenus par la galerie classique sont illustrés par la figure 05.








Figure 05: Profils biochimiques des cocci à Gram positif isolés de l'environnement hospitalier.

I.3.2. Biotypage par microgalerie API

Les bacilles à Gram négatif ont été identifiés par les API systèmes, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Profils biochimiques des bacilles à Gram négatif isolés de l’environnement hospitaliers.

API système	Souches	Profil biochimique	Code de l'API	Degré de parenté (%)
API 20 E	BGN2		3722572	75
	BGN3		7767573	90
API 20 NE	BGN1		7530000	100
	BGN4		7430004	99,6
	BGN5		7630000	100

❖ D’après les résultats d’identification, les espèces isolées à partir des sites hospitaliers étudiés sont les suivantes (Tableau 13) :

Tableau 13 : Espèces bactériennes isolées à partir de l’environnement des établissements publics hospitaliers de la région de Guelma.

Groupe bactérien	Code de l’isolat bactérien	Espèce identifiée
Bacille à Gram négatif	BGN1	<i>Pasteurella pneumotropica</i>
	BGN2	<i>Citrobacter freundii</i>
	BGN3	<i>Serratia odorifera</i>
	BGN4	<i>Vibrio vulnificus</i>
	BGN5	<i>Chryseobacterium indologenes</i>
Cocci à Gram positif	CGN1	<i>Staphylococcus sciuri</i>
	CGN2	<i>Micrococcus varians</i>
	CGN3	<i>Micrococcus luteus</i>
	CGN4	<i>Micrococcus varians</i>

I.4. Discussion

L'environnement hospitalier constitue une niche écologique d'organismes qui pourraient avoir une signification clinique. En effet, le rôle de l'environnement hospitalier inanimé (surfaces et équipements) dans la propagation de l'infection nosocomiale devient aujourd’hui un problème majeur de santé publique extrêmement préoccupant.

Cependant, il a été démontré que les agents pathogènes nosocomiaux sont excrétés par les patients et peuvent contaminer les surfaces en milieu hospitalier à des concentrations suffisantes pour la transmission, peuvent survivre pendant de longues périodes, peuvent persister malgré la désinfection, et peuvent être transférés aux mains des personnel soignant (Otter et al., 2011).

Dans la présente étude, nous avons isolé 05 bacilles à Gram négatif et 04 cocci à Gram positif à partir de différents sites dans les sanitaires des établissements hospitaliers.

Les isolats bactériens ont montré divers aspects culturels, en fonction du milieu de culture, permettant de suspecter leur appartenance à un groupe bactérien ou à un autre.

Parmi les 5 isolats de bacille à Gram négatif (BGN), 3 isolats ont été oxydase (-) et 2 ont donné une réaction positif. L'étude des caractères biochimiques a révélé que 2 isolats appartenaient au groupe des entérobactéries et 3 isolats ont été des BGN non entérobactéries. Globalement, les caractères biochimiques des isolats obtenus sont en accord avec la littérature ([Kocur et al., 2006](#) ; [Delarras, 2014](#)).

Les entérobactéries isolées sont représentées par *Citrobacter Freundii* et *Serratia odorifera*. L'isolement de ces espèces à partir de réservoir chasse d'eau et du bac à ordures pourrait s'expliquer par le fait que ces espèces sont parmi les entérobactéries fréquemment retrouvées dans les milieux hospitaliers ([Gniadkowski, 2001](#)). En effet, Elles peuvent survivre des mois dans l'eau et se multiplier même dans des solutions antiseptiques ([Flandrois, 1997](#); [Maza et al., 2004](#)).

Aussi, les mauvaises méthodes de nettoyage, la tolérance ou la mauvaise utilisation des désinfectants et la charge bactérienne élevée peuvent être des causes explicatives de la présence de ces bactéries. [Flandrois \(1997\)](#) rapportent que les *Serratia* sont les entérobactéries les plus résistantes aux agents physiques et chimiques.

Les BGN non entérobactéries ont été isolés à partir de l'évier, le poignée de la porte (WC) et de la cuvette de toilette. L'isolement de ces bactéries pourrait être lié à leur capacité de survie sur les surfaces dans l'environnement hospitalier. En effet, de nombreux BGN non entérobactéries, comme les pasteurelles et *Chryseobacterium* peuvent survivre sur des surfaces inertes, pendant des mois ; [Bernardet et al. \(2010\)](#) montrent que *C. indologenes* se trouve généralement dans les sources d'eau des hôpitaux et le sol.

[Scharmann et Heller \(2001\)](#) rapportent que la principale source de *Pasteurella pneumotropica* dans l'environnement hospitalier est susceptible d'être un contact étroit avec des rongeurs infectés et aussi avec les patients et le personnel qui peuvent acquérir et transmettre les bactéries de leur système respiratoire supérieur, de la conjonctive et éventuellement aussi sur les cheveux. Ceci laisse supposer que la source de notre souche *P. pneumotropica* pourrait être le personnel, les patients, les visiteurs ou même des souris ou des chats dont la présence est possible dans nos établissements.

En ce qui concerne l'espèce *Vibrio vulnificus*, elle est fréquemment isolée de l'eau, des excréments animaux et humains et des égouts (Lesne et Fournier, 1998 ; Motes et al., 1998).

Figarella et al. (2007) montrent que l'évier, les siphons et les robinets peuvent jouer le rôle de transmetteur par aérosolisation des BGN. Nos résultats se concordent avec ceux de Lemmen et al. (2004) et Dali (2015) qui ont rapporté que les BGN sont présents dans différents sites des sanitaires des hôpitaux.

Il est très intéressant de signaler que tous les BGN isolés dans la présente étude ont un pouvoir pathogène et une capacité de transmission variable. *Citrobacter freundii* entraînent généralement des infections des voies urinaires, des bactériémies, des sepsis abdominaux et des abcès cérébraux ainsi que des pneumonies et d'autres infections néonatales (Pepperell et al., 2002). *Serratia odorifera* peut provoquer des infections urinaires, respiratoires, des bactériémies et des méningites (Bouskraoui et al., 2017). Pour *P. pneumotropica*, des cas d'infections humaines à cette souche ont été rapportés comme l'endocardite, des infections osseuses et articulaires, la méningite, des infections de la peau, et la pneumonie surtout chez les patients immunodéprimés (Lemenand et al., 2006). Le spectre d'infection de *Chryseobacterium indologenes* comprend la méningite, les infections des voies respiratoires, des voies urinaires, des sites chirurgicaux, des tissus mous, des cathéters et des bactériémies (Mukerji et al., 2016 ; Bhalla et Gupta, 2018). *Vibrio vulnificus* provoque une maladie gastro-intestinale bénigne ou grave, pouvant se transformer en septicémie avec un taux de mortalité important dans une population sensible, ainsi des infections des plaies chez l'homme (Shapiro et al., 1998 ; Martinez-Urtaza et al., 2010).

En ce qui concerne les cocci à Gram positif, nous avons isolé 3 souches de *Micrococcus* et une souche de *Staphylococcus*. L'identification définitive des espèces est en accord avec la littérature (Guiraud, 2003).

Deux espèces de *Micrococcus* (*M. varians* et *M. luteus*) ont été isolées à partir d'évier, de robinet et de cuvette de toilette, ceci pourrait s'expliquer par leur capacité à croître dans des conditions humides avec des nutriments simples (Dib et al., 2003 ; Dworkin et al., 2008), rappelant que les souches de *Micrococcus* sont ubiquistes dans l'environnement et sont

considérées comme faisant partie de la flore normale de la peau des mammifères, des muqueuses et possiblement de l'oropharynx ; [Kaprelyants et Kell \(1993\)](#) rapportent que *M. luteus* peut former des structures dormantes qui permettent aux cellules de survivre pendant de longues périodes dans des conditions environnementales défavorables et sur diverses surfaces.

Plusieurs études ont montré la présence de *Micrococcus* dans l'environnement hospitalier à savoir les équipements, les réservoirs d'eau, l'air, les poignées des portes et l'évier ([Powell et al., 2003](#) ; [Dworkin et al., 2008](#) ; [Purmal et al., 2010](#)).

Généralement, *M. luteus* et *M. varians* sont des souches considérées comme inoffensives, non pathogènes et commensales, qui sont rarement isolées en tant que pathogènes opportunistes ([Kocur, 2006](#) ; [Bannerman, 2007](#)). En revanche, certaines études ont rapporté que *M. luteus* a été impliqué comme agent causal dans des cas d'abcès intracrâniens, de pneumonie, et de méningite chez des patients compromis ([Andreopoulos et al., 2000](#) ; [Greenblat et al., 2004](#)).

Staphylococcus sciuri est un staphylocoque à coagulase négative (SCN), elle est considérée actuellement comme une bactérie pathogène opportuniste ([Denis et al., 2016](#)). Elle est associée à de graves infections chez l'homme, telles que l'endocardite, la péritonite, le choc septique et les infections des plaies ([Stepanovic et al., 2002](#) ; [Jain et al., 2004](#)). La présence de cette espèce au niveau de l'avaloire de lavabo pourrait être expliquée par le fait que *S. sciuri* est capable de survivre indépendamment de la matière vivante; Aussi, nous pouvons dire que le lavage des mains constitue une source principale de cette espèce puisqu'elle représente une des principales bactéries commensales de la peau ([Couto et al., 2000](#)). Il a été aussi démontré que *S. sciuri* colonise le nasopharynx et les muqueuses chez l'homme ([Stepanovic et al., 2003](#)). L'isolement de *S. sciuri* à partir de l'environnement hospitalier a été rapporté par plusieurs études ([Freney et al., 1999](#) ; [Vernozy-Rozand et al., 2000](#)).

II. Étude de la résistance des bactéries aux antibiotiques

II.1. Bacilles à Gram négatif

Tous les bacilles à Gram (-) testés sont résistants au moins à trois antibiotiques. Cent pourcent (100 %) des souches sont résistantes à l'amoxicilline, à la pénicilline et à la céfotaxime. Des taux significatifs de résistance sont enregistrés au chloramphénicol et à l'ofloxacine (40 %) (Figure 06).

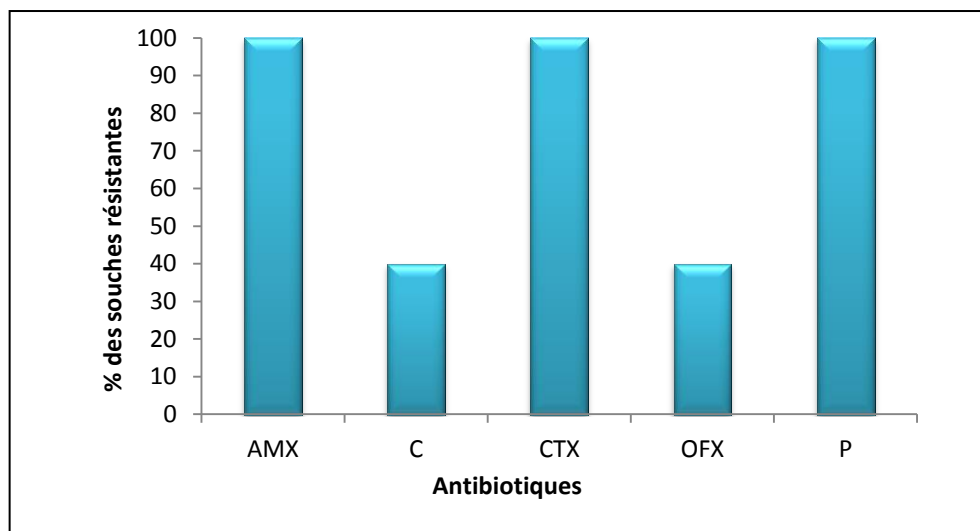


Figure 06: Résistance aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif.

AMX : amoxicilline ; C : chloramphénicol ; CTX : céfotaxime ;
OFX : ofloxacine ; P : pénicilline

Soixante pourcent des souches présentent une résistance à 3 antibiotiques, par ailleurs, 40 % des souches résistent à 5 antibiotiques. Deux profils antibiotypiques différents sont observés chez les bacilles à Gram (-) étudiés (Tableau 14).

Tableau 14 : Profils antibiotypiques associés aux bacilles à Gram négatif isolés des sites hospitaliers.

Profil de résistance	Nombre d'antibiotique	Nombre des souches	Souches résistantes
AMX/CTX/P	3	3	<i>Pasteurella pneumotropica</i> <i>Vibrio vulnificus</i> <i>Chryseobacterium indologenes</i>
AMX/CTX/P/OFX/C	5	2	<i>Citrobacter freundii</i> <i>Serratia odorifera</i>

AMX: amoxicilline ; CTX : céfotaxime ; P : pénicilline ; C : chloramphénicol ; OFX : ofloxacine.

Les résultats de l'antibiogramme des bacilles à Gram (-) sont illustrés dans la figure 07.

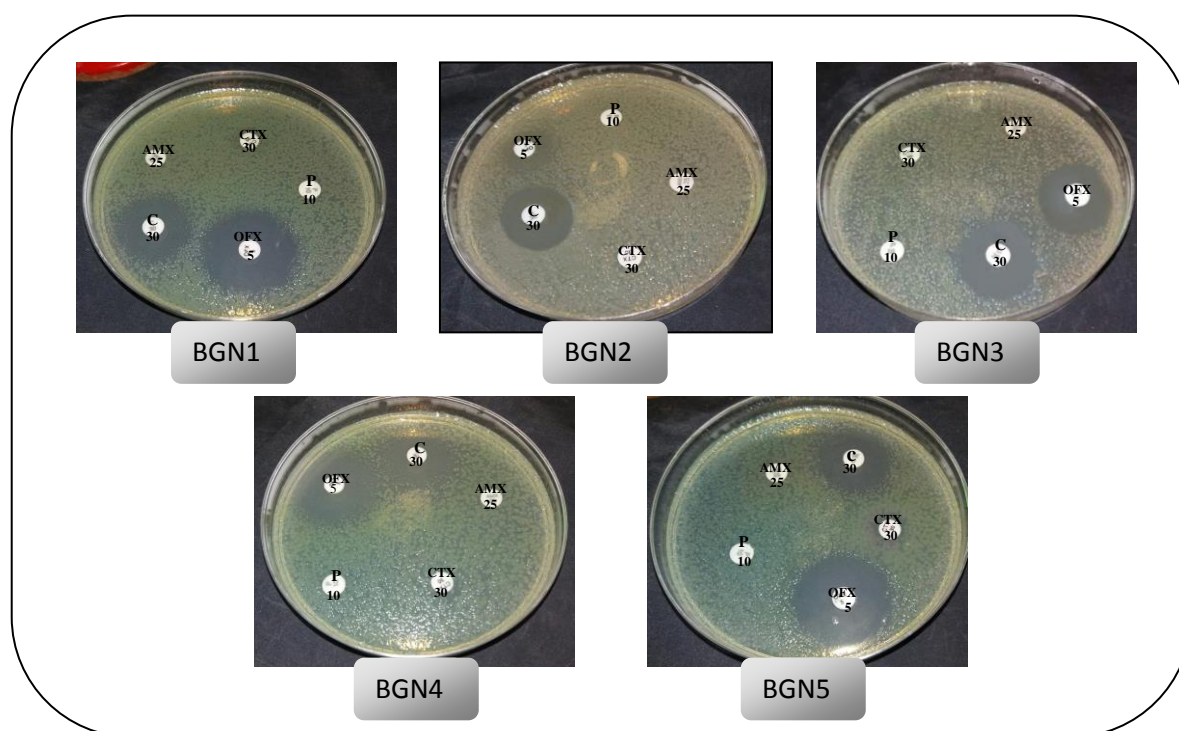


Figure 07 : Antibiogramme des différents bacilles à Gram négatif isolés des sites hospitaliers.

II.2. Cocci à Gram positif

Tous les cocci à Gram (+) testés résistent au moins à trois antibiotiques, 100 % des souches sont résistantes au vancomycine, à la colistine et à la ceftazidim. Un taux de résistance important est également enregistré pour le chloramphénicol et le cefazoline (75 %). (Figure 08).

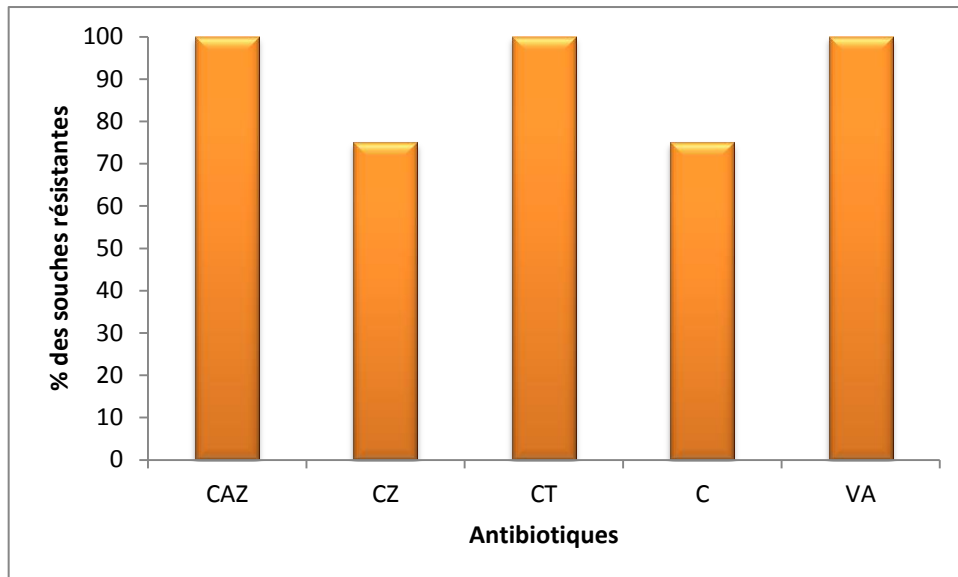


Figure 08: Résistance aux antibiotiques des cocci à Gram positif.

CAZ : ceftazidim ; CZ : cefazoline ; CT: colistine ; C : chloramphénicol
VA : vancomycine

Soixante-quinze pourcent des souches résistent à 5 antibiotiques, 25% résistent à 3 antibiotiques en présentant deux profils antibiotypiques (Tableau 15).

Tableau 15 : Profils antibiotypiques associés aux cocci à Gram positif isolés des sites hospitaliers.

Profil de résistance	Nombre d'antibiotique	Nombre des souches	Souches résistantes
VA/CAZ/CT	3	1	<i>Micrococcus varians</i>
VA/CAZ/C/CZ/CT	5	3	<i>Staphylococcus sciuri</i> <i>Micrococcus varians</i> <i>Micrococcus luteus</i>

VA : vancomycine ; CZ : cefazoline ; CAZ : ceftazidim ; C : chloramphénicol ; CT: colistine

Les résultats de l'antibiogramme des cocci à Gram (+) étudiés sont illustrés dans la figure 09.

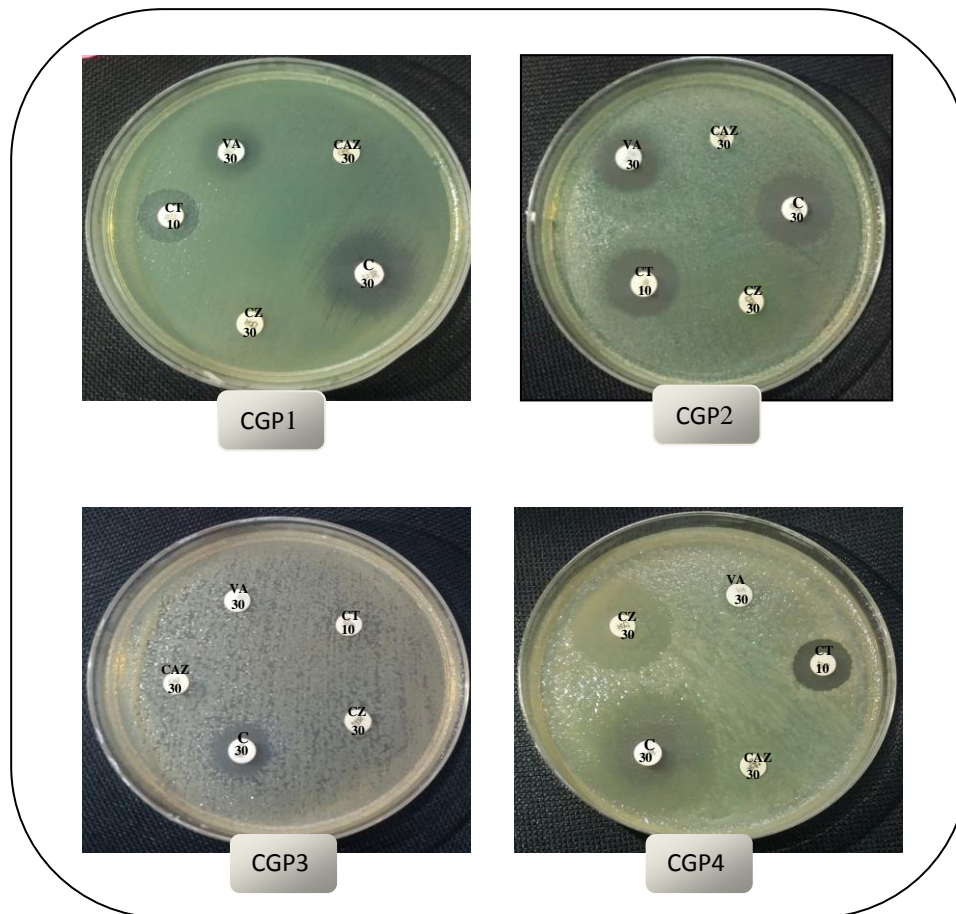


Figure 09 : Antibiogramme des cocci à Gram positif isolés des sites hospitaliers.

II.3. Discussion

Le suivi de la résistance des bactéries isolées de l'environnement hospitalier inanimé est particulièrement important pour mieux évaluer les risques pour la santé humaine liés aux contacts avec les sites choisis. Les résultats de l'antibiogramme des isolats bactériens montrent une résistance importante aux β -lactamines (100 % pour les BGN et 75 % pour les CGP). Cette résistance pourrait s'expliquer d'une part, par des résistances naturelles chez certaines espèces (exemple : *Citrobacter freundii* résiste naturellement aux céphalosporines) (CA-SFM, 2019), et par des résistances acquises suite au large usage de ces

antibiotiques d'autre part (Courvalin *et al.*, 2006). La résistance aux β -lactamines est associée à plusieurs mécanismes, dont la production de pénicillinases, la production de céphalosporinases AmpC, mais le plus important étant la production de β -lactamases et les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) qui sont des enzymes hydrolysant les β -lactamines en ouvrant le cycle bêtalactame et menant à la perte d'un groupement carboxyle, provoquant l'inactivation de l'antibiotique en question (Philippon et Arlet, 2006).

Actuellement, les entérobactéries sont parmi les souches cliniques qui sont considérées très résistantes aux β -lactamines (Bonnet, 2006).

Pasteurella pneumotropica a des résistances acquises aux bêta-lactamines grâce à l'hydrolyse par les β -lactamases de type ROB-1 (Purdy *et al.*, 1997). *Chryseobacterium indologenes* a une résistance intrinsèque aux pénicillines et aux céphalosporines (Chiou *et al.*, 2015). Arif *et al.* (2019) rapportent que la variabilité des β -lactamases chromosomiques responsables de la résistance intrinsèque aux pénicillines et leur expression expliquent les niveaux de résistance aux β -lactamines plus ou moins grands observés pour *Vibrio vulnificus*.

Selon Cattoir et Leclercq (2012), la plupart des souches cliniques de *Staphylococcus coagulase négatif* (à savoir *S. sciuri*) sont productrices de pénicillinases. Contrairement à nos résultats, les *Micrococcus* isolés sont connus par leur sensibilité à la plupart des antibiotiques, dont certains β -lactamines. Ce genre résiste naturellement à la ceftazidim (CA-SFM, 2019), tandis que la résistance à la cefazoline pourrait s'expliquer par une résistance acquise due à une inactivation enzymatique de cet antibiotique (Schaechter *et al.*, 1999).

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Jacoby et Munoz (2005), Bouguenoun (2017) et Zidouch (2019) qui démontrent la dissémination des bactéries résistantes aux β -lactamines dans l'environnement hospitalier.

Il est intéressant de relever qu'un nombre important de souches isolées sont résistantes au chloramphénicol (5 souches/ 55,55%). Les entérobactéries et les cocci à Gram positif résistent au chloramphénicol grâce à la production d'une enzyme chloramphénicol acétyltransférase inactivant les phénicoles (Courvalin *et al.*, 2006). Cette enzyme inactive le chloramphénicol par acétylation des groupes fonctionnels de l'antibiotique, conférant ainsi un haut niveau de résistance à cet antibiotique (Fauchère et Avril, 2002). Les résultats obtenus dans la présente étude sont très inquiétants parce que le chloramphénicol est un

antibiotique qui peut provoquer une aplasie médullaire irréversible et il est interdit d'utilisation (Courvalin, 2008). Nos résultats signifient que cet antibiotique est encore utilisé.

L'ofloxacin est un antibiotique qui fait partie de la famille des quinolones, il est utilisé pour traiter les infections sévères dues à des bacilles à Gram négatif (Cazes, 2017). La résistance des entérobactéries isolées dans la présente étude à cet antibiotique peut être expliquée par une accumulation de mutations au sein des gènes codant pour les enzymes ADN gyrase et topo-isomérase IV, les cibles principales de cet antibiotique (Drlica et Hooper, 2003 ; Mérens, 2010).

Tous les cocci à Gram positif résistent naturellement à la colistine grâce à leur patrimoine génétique (CA-SFM, 2019).

Les glycopeptides (vancomycine) sont utilisés en alternative aux bêta-lactamines dans le traitement des infections aux cocci à Gram positif ce qui pourrait expliquer la résistance totale (100 %) des souches étudiées. Le mécanisme de résistance à la vancomycine est lié à un épaissement de la paroi bactérienne qui piège les glycopeptides dans les couches superficielles en les empêchant d'atteindre la membrane cytoplasmique (Fauchère et Avril, 2002). Nos résultats se concordent avec ceux rapportés par Aouati (2009) et Rebiahi (2012) qui ont confirmés la résistance des souches de staphylocoques à la vancomycine. En revanche, les résultats de l'antibiogramme des *Micrococcus* vis-à-vis à la vancomycine diffèrent de ceux rapportés par Lee *et al.* (2013) où la sensibilité de ce genre bactérien était très élevés pour la vancomycine.

Au vu des résultats obtenus, nous avons constaté que 22,22 % des souches isolées sont des bactéries multi-résistantes (BMR).

Les BMR possèdent un nombre remarquable de mécanismes génétiques leur permettant d'exister en présence d'agents antimicrobiens. La présence de ces bactéries dans l'environnement hospitalier pourrait être liée à trois facteurs qui peuvent contribuer à l'émergence des mécanismes de résistance (Tenover, 1995):

- Des mutations chromosomiques spontanées ;
- Le transfert de gènes de résistance (ex : par l'entremise de plasmides R) d'un genre ou d'une espèce à l'autre ;

- La pression sélective causée par l'usage massif d'antibiotiques (souvent à large spectre d'activité) dans les établissements institutionnels et communautaires

Nos résultats sont comparables à ceux retrouvés par [Lemmen *et al.* \(2004\)](#) qui ont trouvé des BMR sur les poignées de porte, les siphons et les sièges des toilettes. De même, [Guet-Revillet *et al.* \(2012\)](#) ont rapporté des taux importants de BMR au niveau des lavabos des hôpitaux.

À partir des résultats obtenus nous pouvons suggérer que le contact avec les différents sites des sanitaires de nos établissements hospitaliers peut constituer un risque que ce soit pour les patients ou pour les visiteurs ; rappelant que les BMR sont fréquemment impliquées dans les infections nosocomiales menant à un accroissement de la morbidité, la mortalité et les coûts de l'hospitalisation. Le réservoir de ces agents pathogènes est généralement le tractus gastro-intestinal de patients, et la transmission croisée pourrait se produire par l'intermédiaire des mains contaminées du personnel soignant et par la contamination de l'environnement ([Roux *et al.*, 2013](#)).

[Claudon *et al.* \(2002\)](#) ont rapporté que les réservoirs inertes dans un hôpital (siphons de lavabos, poignées, cuvette de toilette...) peuvent être contaminés et constitueraient un relais à la transmission entre deux personnes. [Lowe *et al.* \(2012\)](#) ont identifié les lavabos comme sources d'épidémie d'infection à une entérobactérie multi-résistante dans un hôpital de Toronto au Canada, pendant une période de 4 ans.

III. Capacité de formation de biofilm : étude synthétique

III.1. Bacilles à Gram négatif

Suite aux nombreuses études rapportant l'effet néfaste de la formation de biofilm dans l'environnement hospitalier inanimé sur la santé humaine, il nous a semblé utile d'étudier la capacité de nos souches bactériennes à la formation de biofilm par la technique de microplaques. Malheureusement la lecture des microplaques a été échouée à cause des mesures de confinement qui ont été prises pour tenter d'endiguer la propagation du virus COVID-19. Cependant, nous représentons dans la présente partie un aperçu sur la formation des biofilms par les espèces isolées dans notre étude.

La préoccupation principale des hôpitaux en regard des biofilms est liée à leur implication dans diverses pathologies infectieuses. Si l'implication directe des biofilms dans de nombreux processus infectieux n'est plus à démontrer, leur impact indirect sur la transmission de germes pathogènes reste largement sous-estimé. L'environnement hospitalier n'échappe cependant pas à la colonisation par des biofilms bactériens qui représentent des réservoirs idéaux pour les micro-organismes. Ces réservoirs s'intègrent dans un cycle de contamination qui inclut les patients, les agents causaux et des vecteurs tels que l'air, l'eau, le staff médical, les dispositifs médicaux et les surfaces (Otter et al., 2013 ; Roberts, 2013).

La possibilité de la présence des biofilms sur les surfaces choisies dans notre étude peut constituer d'importants réservoirs de pathogènes et pathogènes opportunistes, montrant une résilience accrue. Bien que le lien entre ces biofilms et les maladies nosocomiales soit moins bien documenté, une approche globale de prévention devrait inclure les biofilms comme un maillon de la dissémination et de la persistance des germes dans l'environnement hospitalier.

En milieu hospitalier, il n'y a pas des données sur la formation de biofilm par l'espèce *Pasteurella pneumotropica* sur les surfaces inanimées. En effet, l'étude de Martin et al. (2015) a montré que les souches de *P. pneumotropica* sont formatrices de biofilm robustes sur les surfaces biotiques chez les rats. Fredheim et al. (2009) rapportent que les molécules qui affectent la formation des biofilms chez *P. pneumotropica* sont les protéines associées au biofilm, ADNc, et l'ADN électronique qui joue un rôle crucial dans la stabilisation des structures de biofilm et représente un mécanisme important pour le transfert horizontal de gènes dans les bactéries. Les résultats de Cerca et al. (2005) et Grenier et al. (2009) ont révélé que la CMI de l'amoxicilline et l'enrofloxacin appliqués vis-à-vis de *P. pneumotropica* étaient plus élevés pour les bactéries dans le biofilm que pour les cellules planctoniques.

Citrobacter freundii est une bactérie connue par sa capacité à former des biofilms sur différents matériaux. Selon les travaux de Faille et al. (2003), cette bactérie adhère par plus de 10^6 cellules par cm^2 de l'acier inoxydable. Zogaj et al. (2003) rapportent que les curli (compose protéique majeur de la matrice extracellulaire) chez *Citrobacter freundii* sont les responsables de l'adhérence aux surfaces abiotiques.

La capacité de formation de biofilm par *Serratia odorifera* a été étudiée par [Mladenović et al. \(2018\)](#) qui ont testé divers conditions de pH, température, concentration de NaCl et de glucose. Leurs résultats montrent que cette espèce a la capacité de former des biofilms à 37 °C, cependant elles sont incapables de les former à 4 et à 44 °C. La formation de ces structures a été stimulée dans un pH égal à 8,5, une concentration de 4 % à 6,5 % de sel et 0,5 % de glucose.

Ces dernières années, plusieurs études ont investigué la formation de biofilm par les espèces de *Vibrio* et elles ont identifié plusieurs facteurs induisant la survie des vibrions en biofilm à savoir des flagelles, des pilis, des polysaccharides et le *Quorum Sensing* ([O'Toole et al., 2000](#) ; [Yildiz et Visick, 2009](#)). [Strom et Paranjpye \(2005\)](#), ont montré que le pilus de type IV (protéine pilA) est le facteur le plus important pour l'adhésion de *Vibrio vulnificus* sur différentes surfaces abiotiques. Ils ont révélé une différence faible dans la formation de biofilms entre des souches sauvages et des souches mutantes pilA lorsque des surfaces de polystyrène et de chlorure de polyvinyle ont été utilisées comme substrats.

[Yi-Cheng Chang et al. \(2014\)](#) ont testé la capacité de 34 isolats de *Chryseobacterium indologenes* d'origine clinique à former de biofilm par la méthode de microplaque 96 puits suivi d'une coloration au cristal violet à 0,25 %. Ils ont trouvés que 13 (38,2%), 6 (17,6) et 0 (0%) des isolats capable de former de biofilms à l'aide des milieux LB, TSB et M9, respectivement. Ils ont expliqué ces résultats par les teneurs élevés des éléments nutritifs qui peuvent favoriser la multiplication et la maturation de biofilm.

III.1. Cocci à Gram positif

La colonisation des surfaces dans l'environnement hospitalier par les cocci à Gram positif a été fréquemment rapportée. *Staphylococcus sciuri* est l'une de ces bactéries ; l'étude de [Stepanovic et al. \(2001\)](#) a confirmé sa capacité de formation de biofilm. Ils ont testé 121 souches d'origine hospitalière et animale et ils ont trouvés que 107 souches de *S. sciuri* se sont révélées capables de produire des biofilms. Parmi ceux-ci, 26 souches (24,30 %) étaient fortement modérés, 31 souches (28,97 %) modérés et 50 souches (46,73 %) faiblement productrice de biofilm. La capacité de formation de biofilm est considérée comme un facteur de virulence chez cette bactérie.

De nombreuses sources rapportent que les *Micrococcus* sont aussi des excellentes bactéries formatrices de biofilm. [Koji et al. \(2013\)](#) ont montrés que des souches de *Micrococcus luteus* sont capables de faire des biofilms après deux jours de culture où la croissance a saturé et alcalinisé le milieu. [Blankenhorn et al. \(1999\)](#) et [Hu et al. \(2010\)](#) ont montré que le pH élevé induit la tryptophanase pour la production d'indole, ce dernier stimule la signalisation de *Quorum Sensing* chez *M. luteus* ce qui conduit à la formation des biofilms. L'espèce *Micrococcus varians* a été également isolée à partir de biofilms d'origine clinique ([Ilse et al., 2012](#)).

La capacité des bacilles à Gram négatif et des cocci à Gram positif, isolées dans la présente étude, à former des biofilms sur différentes surfaces accroît sa résistance vis-à-vis de chocs de désinfection et permet sa persistance. Leur présence dans le milieu hospitalier doit donc être particulièrement contrôlée, et les moyens de maîtrise adaptés notamment à la limitation de la formation ou l'élimination du biofilm.

Conclusion et Perspectives

Conclusion

Les résultats de l'étude de l'antibiorésistance et la capacité de formation de biofilm chez des bactéries isolées du milieu hospitalier, permettent de tirer les conclusions suivantes :

- Cinq bacilles à Gram négatif et 04 cocci à Gram positif ont été isolés à partir de différents sites dans les sanitaires des établissements hospitaliers ;
- La présence de bactéries pathogènes opportunistes reflète bien la tolérance des souches et/ou la mauvaise utilisation des désinfectants;
- 22,22 % des souches isolées sont des bactéries multi-résistantes ;
- Les entérobactéries et la majorité des cocci à Gram positif étaient résistantes à 5 antibiotiques ;
- Un nombre important de souches isolées sont résistantes au chloramphénicol ;
- Les sanitaires peuvent présenter une importante source de transmission de bactéries résistantes aux antibiotiques dans l'environnement hospitalier ;
- Selon la littérature, les bactéries isolées dans notre étude pourraient être des formatrices de biofilms ce qui permet leur maintien de manière durable dans un milieu hospitalier et par conséquent leur résistance à divers agents antibactériens.

Perspectives

- La connaissance du profil épidémiologique local des BMR ainsi que leur niveau de résistance actuel aux antibiotiques est nécessaire pour mieux juguler les conséquences thérapeutiques et adapter le protocole d'antibiothérapie ;
- Il serait également intéressant d'identifier les mécanismes de résistance et les supports génétiques présents dans les souches non-sauvages détectées ;
- L'évolution du modèle de formation de biofilms en microplaques tant pour les BGN que pour les CGN doit être envisagée afin de mieux comprendre les échecs de désinfection ;
- Des essais *in vitro* de bactéricide sur biofilms doivent être réalisés afin de déduire les concentrations efficaces de désinfectants sur les populations bactériens cultivables.

Références Bibliographiques

A

- Abbott S.L. (2007).** *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae. Manual of Clinical Microbiology.* 9: 698-715.
- Adam J.P., Claudia T., James C.P. (2012).** *Streptococcus pneumoniae* utilise le glutathion pour se défendre contre le stress oxydatif et la toxicité des ions métalliques. *Journal de bactériologie.* 194(22): 6248-6254.
- Agodi A., Auxilia F., Barchitta M., Brusaferrò S., D'Alessandro D., Grillo O.C., Montagna T., Pasquarella C., Righi E., Tardivo S., Torregrossa V., Mura I., Gisio-Siti T. (2013).** Trends, risk factors and outcomes of healthcare-associated infections within the Italian network SPIN-UTI. *Hospital Infection.* 84: 52-58.
- Akasaka T., Tanaka M., Yamaguchi A., Sato K. (2001).** Type II Topoisomerase Mutations in Fluoroquinolones-Resistant Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated in 1998 and 1999: Role of Target Enzyme in Mechanism of Fluoroquinolones Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 45(8): 2263-2268.
- Akinbowale O.L., Peng H., Grant P., Barton M.D. (2007).** Antibiotic and heavy metal resistance in motile *Aeromonads* and *Pseudomonads* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 30: 177-182.
- Ananthanarayan R., Paniker C.K.J. (2006).** Text book of Microbiology. Orient Longman, 7^{ème} Edition, India. p: 665.
- Andreopoulos T., Papanikolaou G., Politou M., Konstantopoulos K., Stefanou J., Loukopoulos D. (2000).** *Micrococcus luteus*: a putative cause of hepatic abscess? *Panminerva Medica.* 42(3): 231-232.
- Anses, L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. (2014).** Rapport de l'Anses : Bilan 2013 du réseau d'épidémiologie surveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales (Résapath), Valable sur : <https://www.anses.fr/fr/system/files/LABO-Ra-Resapath2013.pdf>.
- Aouati H. (2009).** Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline: étude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques. Mémoire de Magistère. Université Mentouri, Constantine. 8-9p.
- Ardre A. (2015).** Dynamique de formation des biofilms de *Bacillus subtilis* à l'interface eau-air: expériences et modélisation. Thèse de Doctorat en Physique. Université de Paris Sud 11, France. 137p.
- Arif N., Khullar S., Kumar R., Choudhary S.K., Kapil A., Dhawan B. (2019).** Pleural effusion due to *Chryseobacterium indologenes*: case report and review of literature. *Journal of Laboratory Physicians.* 11(3): 284-286.
- Asif M., Alvi A., Rehman S.U. (2018).** Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. *Infection and Drug Resistance.* 11: 1249-1260.
- Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Monteil H. (1992).** Bactériologie clinique. Ellipses, 2^{ème} édition, France. p : 522.
- Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Monteil H. (2000).** *Streptococcus pneumoniae*. In Bactériologie Clinique. Ellipses, 3^{ème} Edition, Paris. p: 60-72.
- Aye A.M. (2015).** Mise en évidence du système de communication Quorum Sensing impliquant les AHLs chez des bactéries marines isolées de la Méditerranée. Thèse de Doctorat en Microbiologie/Biochimie. Université de Toulon, France. 245p.

B

- Baba Ahmed-Kazi T.Z., Arlet G. (2014).** Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. *Pathologie Biologie.* 62: 169-178.
- Babaei M., Sulong A., Hamat R., Nordin S., Neela V. (2015).** Extremely high prevalence of antiseptic resistant Quaternary Ammonium Compound E gene among clinical isolates of multiple drug resistant *Acinetobacter baumannii* in Malaysia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 14(11): 1-5.
- Bakhom I.M.N.S. (2004).** Contrôle de qualité et validation de différentes méthodes d'identification bactérienne. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université Cheikh Anta Diop, Dakar. 113p.
- Bakour S. (2014).** Caractérisation des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *Acinetobacter baumannii*. Thèse de Doctorat. Université Ahmed Mira, Bejaia. 56p.
- Bannerman T. L., Peacock S. J. (2007).** *Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase- Positive Cocci.* In Murray P.R., Baron E.J., Tenover J.C., Tenover F.C., Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology Press, 9^{ème} édition, USA. p: 390-404.
- Barbier F., Wolff M. (2010).** Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa* vers l'impasse thérapeutique. *Medical Sciences.* 26: 960-968.

- Barbut F., Neyme D. (2006).** Les difficultés d'interprétation des contrôles microbiologiques environnementaux. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2006: 27-32.
- Batah R., Loucif L., Olaitan A.O., Boutefnouchet N., Allag H., Rolain J.M. (2015).** Outbreak of *Serratia marcescens* Coproducing ArmA and CTX-M-15 Mediated High Levels of Resistance to Aminoglycoside and Extended-Spectrum Beta-Lactamases, Algeria. *Microbial Drug Resistance*. 21: 470–476.
- Batard É., El Kouri D., Potel G. (2007).** Infections à staphylocoques : aspects cliniques et bactériologiques. *EMC - Maladies Infectieuses*. 4(3): 1-8.
- Belbel Z., Chettibi H., Dekhil M., Ladjama A., Nedjai S., Rolain J.M. (2014).** Outbreak of an ArmA methyltransferase-producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* clone in a pediatric Algerian Hospital. *Microbial Drug Resistance*. 20: 310-315.
- Bere C.L. (2010).** Résistance des souches de *Streptococcus pneumoniae* aux antibiotiques à Bobo-Dioulasso aspects phénotypiques et génotypiques. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques Appliquées. Université d'Ouagadougou, Burkina Faso. 15p.
- Bernardet J.F., Hugo C.J., Bruun B. (2010).** Genus X. *Chryseobacterium Vandamme*. In Whitman W.B., Krieg N.R., Ludwig W., Hedlund B.P., Paster B.J., Staley J.T., Brown D., Ward N., Parte A. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Bergey's Manual Trust. USA. 4: 180-192.
- Bertrou A., Chapuis C., Hajjar J. (2000).** Relations entre contamination et environnement hospitalier. In: *Vigilance Environnementale: Contrôles microbiologiques de l'environnement hospitalier*. Hygiènes. p: 142-146.
- Bhalla G.S., Gupta S. (2018).** *Chryseobacterium indologenes*: Case report of an emerging pathogen. *Journal Medicine Maroc Society*. 20: 70-72.
- Bonnet R. (2006).** β-Lactamines et entérobactérie. In Courvalin P, Leclercq R, Bingen E. *Antibiogramme*. ESKA, France. p: 141-177.
- Boucher H.W., Corey G.R. (2008).** Epidemiology of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*. 46: S344-S349.
- Bouguenoun W. (2017).** Étude de la résistance aux antibiotiques des bactéries incriminées dans les infections nosocomiales et leur dissémination dans l'environnement hospitalier de la région de Guelma. Thèse de Doctorat en Biologie moléculaire et cellulaire. Université Badji Mokhtar, Annaba. 74p.
- Bouskraoui M., Zouhair S., Sora N., Benaouda A., Zerouali K., Mahmoud M. (2017).** Guide pratique des bactéries pathogènes. Société Marocaine d'Infectiologie Pédiatrique et de Vaccinologie, p: 35-42.
- Bricha S., Ounine K., Oulkheir S., Haloui N., Attarassi B. (2009).** Facteurs de virulence et épidémiologie liés au *Pseudomonas aeruginosa*. *Revue Tunisienne D'Infectiologie*. 2: 7-14.
- Brisou P., Chamouilli J.M., Gaillard T., Muzellec Y. (2004).** Infections à pneumocoque. *EMC - Pédiatrie*. 1(4): 410-431.
- Byarugaba D.K. (2004).** A view on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. *Antimicrobial Agents*. 24: 105-110.
- C**
- Cady A. (2006).** Étude génétique de la résistance aux carbapénèmes chez *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Nantes, France. 83P.
- Caille O., Rossier C., Perron K. (2007).** A Copper-Activated Two-Component System Interacts with Zinc and Imipenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 189: 4561–4568.
- Camps M., Briand J.F., Guentas-Dombrowsky L., Culioli G., Bazire A., Blache Y. (2011).** Antifouling activity of commercial biocides vs. natural and natural-derived products assessed by marine bacteria adhesion bioassay. *Marine pollution Bulletin*. 62: 1032-1040.
- CA-SFM, COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE. (2019).** Recommandation .p: 12, 15, 29, 40, 42.
- Cattoir V., Leclercq R. (2012).** Bêta-lactamines et staphylocoques. *Antibiogramme*. ESKA, France. p: 137-145p.
- Cazes M. (2017).** La dispensation des fluoroquinolones par le pharmacien d'officine. Thèse de Doctorat en pharmacie. Université Toulouse, France. 80p.
- Cerca N., Martins S., Cerca F., Jefferson K.K., Pier G.B., Oliveira R., Azeredo J. (2005).** Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56(2): 331–6.
- Chardon H. (2008).** L'antibiogramme du pneumocoque. *Revue francophone des laboratoires*. 38: 45-59.
- Chiou J., Li R., Chen S. (2015). CARB-17 family of beta-lactamases mediates intrinsic resistance to penicillin in *Vibrio parahaemolyticus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 59(6): 3593-3595.

- Cho Y.J., Moon D.C., Jin J.S., Choi C.H., Lee Y.C., Lee J.C. (2009).** Genetic basis of resistance to aminoglycosides in *Acinetobacter* spp. and spread of *armA* in *Acinetobacter baumannii* sequence group 1 in Korean hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 64: 185–190.
- Chopra I., O’Neill A., Miller K. (2003).** The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resistance Updates*. 6: 137-145.
- Chopra T., Marchaim D., Johnson P.C., Awali R.A., Doshi H., Chalana I., Davis N., Zhao, J.J., Pogue J.M., Parmar S., Kaye K.S. (2014).** Risk factors and outcomes for patients with bloodstream infection due to *Acinetobacter baumannii*-calcoaceticus complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 58: 4630–4635.
- Claudon A., Meunier O., Arpin C., Quentin C., Christmann D., Koffel J.C., Jehl F. (2015).** Les bactéries productrices de bêta lactamases à spectre étendu : étude au centre hospitalo-universitaire de Strasbourg. *Médecine ET Maladies Infectieuses*. 32: 228-240.
- Cosgrove M., Carroll K., Perl T. (2004).** *Staphylococcus aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin. *Clinical Infectious Diseases*. 39: 539–545.
- Courvalin P. (2006).** Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases*. 42(1): S25-34.
- Courvalin P. (2008).** La résistance des bactéries aux antibiotiques : combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques. Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France, France. p: 161.
- Couto I., Sanches I.S., Sa-Leao R., De Lencastre H. (2000).** Molecular characterization of *Staphylococcus sciuri* strains isolated from humans. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 1136–1143.
- Cremieux A., Freney J. (1995).** Mécanismes d'action sur les bactéries et les champignons. Antiseptie et désinfection. ESKA, France. p: 23-35.
- CTIN, Comité Technique national des Infections Nosocomiales. (2002).** Surveillance microbiologique de l’environnement dans les établissements de santé : air, eaux et surfaces. Ministère chargé de la santé, p: 78.
- Cunnion K.M, Zhang H.M, Frank M.M. (2003).** Availability of Complement Bound to *Staphylococcus aureus* To Interact with Membrane Complement Receptors Influences Efficiency of Phagocytosis. *Infection and Immunity*. 71: 656-662.
- D**
- Dagmar C., Simona D., Iva B., Petr M., Branislav R.N., Matej S., Lukas N., Jiri K., Jaromir G., Katerina T., Marie K., Marketa V., David H., Michal M., Jindrich K., Rene K., Vojtech A. (2014).** Effect of ampicillin, streptomycin, penicillin and tetracycline on metal resistant and non-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 11(3): 3233-3255.
- Dali A.A. (2015).** Infections nosocomiales a bactéries multirésistantes (BMR) en réanimation adultes a l’EHUO: Profile épidémiologique, facteurs de risque et facteurs pronostiques. Thèse de Doctorat en Médecine. Université d’Oran 1 Ahmed BENBELLA, Oran. 197p.
- Danielle C. (2010).** *Aeromonas hydrophila*. Laboratoire de Bactériologie Hygiène CHU Toulouse, France. p: 02.
- Debabza M. (2015).** Émergence en milieu hospitalier des bacilles Gram négatifs multirésistants aux antibiotiques : étude bactériologique et moléculaire. Thèse de Doctorat En Microbiologie. Université Badji Mokhtar, Annaba. 86p.
- Degremont S.A. (1998).** Mémento technique de l’eau, tome I. Degremont, France. p: 592.
- Delarras C. (2007).** Microbiologie pratique pour laboratoire d’analyse ou de contrôle sanitaire. Tec et Doc, p: 289-476.
- Delarras C. (2014).** Pratique en microbiologie de laboratoire, recherche des bactéries et de levures-moisissures. Tec et Doc, France. p: 269-411-624.
- Dellarras C. (2003).** Microbiologie de l’environnement avec législation. Travaux pratiques commentés. Gaétan Morin éditeur, Canada. p: 223-230.
- Denis F., Ploy M.C., Martin C., Cattoir V. (2016).** Bactériologie médicale: techniques usuelles. Elsevier Masson, 3 ème édition, France. p: 228.
- Denis F., Poly M.C., Martin C., Bingen E., Quentin R. (2007).** Bactériologies médicale techniques usuelles. Elsevier Masson, France. p: 27, 251.
- Dib J.R., Liebl W., Wagenknecht M., Fariás M.E., Meinhardt F. (2013).** Extra chromosomal genetic elements in *Micrococcus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97(1):63-75.
- Doi Y., Arakawa Y. (2007).** 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clinical Infectious Disease*. 45: 88–94.
- Donlan R.M. (2009).** Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends Microbiology*. 17: 66–72.

- Douarche C., Bailleux V., Even C., Allain J.M., Regeard C., Raspaud E. (2018).** La mécanique des biofilm à la surface de liquides. *Reflète de la physique*. 56: 20-24.
- Doughari H.J., Ndakidemi P.A., Human I.S., Benade S. (2011).** The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter spp.* *Microbes and Environments*. 26: 101–112.
- Drlica K., Hooper D.C. (2003).** Mechanisms of quinolone action. In: Hooper D.C., Rubinstein, E. Quinolone Antimicrobial Agents. American Society for Microbiology, 3eme edition, Washington. p: 19-40.
- Ducel G., Fabry J., Nicolle L. (2002).** Guide pratique pour la lutte contre l'infection hospitalière. Organisation mondiale de la santé, 2 ème édition, p: 05.
- Durante-Mangoni E., Grammatikos A., Utili R., Falagas M.E. (2009).** Do we still need the aminoglycosides. *Antimicrobial Agents*. 33: 201-205.
- Dworkin M.J.H., Denyer S.P., McDonnell G., Maillard J.Y. (2008).** Resistance and cross-resistance to oxidizing agents of bacterial isolates from endoscope washer disinfectors. *Journal of Hospital Infection*. 69(4): 377-383.

E

- El-Sayed M.H. (2016).** Multiple heavy metal and antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* strain HAF13 isolated from industrial effluents. *American Journal of Microbiological Research*. 4: 26–36.

F

- Faille C., Fontaine F., Lelièvre C., Bénézech T. (2003).** Adhesion of *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from milk: consequence on the efficiency of sanitation procedures. *Water Science and Technology*. 47: 225–231.
- Fauchere J.L., Avril J.L. (2002).** Bactériologie générale et médicale. Ellipses, France. p: 213- 217-249-250.
- Figarella J. (2004).** Microbiologie générale et appliquée. Delagrave édition, France. p: 104.
- Figueiredo S. (2011).** *Acinetobacter spp* et réservoir de gènes de carbapénèmases. Thèse de doctorat. Université Paris Sud 11, France. 40p.
- Fines M., Leclercq R. (2004).** Bactéries multirésistantes. In Fabry J. Maitrise des infections nosocomiales de A à Z. Health et Co, France. p: 127-132.
- Flandrois J.P. (1997).** Bactériologie Médicale. Presses universitaires de Lyon, France. p: 309.
- Florence B.J. (2014).** Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de bactéries marines. Thèse de doctorat en Microbiologie/Biochimie. Université de Toulon, Toulon. p: 76.
- Floret N., Bertrand X., Thouverez M., Talon D. (2009).** Infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* : origine exogène ou endogène de la bactérie responsable ? *Pathologie Biologie*. 57: 9-12.
- Fredheim E.G., Klingenberg C., Rohde H., Frankenberger S., Gaustad P., Flaegstad T., Johanna Ericson S. (2009).** Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 47(4): 1172–1180.
- Freire M.P., de Oliveira Garcia D., Garcia C.P., Campagnari Bueno M.F., Camargo C.H., Kono Magri A.S.G., Francisco G.R., Reghini R., Vieira M.F., Ibrahim K.Y., Rossi F., Hajjar L., Levin A.S., Hoff P.M., Pierrotti L.C., Abdala E. (2016).** Bloodstream infection caused by extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in cancer patients: high mortality associated with delayed treatment rather than with the degree of neutropenia. *Clinical Microbiology and Infection*. 22: 352–358.
- Freney J. (2007).** Précis de bactériologie clinique. ESKA, France. p: 783.
- Freney J., Kloos W.E., Hajek V., Webster J.A., Bes M., Brun Y., Vernozy-Rozand C. (1999).** Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 49: 489-502.
- Freney J., Reanaud F., Hansen W., Bollet C. (2000).** Précis de bactériologie clinique. ESKA, France. p: 557, 583, 597, 611.
- Freney J., Reanaud F., Hansen W., Bollet C. (2000).** Précis de bactériologie clinique. ESKA, France. p: 557,583, 597,611.

G

- Gaddy J.A., Tomaras A.P., Actis L.A. (2009).** The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infection and Immunity*. 77: 3150-3160.
- Gillespie S.H., Voelker L.L., Ambler J.E., Traini C., Dickens A. (2003).** Résistance aux fluoroquinolones chez *Streptococcus pneumoniae* : preuve que les mutations gyrA surviennent à un taux inférieur et que la mutation dans gyrA ou parC prédispose à une mutation ultérieure. *Microbial Drug Resistance*. 9: 17-24.
- Gniadkowski M. (2001).** Evolution and epidemiology of extended spectrum beta-lactamases and ESBL producing micro-organisms. *Clinical Microbiology Infection*. 7: 557-608.

- Goller C., Wang X., Itoh Y., Romeo T. (2006).** The cation-responsive protein NhaR of *Escherichia coli* activates pgaABCD transcription, required for production of the biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine. *Journal of Bacteriology*. 188: 8022-8032.
- Gotz F. (2002).** *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology*. 43(6): 1367–1378.
- Greenblat C. L., Baum J., Klein B.Y., Nachshon S., Koltunov V., Canoet R.J. (2004).** *Micrococcus luteus* – Survival in Amber. *Microbial Ecology*. 48: 120-127.
- Grenier D., Grignon L., Gottschalk M. (2009).** Characterisation of biofilm formation by a *Streptococcus suis* meningitis isolate. *Veterinary Journal*. 179(2): 292–5.
- Gross M., Cramton S.E, Gotz F., Peschel A. (2001).** Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infection and Immunity*. 69: 3423-3426.
- Guet-Revillet H., Le Monnier A., Breton N., Descamps P., Lecuyer H., Alaabouche I., Bureau C., Nassif X., Zahar J.R. (2012).** Environmental contamination with extended-spectrum β -lactamases: Is there any difference between *Escherichia coli* and *Klebsiella spp*? *American Journal of Infection Control*. 40: 845-848.
- Guiraud J. (2003).** Microbiologie alimentaire. Dunod, France. p: 185-265.
- H**
- Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. (2004).** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*. 2(2): 95-108.
- Hall-Stoodley L., Stoodley P. (2009).** Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology*. 11(7): 1034-1043.
- Hancock I.C. (1991).** Microbial cell surface architecture. In: Mozes N., Handley P.S., Busscher H.J., Rouxhet P.G. Microbial cell surface analysis: structural and physicochemical methods. VCH, Allemagne. p: 21-59.
- Harf-Monteil C., Prévost G., Monteil H. (2003).** Facteurs de virulence d'*Aeromonas caviae* isolés de cas cliniques. *Pathologie Biologie*. 52: 21-25.
- Harriott M.M., Noverr M.C. (2011).** Importance of Candida-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends Microbiology*. 19(11): 557–563.
- Hochedez P., Hope-Rapp E., Olive C., Nicolas M., Beaucaire G., Cabié A. (2009).** Caractéristiques des bactériémies à *Aeromonas hydrophila* aux Antilles. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 39: S25.
- Hola V., Ruzicka F. (2011).** The formation of poly-microbial biofilms on urinary catheters. *IntechOpen*. 153-172.
- Hu M., Zhang C., Mu Y., Shen Q., Feng Y. (2010).** Indole affects biofilm formation in bacteria. *Indian Journal of Microbiology*. 50: 362–368.
- I**
- Ilse V., Nele M., Filip V.N., Dieter D., Peter V., Liesbet D.B., Hans J. N., Pieter D., Tom C. (2012).** Assessment of microbial diversity in biofilms recovered from endotracheal tubes using culture dependent and independent approaches. *Journal pone*. 7: e38401.
- J**
- Jacoby G.A., Munoz-Price L.S. (2005).** The new beta-lactamases. *The New England Journal of Medicine*. 352(4): 380-391.
- Jain R., Danziger L.H. (2004).** Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians. *Annals of Pharmacotherapy*. 38(9): 1449-1459.
- Jalalpoor S. (2011).** Study of the antibiotic resistance pattern among the bacterial isolated from the hospital environment of Azzahra Hospital, Isfahan, Iran. *African. Journal of Microbiology*. 5: 3317-3320.
- Janda J.M., Abbott S.L. (2006).** The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*. *The Enterobacteria*, American Society for Microbiology Press, 2nd edition, USA. p: 115-129.
- John L.P., Mark E.R., Roger G.F. (2006).** Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy. Chemical Rubber Company, 1 ère Edition, Boca Raton, USA. p: 205.
- K**
- Kaprelyants A.S., Kell D.B. (1993).** Dormancy in stationary-phase cultures of *Micrococcus luteus*: Flow cytometric analysis of starvation and resuscitation. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(10): 3187-3196.
- Kerr K.G., Snelling A.M. (2009).** *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *Hospital Infection*. 73(4): 338-44.

- Kerrigan J.E., Rangunath C., Kandra L., Gyöngyi G., Liptákl A., Jánossy L., Kaplan J.B., Ramasubbu N. (2008). Modeling and biochemical analysis of the activity of antibiofilm agent Dispersin B. *Acta Biologica Hungarica*. 59: 439-451.
- Khalilzadeh P. (2009). Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. Thèse de doctorat en Microbiologie. Université Paul Sabatier (Toulouse III), France. 40p.
- Kim U.J., Kim H.K., An J.H., Cho S.K., Park K.H., Jang H.C. (2014). Update on the Epidemiology, Treatment, and Outcomes of Carbapenem-resistant *Acinetobacter* infections. *Chonnam Medical*. 50: 37-44.
- Kocur M., Kloos W.E., Schleifer K.H. (2006). The Genus *Micrococcus*. In Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. The Prokaryotes. Springer, 3^{ème} édition, USA. p: 961-971.
- Koji M., Yuka A., Akira Y., Keiji N. (2013). Detection of *Micrococcus Luteus* Biofilm Formation in Micro fluidic Environments by pH Measurement Using an Ion-Sensitive Field-Effect Transistor. *Sensors*. 13: 2484-2493.
- Kumar A., Schweizer H.P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57: 1486-1513
- L
- Labrie J., Pelletier-Jacques G., Deslandes V., Mahendrasingh R., Eliane A., John H.E.N., Mario J. (2010). Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Research*. 41: 03.
- Laganowska M.L., Kaznowski A. (2004). Restriction Fragment Length Polymorphism of 16S–23S rDNA Intergenic Spacer of *Aeromonas spp.* *Systematic and Applied Microbiology*. 27: 549–557.
- Lambert T. (2007). *Acinetobacter*. In Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E., Quentin R. Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Elsevier Masson, France. p: 344-346.
- Larpent J. (1997). Microbiologie des eaux d'alimentaire : Technique de laboratoire. Tec et Doc, p: 294-300.
- Lazdunski A. (2003). *Pseudomonas aeruginosa*: a model of choice for the study of opportunistic pathogen. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*. 22: 523-526.
- Le Heurt M., Gomila H., Guirot S., Rafaoni M.J. (1995). Nouveau Cahier de l'Infirmière. Masson, France. p: 158.
- Lebreton-Doussaud V., Simon L., Lestreit J.M., May I. (1999). Assurance qualité des préparations stériles : évaluation des techniques de prélèvements microbiologiques sur des surfaces. *Journal de Pharmacie Clinique*. 17: 227-231.
- Lee K.O., Park S.J., Kim J.H., Lee J.S., Kim P.K., Shin J.I. (2013). Outcomes of peritonitis in children on peritoneal dialysis: a 25-year experience at Severance Hospital. *Yonsei Medical Journal*. 54(4): 983–989.
- Lemend O., Donnio P.Y., Avril J.L. (2006). Pasteurelloses. Maladies Infectieuses. 8-035-C-10. Editions scientifiques et médicales Elsevier, France. p: 6.
- Lemmen S.W., Hafner H., Zoldann D., Stanzel S., Luttiken R. (2004). Distribution of multi-resistant Gram-negative versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment. *Journal Hospital Infection*. 56: 191-197.
- Lesne J., Fournier J.M. (1998). *Vibrio*. In Sutra L., Federighi M., Jouve J.L. Manuel de Bactériologie Alimentaire. Polytechnica, France. p: 308.
- Lie Souley Abdou Fousam Kourah. (2002). Sensibilité et révolution de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques à l'hôpital du Point G. Thèse de Doctorat. Université de Bamako, Mali. 115p.
- Lima de Silva A.A., de Carvalho M.A., de Souza S.A., Dias P.M., da Silva Filho R.G., de Meirelles Saramago C.S., de Melo Bento C.A., Hofer E. (2012). Heavy metal tolerance (Cr, Ag AND Hg) in bacteria isolated from sewage. *Brazilian Journal of Microbiology*. 43: 1620–1631.
- Little B.J., Wagner P.A., (1993). Interrelationship between marine biofouling and cathodic protection. *Journal of Materials Engineering and Performance*. 32: 16-20.
- Livemore D.M. (2003). Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact, An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Disease*. 36(1): 11–23.
- Longo F., Vuotto C., Donelli G. (2014). Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiology*. 37: 119-127.
- Lowe C., Willey B., O'Shaughnessy A., Lee W., Lum M., Pike K., Larocque C., Dedier H., Dales L., Moore C., McGeer A., and the Mount Sinai Hospital Infection Control Team. (2012). Outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella oxytoca* infections associated with contaminated hand washing sinks. *Emerging Infectious Diseases*. 18(8): 1242-1247.
- Lucet J. C., Astragneau P. (1998). Transmission des infections nosocomiales. Principe et prévention. In: Infection nosocomiales et environnement hospitalier. Flammarion, France. p : 7-10.

M

- Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T., Monnet D.L. Paterson D.L. (2012).** Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*. 18(3): 268-281.
- Mah T.F., O'Toole G.A. (2001).** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*. 9: 34-39.
- Malcher M., Volodkin D., Heurtault B., Andre P., Schaaf P., Mohwald H., Voegel J.C., Sokolowski A., Ball V., Boulmedais F., Frisch B. (2008).** Embedded silver ions-containing liposomes in polyelectrolyte multilayers: cargos films for antibacterial agents. *Langmuir*. 24: 10209-10215.
- Mallegol J., Duncan C., Prashar A., So J., Low D.E., Terebeznik M., Guyard C. (2012).** Essential roles and regulation of the *Legionella pneumophila* collagen like adhesin during biofilm formation. *Journal pone*. 7: e4646.
- Maltezou H.C., Giamarellou H. (2006).** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 27: 87-96.
- Mamod A. (2016).** Entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3eme génération : quelles alternatives aux carbapénèmes ? Etude prospective de la sensibilité in vitro du céfépime, du mécillinaam et de la témocilline au CHU de Poitiers. Thèse de Doctorat en pharmacie. Université de Poitiers, France. 18p.
- Martin D.J.H., Denyer S.P., McDonnell G., Maillard J.Y. (2008).** Resistance and cross-resistance to oxidizing agents of bacterial isolates from endoscope washer disinfectors. *Journal of Hospital Infection*. 69(4): 377-383.
- Martin S., Peter W., Benten M., Engelhardt E., Gougoula C., Laurentiu B. (2015).** Characterization of Biofilm Formation in *Pasteurella pneumotropica* and *Actinobacillus muriss* Isolates of Mouse Origin. *Journal pone*. 10(10): e0138778.
- Martinez-Urtaza J., Bowers J.C., Trinanes J., Depaola A. (2010).** Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses. *Food Research International*. 43: 1780-1790.
- Mary P., Chihib N.E., Charafeddine O., Defives C., Hornez J.P. (2002).** Starvation Survival and Viable but non culturable states in *Aeromonas hydrophila*. *Microbial Ecology*. 43: 250-258.
- Massa S. (2003).** Susceptibility to chlorine of *Aeromonas hydrophila* strains. *Journal of Applied Microbiology*. 86(1): 169-173.
- Maza M.L., Pezzlo T.T., Peterson M.E., Shigei T.J. (2004).** Color Atlas of Medical Bacteriology. ASM Press, Washington. p: 316.
- Mbutshu H.L., Ntambwe A.M., Ngatu R.N., Sukanuma N., Wembonyama S.O., Kabyla I. (2013).** Gestion des déchets d'activités de soins et entretien des locaux à l'hôpital de référence Jason Sendwe de Lubumbashi. *République Démocratique du Congo*. 21(3): 159-162.
- Mcdonnell G., Russell A.D. (1999).** Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(1): 147-79.
- Mérens A., Aurélie S. (2010).** Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010. La résistance aux anti-infectieux. *Revue francophone des laboratoires*. 422: 33-41.
- Mladenović K.G., Muruzović M.Z., Čomić L.R. (2018).** The effects of environmental factors on planktonic growth and biofilm formation of *Serratia odorifera* and *Serratia marcescens* isolated from traditionally made cheese. *Acta Alimentaria*. 47(3): 370-378.
- Moniri R., Kheltabadi-Farahani R., Shajari G.H., Nazem-Shirazi M.H., Ghasemi A. (2010).** Molecular epidemiology of aminoglycosides resistance in *Acinetobacter* Spp. with emergence of multidrug-resistant strains. *Iranian Journal of public health*. 39(2): 63-68.
- Moreland J. G., Bailey G. (2006).** Neutrophil transendothelial migration in vitro to *Streptococcus pneumoniae* is pneumolysin dependent. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*. 290(5): L833-840.
- Motes M.L., Depaola A., Cook D.W., Veazey J. E., Hunsucker J.C., Garthright W.E., Blodgett R.J., Chirtel S.J. (1998).** Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*). *Applied Environmental Microbiology*. 64: 1459-1465.
- Mukerji R., Kakarala R., Smith S.J., Kusz H.G. (2016).** *Chryseobacterium indologenes*: an emerging infection in the USA. *BMJ Case Reports*. 2016: 214486.

N

- Nagant C., Tré-Hardy M., Devleeschouwer M., Dehaye J.P. (2010).** Study of the initial phase of biofilm formation using a biofomic approach. *Microbiological Methods*. 82: 243-248.
- Nam I.Y., Joh K. (2007).** Rapid detection of virulence factors of *Aeromonas* isolated from a trout farm by Hexaplex-PCR. *Journal of Microbiology*. 45: 297-304.
- Navarro-Villoslada F., Orellana G., Moreno-Bondi M.C., Vick T., Dri-Ver M., Hildebrand G., Liefeyth K. (2001).** Fiber-optic luminescent sensors with composite oxygen-sensitive layers and anti-bio-fouling coatings. *Analytical Chemistry*. 73: 5150-5156.

O

- O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. (2000).** Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*. 54: 49–79.
- Oie S., Kiyonaga H., Matsuzaka Y., Maeda K., Masuda Y., Tasaka K., Aritomi S., Yamashita A., Kamiya A. (2008).** Microbial contamination of fruit and vegetables and their disinfection. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31(10): 1902-1905.
- Otter J.A., Yezli S., French G.L. (2011).** The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 32(7): 687-699.
- Otter J.A., Yezli S., Salkeld J.A.G., French G.L. (2013).** Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. *American Journal of Infection Control*. 41(5): S6–11.
- Otto M. (2008).** Staphylococcal biofilms, In: Bacterial biofilms. *Current topics in Microbiology and Immunology*. 322: 207-228.

P

- Palmer J., Flint S., Brooks J. (2007).** Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 34: 577-88.
- Pantarella F., Valenti P., Natalizi T., Passeri D., Berlutti F. (2013).** Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Annali di Igiene*. 25: 31-42.
- Peleg A.Y., Seifert H., Paterson D.L. (2008).** *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 21: 538-582.
- Pepperell C., Kus J.V., Gardam M.A., Humar A., Burrows L.L. (2002).** Low-Virulence *Citrobacter* Species Encode Resistance to Multiple Antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46(11): 3555-3560.
- Philippon A., Arlet G. (2006).** β -Lactamases de bacilles à Gram négatif: le mouvement perpétuel. *Annales de biologie clinique*. 64(1): 37-51.
- Powell S., Perry J., Meikle D. (2003).** Microbial contamination of non-disposable instruments in otolaryngology out-patients. *The Journal of Laryngology and Otology*. 117(02): 122-125.
- Prescott M. (2009).** Microbiologie. De Boeck, 2eme edition, France. p: 600-603.
- Prescott M., Harley P., Klein A. (1999).** Microbiologie. De Boeck, 2eme édition, France. p: 981.
- Prescott M., Harley P., Klein A. (2010).** Microbiologie. De Boeck, 2ème édition, France. p : 800-845.
- Purdy C.W., Raleigh R.H., Collins J.K., Watts J.L., Trau O.C. (1997).** Serotyping and enzyme characterization of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolates recovered from *pneumonie lungs* of stressed feeder calves. *Current Microbiology*. 34: 244-249.
- Purmal K., Chin S., Pinto J., Yin W., Chan K. (2010).** Microbial contamination of orthodontic buccal tubes from manufacturers. *International Journal of Geographical Information Science*. 11(9): 3349-3356.

Q

- Qin W., Zhao J., Yu X., Liu X., Chu X., Tian J., Wu N. (2019).** Improving Cadmium Resistance in *Escherichia coli* through Continuous Genome Evolution. *Frontiers in Microbiology*. 10: 278.

R

- Rampling A., Wiseman S., Davis L., Hyett A.P., Walbridge A.N., Payne G.C., Cornaby A.J. (2001).** Evidence that hospital hygiene is important in the control of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Hospital Infection*. 49: 109-116.
- Rebiahi A. (2012).** Caractérisation des souches de *Staphylococcus aureus* et étude de leur antibiorésistance au niveau du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen. Thèse de Doctorat en Microbiologie, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. 35p.
- Rieux V. (2002).** Les facteurs de virulence de *Streptococcus pneumoniae*. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 32(1): 1- 12.

- Rivas L., Dykes G.A., Fegan N. (2007).** A comparative study of biofilm formation by Shiga toxigenic *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and a microtitre plate method. *Microbiological Methods*. 69: 44-51.
- Robert D. (2013).** *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) : généralités, antibiotiques actifs, résistances acquises, et implication en pathologie communautaire illustrée par l'exemple des infections acquises au cours de la pratique sportive. Thèse de Doctorat en pharmacie. Université Angers, France. 21-22p.
- Roberts C.G. (2013).** The role of biofilms in reprocessing medical devices. *American Journal of Infection Control*. 41(5): S77-80.
- Robin F., Gibold L., Bonnet R. (2012).** Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne. *Revue Francophone des Laboratoires*. 445: 47-58.
- Rodier J., Bazin C., Broutin J.P., Chambon P., Champsaur H., et Rodi L. (2005).** L'analyse de l'eau: Eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer. Chimie, physico-chimie, microbiologie, biologie, interprétation des résultats. Dunod, 8ème Edition, France.
- Römling U., Amikam D. (2006).** Cyclic diGMP as a second messenger. *Current Opinion in Microbiology*. 9: 218-228.
- Roux D., Aubier B., Cochard H., Quentin R., Van Der Mee-Marquet N. (2013).** Contaminated sinks in intensive care units: an underestimated source of extended-spectrum betalactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the patient environment. *Journal of Hospital Infection*. (85): 106-111.
- Russell A.D. (2002).** Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation. *Antimicrobial Chemotherapy*. 49(4): 597-99.
- S**
- Schaechter M, Medoff G., Eisenstein B.I. (1999).** Microbiologie et pathologie infectieuse. De boeck, France. p: 83-84.
- Scharmann W., Heller A. (2001).** Survival and transmissibility of *Pasteurella pneumotropica*. *Laboratory Animals*. 35: 163-166.
- Sechi L.A., Deriu A., Falchi M.P., Fadda G., Zanetti S. (2002).** Distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. isolated from Sardinian waters and from patients with diarrhoea. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 221-227.
- Sefraoui I. (2015).** Étude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents hôpitaux de l'ouest algérien. Thèse de Doctorat en Biologie. Université Abou Baker Belkaid, Tlemcen. 78p.
- Seghir A., Boucherit-Otmani Z., Sari-Belkharroubi L., Boucherit K. (2016).** Risque infectieux lié à la formation des biofilms multi-espèces (Candida—bactéries) sur cathéters vasculaires périphériques. *Journal de Mycologie Médicale*. 27: 20-27.
- Shapiro R.L., Altekrose S., Hutwagner S., Bishop R., Hammond R., Wilson S., Ray B., Thompson S., Tauxe R.V., Griffin P.M. & Vibrio working group. (1998).** The role of Gulf Coast oysters harvested in warmer months in *Vibrio vulnificus* infections in the United States, 1988–1996. *Journal of Infectious Diseases*. 178: 752–759.
- Silvestry-Rodriguez N., Bright K.R., Uhlmann D.R., Slack D.C., Gerba C.P. (2007).** Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila* by silver in tap water. *Journal of Environmental Science and Health Part A*. 42(11): 1579-1584.
- Sirinavin S., Dowell S.F. (2004).** Antimicrobial resistance in countries with limited resources: unique challenges and limited alternatives. *Semin Pediatr Infectious Diseases*. 15: 94-98.
- Smani Y., Fàbrega A., Roca I., Sánchez-Encinales V., Vila J., Pachón J. (2014).** Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 58: 1806-1808.
- Sohidul I. (2008).** Mécanismes de résistance aux antibiotiques dans chromosomiques *Pseudomonas aeruginosa* et *Neisseria gonorrhoeae*. Thèse de Doctorat en Biologie. 5p.
- Sorin M., Segal-Maurer S., Marino N., Urban C., Combest A., Rahal J.J. (2001).** Nosocomial transmission of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* following bronchoscopy associated with improper connection to the steris system 1 processor. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 22(7): 409-13.
- Steen G.S., Struve C., Krogfelt K.A., Reisner A. (2012).** Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 65(2): 350-359.

- Stepanovic S, Dakic I, Djukic S, Lozuk B, Svabic-Vlahovic M. (2002).** Surgical wound infection associated with *Staphylococcus sciuri*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 34: 685-686.
- Stepanovic S., Dragana V., Vladimir T., Tanja S., Maja C., Milena S.V. (2001).** Possible virulence factors of *Staphylococcus sciuri*. *Federation of European Microbiological Societies*. 199: 47-53.
- Stepanovic S., Jezek P., Vukovic D., Dakic I., Petras P. (2003).** Isolation of members of the *Staphylococcus sciuri* group from urine and their relationship to urinary tract infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 5262-5264.
- Strateva T., Yordanov D. (2009).** *Pseudomonas aeruginosa*. a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*. 58: 1133-1148.
- Strom M.S., Paranjpye R.N. (2005).** A *Vibrio vulnificus* Type IV Pilin Contributes to Biofilm Formation, Adherence to Epithelial Cells, and Virulence. *Infection and Immunity*. 73(3): 1411-1422.
- T**
- Talon D. (1999).** The role of the hospital environment in the epidemiology of multiresistant bacteria. *Hospital Infection*. 43: 13-17.
- Tena D., Aspiroz C., Figueras M.J., González-Praetorius A., Aldea M.J., Alperi A., Bisquet J. (2009).** Surgical site infection due to *Aeromonas* species: Report of nine cases and literature review. *Scandinavian. The Journal of Infectious Diseases*. 41: 164-170.
- Tenover F.C. (1995).** The best of times, the worst of times. The global challenge of antimicrobial resistance. *Pharmacy World and Science*. 17: 149-151.
- Thierry J., Perrier-Gros-Claude J.D., Masseron T., Ros A. (2007).** *Streptococcus pneumoniae* in Précis de bactériologie clinique. ESKA, France. 46: 899-909.
- Thomson J.M., Bonomo R.A. (2005).** The threat of antibiotic resistance in Gram- negative pathogenic bacteria: β -lactams in peril!. *Current Opinion in Microbiology*. 8: 518-524.
- Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. (2003).** Introduction à la microbiologie. Editions du renouveau pédagogique inc, 3eme édition, Canada. p: 945.
- Touati A., Medboua C., Touati D., Denine R., Brasme L., De Champs C. (2012).** CTX-M- 15- producing *Enterobacteriaceae* isolates causing bloodstream infections at the Beni-Messous hospital in Algiers (Algeria). *International Research Journal of Microbiology*. 3: 181-185.
- Tré-Hardy M., Vanderbist F., Traore H., Devleeschouwer M.J. (2008).** In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 31: 329-336.
- Truchado P., Gil-Izquierdo A., Tomás-Barberán F., Allende A. (2009).** Inhibition by chestnut honey of N-acyl-L-homoserine lactones and biofilm formation in *Erwinia carotovora*, *Yersinia enterocolitica*, and *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 11186-11193.
- V**
- Vallet I., Olson J.W., Lory S., Lazdunski A., Filloux A. (2001).** The chaperone/ usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98: 6911-6916.
- Vaneechoutte M., Dijkshoorn L., Nemec A., Kämpfer P., Wauters G. (2011).** *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods. In James Versalovic J., Carroll K.C., Funke G., Jorgensen J.H., Landry M.L., Warnock D.V. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology Press, 10 ème édition, USA. p: 714-738.
- Varon E., Houssaye S. (2006).** Résistance des agents infectieux impliqués dans les infections des voies respiratoires basses en France. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 36: 555-569.
- Vasudevan A., Mukhopadhyay A., Li J., Yuen E.G., Tambyah P.A. (2014).** A prediction tool for nosocomial multi-drug resistant gram-negative bacilli infections in critically ill patients – prospective observational study. *BMC Infectious Diseases*. 14: 615.
- Vergnaud M., Bourdon S., Brun M., Cattier B., Chanal C., Chardon H., Chomar M., Croizé J., Demachy M.C., Dupont P., Fosse T., Grignon B., Laurans G., Maugein J., Murbach V., Péchinot A., Ploy M.C., Prère M.F., Roussel-Delvallez M., Thoreux P.H., Vaucel J., Vernet-Garnier V., Weber M. (2003).** Observatoires régionaux du pneumocoque: analyse de la résistance aux antibiotiques et des sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* en 2001. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*. 37: 173-176.
- Vernozy-Rozand C., Mazuy C., Meugnier H., Bes M., Lasne Y., Fiedler F., Etienne I., Freney J. (2000).** *Staphylococcus fleuretti* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50: 1521-1527.
- Veysièrè A.J. (2019).** La résistance aux antibiotiques des bactéries les plus communément rencontrées dans les infections communautaires. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Bordeaux, France. 45p.

W

- Wang X., Preston J.F., Romeo T. (2004).** The PGA ABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *Journal of Bacteriology*. 186: 2724-2734.
- Wassenaar T., Ussery D., Nielsen L., Ingmer H. (2015).** Review and phylogenetic analysis of qac genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* species. *European Journal of Microbiology and Immunology*. 5: 44–61.
- Weaver L., Noyce J.O., Michels H.T., Keevil C.W. (2010).** Potential action of copper surfaces on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*. 109(6): 2200-2205.
- Wendt C., Dietze B., Dietz E., Ruden H. (1997).** Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *Clinical Microbiology*. 35(6): 1394-1397.
- Widmer A.F., Dettenkofer M. (2002).** Désinfection des surfaces : vieux rituel ou prévention ciblée ?. *Swiss Noso*. 09: 7-8.
- Wolfgang M.C., Kulasekara B.R., Liang X., Boyd D., Wu K., Yang Q., Miyada C.G., Lory S. (2003).** Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(14): 8484-8489.
- Wroblewska M.M., Sawicka-Grzelak A., Marchel H., Luczak M., Sivan A. (2008).** Biofilm production by clinical strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients hospitalized in two tertiary care hospitals. *Federation of European Microbiological Societies, Immunology and Medical Microbiology*. 53: 140-144.
- Wu C., Labrie J., Tremblay Y.D.N., Haine D., Mourez M., Jacques M. (2013).** Zinc as an agent for the prevention of biofilm formation by pathogenic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 115: 30–40.

X

- Xia G., Kohler T., Peschel A. (2010).** The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*. 300: 148-154.
- Xu B., Wozniak D.J. (2015).** Development of a Novel Method for Analyzing *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility and Its Application to Define the AmrZ Regulon. *Journal pone*. 10(8): e0136426.

Y

- Yannick D.N., Tremblay S.H., Mario J. (2014).** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 78: 110-116.
- Yaradou D.F., Raze D., Ginevra C., Ader F., Doléans Jordheim A., Vandenesch F., Franco Dante M., Jerome E., Sophie J. (2007).** Zinc dependent cytoadherence of *Legionella pneumophila* to human alveolar epithelial cells in vitro. *Microbial Pathogenesis*. 43: 234-242.
- Yi-Cheng C., Hsueh-Hsia Lo., Hsiu-Ying H., Shan-Min C. (2014).** Identification, epidemiological relatedness, and biofilm formation of clinical *Chryseobacterium indologenes* isolates from central Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 48: 559-564.
- Yildiz F.H., Visick K.L. (2009).** Vibrio biofilms: so much the same yet so different. *Trends Microbiology*. 17(3): 109–118.

Z

- Zahoun A., Dao I., Karfo R., Essayagh T., Sekhsokh Y., Bousta M., Elhamzaoui S. (2010).** Méningite nosocomiale postopératoire à *Acinetobacter baumannii* multirésistant en neurochirurgie : à propos d'un cas nosocomial. *Pathologie Biologie*. 60: 29-31.
- Zenati K., Touati A., Bakour S., Sahli F., Rolain J.M. (2015).** Characterization of NDM-1 and OXA-23 producing *Acinetobacter baumannii* isolates from inanimate surfaces in hospital environment in Algeria. *Hospital Infection*. 92: 19-26.
- Zidouch A. (2019).** Le profil bactériologique des bactériémies et l'état de résistance aux antibiotiques. Thèse de Doctorat en Médecine. Université Cadi Ayyad, Marrakech. 28p.
- Zogaj X., Bokranz W., Nimtz M., Romling U. (2003).** Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract. *Infection and Immunity*. 71: 4151-4158.

Annexes

Annexe I

- **Composition des milieux de culture (Guiraud, 2003 ; Rodier *et al.*, 2005 ; Delarras, 2014).**

1. Gélose Hektoen (g/ litre d'eau distillée)

Protease peptone	12
Extrait de levure	3
Chlorure de sodium	5
Thiosulfate de sodium	5
Sels biliaires	9
Citrate de ferrique ammoniacale	1,5
Salicine	2
Saccharose	12
Lactose	2
Fuchsine acide	0,04
Bleu de brothynol	0,06
Agar agar	1,4
pH= 7,5	

2. Gélose SS, *Salmonella-Shigella* (g/ litre d'eau distillée)

Peptone	5
Extrait de viande	5
Lactose	10
Citrate de sodium	10
Citrate de fer (III)	1
Désoxycholate	8,5
Vert brillant	0,3
Rouge neutre	25
Na ₂ S ₂ O ₃	8,5
Agar-agar	15
pH = 7,2 / autoclavage à 120°C pendant 15 minutes.	

3. Chapman (g/ litre d'eau distillée)

Peptone tryptique de caséine	10
Extrait de viande	1
Chlorure de sodium	75
Mannitol	10
Rouge de phénol	0,025
Agar-agar	15
pH = 7,6 / autoclavage 20 min à 121°C.	

4. Gélose Mueller-Hinton (g/ litre d'eau distillée)

Infusion de viande de bœuf	3,0
Peptone de caséine	17,0
Amidon de maïs	1,5
Agar-agar	17,0
pH= 6,7/ autoclavage 15 min à 121°C.	

5. Gélose nutritive (G.N) (g/ litre d'eau distillée)

Peptone peptique de viande	5
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2
Chlorure de sodium	5
Agar-agar	15
pH: 7,4±0,2/ autoclavage 15 min à 121°C.	

6. Bouillon Mueller-Hinton (g/ litre d'eau distillée)

Hydrolysât acide de caséine	17,5
Infusion de viande	2,0
Amidon soluble	1,5
Peptone	1,5
pH= 6,7/ autoclavage 15 min à 121°C.	

7. Bouillon Nutritif (g/ litre d'eau distillée)

Peptone	5,0
Extrait de viande	1,0
Extrait de levure	2,0
Chlorure de sodium	5,0
pH=7,4 ± 0,2 à 25 °C / autoclavage à 121° C pendant 15 min	

8. Bouillon Nitrate (g/ litre d'eau distillée)

Peptone	5,0
Extrait de viande	3,0
Nitrate de potassium	1,0
pH = 7,0 ± 0,2 / stérilisation à l'autoclave 15 min à 121°C	

9. Bouillon Tryptone-Soja (g/ litre d'eau distillée)

Peptone	20
Glucose	2,5
Chlorure de sodium	5

Hydrogénophosphate de potassium pH= 7,3±0,2 autoclavage 15 min à 121°C.	2,5
--	-----

10. Milieu TSI (g/ litre d'eau distillée)

Extrait de l'œuf	3
Agar	12
Extrait de levure	3
Peptone	20
Lactose	10
Saccharose	10
NaCl	5
Glucose	1
Citrate ferrique	3
Thiosulfate de sodium	3
Rouge de phénol	0,025
pH = 7,4	

11. Clark et Lubs (g/ litre d'eau distillée)

Peptone tryptique de caséine	5
Phosphate bi potassique	5
Glucose	5
pH = 7,5 /autoclavage 15 min à 121°C	

12. Citrate de Simmons (g/ litre d'eau distillée)

Citrate de sodium	1,0
Bleu de bromothymol	0,08
Chlorure de sodium	5,0
Sulfate de magnésium	0,2
Hydrogénophosphate de potassium	1,0
Dihydrogénophosphate d'ammonium	1,0
Agar-agar	15,0
pH = 7 / autoclavage 15 min à 121°C	

13. Urée-Idole (g/ litre d'eau distillée)

L-tryptophane	3
Phosphate monopotassique	1
Phosphate di potassique	1
Chlorure de sodium	5
Urée	20
Solution rouge de phénol à 1%	2,5
Alcool à 95°	10
pH = 7 /autoclavage 15 min à 121°C	

14. Mannitol-Mobilité (g/ litre d'eau distillée)

Peptone pancréatique de viande	20,0
Mannitol	2,0
Nitrate de potassium	1,0
Rouge de phénol solution à 1%	4,0
Agar agar	4,0
pH=7,2 /autoclavage 15 min à 121°C	

- **Composition des réactifs et des colorants (Guiraud, 2003 ; Rodier *et al.*, 2005).**

a. Violet de Gentiane

Violet de gentiane	1g
Ethanol à 90%	1ml
Phénol	2g
Eau distillée	100ml

b. Lugol

Iode	1g
Iodure de potassium	2g
Eau distillée	100ml

c. Fuchshine

Fuchsine basique	1g
Alcool éthylique	100ml
Phénol	15g
Eau distillée	100ml

d. Réactif du rouge de méthyle

Rouge de méthyle	0,5 g
Alcool à 80°	100ml

e. Réactif TDA (pour la recherche de tryptophane désaminase)

Perchlorure de fer	3,4g
Eau distillée	100ml

f. Réactif Kovacs (pour la recherche de l'indole)

Paradiméthylaminobenzaldéhyde	5,0 g
Alcool isoamylique	75,0 ml
HCL 37%	25,0 ml

g. Réactif VPI (pour la recherche de l'acétoïne)

Hydroxyde de potassium	40g
Eau distillée	100ml

h. Réactif VPII (pour la recherche de l'acétoïne)

Alpha naphthol	6g
Ethanol	100ml

i. Réactif NIT I (pour la recherche du nitrate réductase)

Acide sulfamilique	0,8 g
Acide acétique 5N	100 ml

j. Réactif NIT II (pour la recherche du nitrate réductase)

Naphtylamine	0,5 g
Acide acétique 5N	100 ml

Annexe II

Tableau 16 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E
(Source : <http://www.biomerieux.com>).

Test	Groupements active	Réactions / Enzymes	Résultats	
ONPG	Ortho-nitro-phényle-B-D-Galactopyranoside	Beta-galactosidase	Négative	Positive
			incolore	jaune
ADH	L-Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge-Orangé
LDC	L-Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Rouge-Orangé
ODC	L-Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge-Orangé
ICIT	TriSodium citrate	Utilisation de citrate	Vert	Bleu-vert/orange
H2S	Thiosulfate de sodium	Production de H2S	Incolore	Noir
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge-Orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Jaune	Marron
IND	Tryptophane	Production d'indole	Incolore	Rose
IVPI	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP1+ VP2	
			Incolore	Rose/rouge
IGELI	Gélatine (origine bovine)	Gélatinase	Pas de diffusion de pigment noir	Diffusion de pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune/jaune-gris
MAN	D-Mannitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
SOR	D-Sorbitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
RHA	L-Rhamnose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
SAC	D-Saccharose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
MEL	D- Melibiose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
Réduction des nitrates (GLU tube)	Potassium nitrate	Production de NO2	NIT 1+NIT 2, 2-3 min	
			Jaune	Rouge
		Réduction au N2	Zn / 5 min	
			Orange-rouge	jaune
OF-O	glucose	Oxydation du glucose	vert	jaune
OF-F	glucose	Fermentation du glucose sous l'huile	vert	jaune

Tableau 17: Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 NE(Source : <http://www.biomerieux.com>).

Tests	Substrat	Enzymes/Réactions	Résultats	
			Négatif	Positif
NO3	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 mn	
			Incolore	Rose/rouge
		Réduction des nitrates en azote	ZN / 5 mn	
			Incolore	Rose
TRP	Tryptophane	Formation d'indole	TRP / 3-5 mn	
			Incolore	Rose / rouge
GLU	Glucose	Fermentation	Bleu à vert	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rose/rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange/rose/rouge
ESC	Esculine	Hydrolyse (β -glucosidase)	Jaune	Gris/marron/noir
GEL	Gélatine	Hydrolyse (protéase)	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	p-Nitro-phényle- β D-Galactopyranoside	B-galactosidase	Incolore	Jaune
GLU	Glucose	Assimilation	Transparence	Trouble
ARA	Arabinose			
MNE	Mannose			
MAN	Mannitol			
NAG	N-acétyl-glucosamine			
MAL	Maltose			
GNT	Potassium Gluconate			
CAP	Acide Caprique			
ADI	Acide Adipique			
MLT	Acide Malique			
CIT	Trisodium Citrate			
PAC	Phényl-acétate			
OX	Tetraméthyl-p-phénylène diamine			