

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 *Bacillus* et  
*Pseudomonas* isolés du milieu hospitalier**

---

Présenté par :

- BOUCHEDAK Khadidja
- MERCHLA Hanane

Devant le jury :

Dr. HAMDIKANE M.  
Dr. BENHALIMA L.  
Dr. AMRI S.

Présidente  
Promotrice  
Examinatrice

Université de Guelma  
Université de Guelma  
Université de Guelma

Septembre 2020

## Remerciements

*Notre gratitude et nos remerciements les plus forts vont, au préalable, à ALLAH, le tout puissant qui en permis que nous réalisons ce rêve. Celui d'attendre le moment de soutenance devant jury universitaire, d'un sujet de mémoire pour l'obtention de ce passeport magique qui est le master, clé et promesse d'un avenir radieux,*

*Nous remercions particulièrement les membres du jury qui ont bien voulu consacré une partie de leur temps à juger ce travail :*

*Madame HAMDIKANE M., Docteur à l'Université de Guelma, pour l'honneur qu'elle nous fait en président le jury de ce mémoire.*

*Madame AMRI S., Docteur à l'Université de Guelma, pour avoir pris sur elle, d'examiner et superviser le contenu de ce travail*

*Nous tenons spécialement à remercier Madame BENHALIMA L., notre enseignante et promotrice qui nous a accompagnée et encouragée de bout en bout, avec toute la disponibilité et l'intérêt voulus. À elle, notre gratitude et notre reconnaissance sans faille pour le soutien manifesté et témoigné. La gentillesse, ses manières particulières de communication ont été fortement appréciées, encore une fois, nous lui disons merci.*

*Nos remerciements s'adressent à toutes celles ou ceux qui d'une manière ou d'une autre, à la bibliothèque, à l'administration, aux laboratoires y ont participé, aidé, ou soutenu nos efforts dans l'élaboration et la mise en forme de ce mémoire de fin d'étude.*

*Enfin nous tenons à remercier nos parents pour leur soutien constant et leurs encouragements qui ont contribué à la réussite de ce travail, aussi bien dans les bons moments que dans ceux de doutes et d'impatience.*

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. Définition de l'environnement hospitalier	3
I.2. Microorganismes présents dans l'environnement hospitalier	3
I.2.1. Bactéries	3
I.2.2. Champignons	4
I.2.3. Virus	4
I.2.4. Parasites	4
I.3. Rôle du milieu hospitalier dans la survenue des infections nosocomiales	4
I.4. Diffusion des bactéries multirésistantes dans l'environnement hospitalier	5
II. <i>Bacillus</i>	6
II.1. Classification	6
II.2. Caractères généraux	6
II.3. Pouvoir pathogène	7
II.4. Présence de <i>Bacillus</i> dans le milieu hospitalier	7
II.5. Résistance de <i>Bacillus</i> aux agents antibactériens	8
II.5.1. Résistance de <i>Bacillus</i> aux antibiotiques	8
II.5.1.1. Résistance aux $\beta$ -lactames	8
II.5.1.2. Résistance à la vancomycine	9
II.5.1.3. Résistance à la ciprofloxacine	9
II.5.1.4. Résistance à autres antibiotiques	9
II.5.2. Résistance des <i>Bacillus</i> à autres agents antibactériens	10
II. <i>Pseudomonas</i>	11
III.1. Classification	11
III.2. Caractères généraux	11
III.3. Pouvoir pathogène	12
III.4. Présence de <i>Pseudomonas</i> dans le milieu hospitalier	12
III.5. Résistance de <i>Pseudomonas</i> aux agents antibactériens	13
III.5.1. Résistance de <i>Pseudomonas</i> aux antibiotiques	13
III.5.1.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines	13
III.5.1.2. Résistance aux aminosides	14

III.5.1.3. Résistance aux fluoroquinolones	15
III.5.1.4. Résistance à autres antibiotiques	15
III.5.2. Résistance de <i>Pseudomonas</i> à autres agents antibactériens	16
IV. Biofilm et environnement hospitalier	17
IV.1. Mécanisme de formation des biofilms	17
IV.1.1. Conditionnement de la surface et adhésion	18
IV.1.2. Maturation de biofilm	18
IV.1.3. Dispersion du biofilm	18
IV.2. Diversité bactérienne dans les biofilms du milieu hospitalier	19
IV.3. Stratégies antibiofilm	20

## Chapitre II : Étude expérimentale

I. Cadre d'étude	22
II. Échantillonnage et technique de prélèvement	23
II.1. Échantillonnage	23
II.2. Technique de prélèvement	23
III. Méthodologie	24
III.1. Isolement et identification phénotypique des souches bactériennes	24
III.1.1. Isolement des souches bactériennes	24
III.1.2. Identification phénotypique des souches bactériennes	26
III.1.2.1. Identification morphologique	26
III.1.2.2. Recherche des enzymes respiratoires	27
III.1.2.3. Test de thermorésistance	28
III.1.2.4. Recherche des pigments	28
III.1.2.5. Biotypage par microgalerie API	29
III.1.3. Conservation des souches bactériennes	29
III.2. Étude de la résistance des bactéries aux antibiotiques	31
III.2.1. Technique de l'antibiogramme	31
III.2.2. Antibiotiques testés	32
III.3. Étude de la capacité de formation de biofilm	33

## Chapitre III : Résultats et Discussion

I. Isolement et identification phénotypique des isolats bactériens	35
I.1. Identification morphologique	35
I.2. Enzymes respiratoires	36
I.3. Test de thermorésistance	37
I.4. Recherche des pigments de <i>Pseudomonas</i>	38
I.5. Biotypage par microgalerie API	38
I.6. Discussion	40

II. Étude de la résistance des bactéries aux antibiotiques	43
II.1. <i>Bacillus</i>	43
II.2. <i>Pseudomonas</i>	45
II.3. Discussion	46
III. Capacité de formation de biofilm : étude synthétique	49
<b>Conclusion et perspectives</b>	52
<b>Références bibliographiques</b>	53
<b>Annexes</b>	63

Figure	Titre	Page
Figure 1	Étapes de la formation d'un biofilm (Yannick et al., 2014).	17
Figure 2	(a) Aspects macroscopiques et (b) microscopiques de certains isolats bactériens.	36
Figure 3	Présence et/ou absence des enzymes respiratoires chez certains isolats bactériens.	37
Figure 4	Résultat du test de présomption de la sporulation des souches de <i>Bacillus</i> avec production de pigment vert.	37
Figure 5	Résistance aux antibiotiques des <i>Bacillus licheniformis</i> .	43
Figure 6	Antibiogramme des différents isolats de <i>Bacillus licheniformis</i> .	44
Figure 7	Résistance aux antibiotiques des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	45
Figure 8	Antibiogramme des différents isolats de <i>Pseudomonas</i> .	46

Schéma	Titre	Page
Schéma 1	Isolement et identification des souches de <i>Bacillus</i> et <i>Pseudomonas</i> .	25

Tableau	Titre	Page
Tableau 1	Sites de prélèvement au niveau des sanitaires de différents établissements hospitaliers.	23
Tableau 2	Recherche des enzymes respiratoires.	27
Tableau 3	Préparation et inoculation de galeries biochimiques miniaturisés API (source : <a href="http://www.biomerieux.com">http://www.biomerieux.com</a> ).	30
Tableau 4	Critères des antibiotiques testés sur les souches bactériennes (IPP, 1981).	32
Tableau 5	Aspects macroscopiques et microscopiques des <i>Bacillus</i> et <i>Pseudomonas</i> isolés à partir de l'environnement hospitalier de certains établissements publics de la région de Guelma.	35
Tableau 6	Recherche des enzymes respiratoires des isolats bactériens.	36
Tableau 7	Profils biochimiques des isolats bactériens sur les galeries miniaturisées API.	38
Tableau 8	<i>Bacillus</i> et <i>Pseudomonas</i> isolés à partir de l'environnement des établissements publics hospitaliers de la région de Guelma.	39
Tableau 9	Profils antibiotypiques associés aux souches de <i>Bacillus licheniformis</i> .	44
Tableau 10	Profils antibiotypiques associés aux souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	45
Tableau 11	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20E (source : <a href="http://www.biomerieux.com">http://www.biomerieux.com</a> ).	67
Tableau 12	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 NE ( <a href="http://www.biomerieux.com">http://www.biomerieux.com</a> ).	68

**AAC** : aminosides acétyltransférases

**AAD** : Aminoglycoside-Adenylyl-  
transférase

**ADNe** : Acide  
Désoxyribonucléiqueextracellulaire

**AmpC** : Adénosine monophosphate  
cyclique

**ANT** : Aminosides  
Nucléotidyltransférases

**APH** : Aminosides  
phosphotransférases

**API** : Analytical Profile Index

**BLSE** : Béta-lactamases à spectre élargi

**BMR** : Bactérie multirésistante

**BMS** : Bactérie multi sensible

**°C** : Degré Celsius

**C3G** : Céphalosporines de 3ème  
génération

**CaCl<sub>2</sub>** : Chlorure de calcium

**CAT** : chloramphenicoleacetyle  
transférase

**CDC** : Centers for Diseases Control

**DOt** : Densité optique témoin

**EDTA** : Acide éthylène diamine  
tétraacétique

**ERV** : Entérocoques résistant à la  
vancomycine

**ESCMID**: European Society of Clinical  
Microbiology Infectious Disease

**GC** : guanine-cytosine

**MβL** : Métallo-Bêta-Lactamases

**OMS** : Organisation mondiale de la  
Santé

**ORL** : Oto-Rhino-Laryngologie

**PBP** : penicillin binding proteins

**QS** : Quorum Sensing

**SDS** : Dodécylsulfate de sodium

**VHB** : Virus de l'Hépatite B



# 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 de *Bacillus* et de *Pseudomonas* en se basant sur leurs caractères cultureux et biochimiques, sur l'étude de leur résistance aux antibiotiques par méthode de diffusion sur milieu gélosé et leur capacité à former un biofilm par la technique de microplaque. L'identification phénotypique a révélé la présence de 4 *Bacillus licheniformis* et 4 *Pseudomonas aeruginosa*. La lecture et l'interprétation des antibiogrammes ont montré que 100 % des souches de *Bacillus licheniformis* sont résistantes à l'amoxicilline, la pénicilline G, la céfotaxime et le chloramphénicol. Concernant les *Pseudomonas aeruginosa*, une résistance totale à la colistine, la ceftazidime et à la céfazoline suivi par une résistance importante à la vancomycine et au chloramphénicol (75 %) ont été révélés. La prévalence des bactéries multi-résistantes (BMR) est de 100 %. 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 d'hygiène.

**Mots-clés :** *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas aeruginosa*, résistance aux antibiotiques, biofilm.

This work was carried out on 15 environmental samples from three hospitals located in the Guelma region. Our study focused on the identification of *Bacillus* and *Pseudomonas* strains based on their cultural and biochemical characteristics, on the study of their resistance to antibiotics by diffusion method on agar medium and their capacity to form a biofilm by Microtiter plate technique. Phenotypic identification revealed the presence of 4 *Bacillus licheniformis* and 4 *Pseudomonas aeruginosa*. Reading and interpreting the antibiograms showed that 100% of the strains of *Bacillus licheniformis* are resistant to amoxicillin, penicillin G, cefotaxime and chloramphenicol. Concerning *Pseudomonas aeruginosa*, total resistance to colistin, ceftazidime and cefazolin followed by significant resistance to vancomycin and chloramphenicol (75%) were revealed. The prevalence of multi-resistant bacteria (BMR) is 100%. A high probability of the capacity for biofilm formation by the isolated bacteria has been demonstrated by a synthetic study. These BMRs, which are probably biofilm-forming, constitute a worrying problem in hospitals, hence the need for rigorous application of hygiene rules.

**Keywords:** *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotic resistance, biofilm.

أجري هذا العمل على 15 عينة بيئية من ثلاثة مستشفيات تقع في منطقة قالمة. ركزت دراستنا على تحديد سلالات *Bacillus* و *Pseudomonas* بناءً على خصائصها الزراعية والكيميائية الحيوية ودراسة مقاومتها للمضادات الحيوية عن طريق انتشارها في وسط الزرع وقدرتها على تكوين الأغشية الحيوية بواسطة تقنية صفيحة المعايرة الدقيقة. كشف تحديد النمط الظاهري عن وجود *Bacillus licheniformis* 4 و *Pseudomonas aeruginosa* 4. أظهرت قراءة وتفسير المضادات الحيوية أن 100٪ من سلالات *Bacillus licheniformis* مقاومة للأموكسيسيلين والبنسلين G والسيفاتوكسيم والكلورامفينيكول أما فيما يتعلق بـ *Pseudomonas aeruginosa* فلقد سجلت المقاومة التامة لكوليسيتين وسيفتازيديم وسيفازولين وتليها مقاومة كبيرة للفانكوميسين والكلورامفينيكول بـ (75٪). إن نسبة انتشار البكتيريا المقاومة (BMR) هو 100٪. حيث أثبتت الدراسة النظرية أن هناك احتمالية عالية لقدرة هذه البكتيريا المعزولة على تكوين الأغشية الحيوية. تشكل هذه البكتيريا المقاومة BMRs التي ربما تكون غشاء حيوي مشكلة مقلقة في المستشفيات، وهذا يستدعي إلى تطبيق صارم لقواعد النظافة.

**الكلمات المفتاحية:** *Bacillus licheniformis* , *Pseudomonas aeruginosa* , مقاومة المضادات

الحيوية، الأغشية الحيوية.

# Introduction

L'environnement hospitalier est un réservoir de grandes variétés des bactéries pathogènes comme *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* et *Bacillus* colonisant des sites fréquemment touchés et des surfaces à proximité de patients tel que le lit, l'équipement médical et même les sanitaires (les sièges de toilette, les robinets et les éviers) (Bright et al., 2010 ; Schmidt et al., 2012 ; Koibuchi et al., 2013 ; Shiferaw et al., 2013).

Les surfaces inanimées servent donc de réservoir pour transmettre le micro-organisme à l'hôte par éventuelles formes de contact. Aussi au sanitaires, la transmission des pathogènes d'un patient à l'autre se produit par l'exposition à des bassins de bain ou un drain dévier contaminés (Hota et al., 2009 ; Marchaim et al., 2011). Les infections causées par ces fomites représentent un frein important au développement médical du fait de leur fréquence sans cesse croissante, de leur gravité et du fait de la multi-résistance des germes en cause (WHO, 2009).

*Pseudomonas* et *Bacillus* occupent une place très importante parmi les micro-organismes responsables d'infections nosocomiales en raison de leur capacité à croître dans des conditions hostiles et à résister aux agents antibactériens (Davane et al., 2014 ; Osman et al., 2017). Cependant, des années d'antibiothérapie intensive pour traiter les infections causées par ces genres bactériens entraînent le développement d'une résistance aux médicaments à cause de l'utilisation irrationnelle des antibiotiques qui conduisent finalement à l'échec du traitement (Gibson et al., 2003; Juan et al., 2005). Malheureusement, l'émergence mondiale de bactéries multirésistantes a entraîné une grande menace pour les efforts contre les agents pathogènes bactériens (Thomas et al., 2004).

En Algérie, les récentes données de la résistance aux antibiotiques indiquent une situation inquiétante. En effet, ces dernières années ont été marquées par l'émergence et la dissémination de nouveaux gènes de résistance notamment dans le nord du pays (Baba Ahmed-Kazi Tani et al., 2014). Selon les dernières enquêtes d'hygiène hospitalière épidémiologique au sein des services de chirurgie générale, des taux non négligeables de *Bacillus* et de *Pseudomonas aeruginosa* sont responsables des épidémies d'infections nosocomiales causées par leur transmission à partir des surfaces, petit matériel et des dispositifs médicaux (Baghdadi et al., 2020).

Un autre problème se pose aussi dans le milieu hospitalier est la formation de biofilm qui est une structure complexe formée grâce à l'agglomération des microorganismes. Il peut se développer sur n'importe quel type de surface naturelle ou artificielle et constitue un réservoir de plusieurs pathogènes résistants aux antibiotiques et aux désinfectants (Méar, 2014). Ce mode de vie pose des problèmes majeurs de santé publique et il est impliqué dans un large éventail d'infections chez l'homme (Roux et al., 2006). En effet, 65 % des infections bactériennes sont dues à des biofilms et plus de 80 % des infections bactériennes chroniques sont associées à la présence de biofilms (Rochemonteix, 2009).

Cette situation nous a amené à fixer les objectifs suivants :

- Recherche de deux genres bactériens ubiquistes et résistants (*Bacillus* et *Pseudomonas*) à partir des surfaces inanimées dans des établissements hospitaliers de la région de Guelma et de les caractériser phénotypiquement ;
- Détermination du profil antibiologique des souches bactériennes isolées ;
- Détermination de leur capacité de formation de biofilm *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 deux genres bactériens *Bacillus* et *Pseudomonas* et le concept de biofilm ;
- La deuxième relate notre travail expérimental, commençant par la présentation des méthodes utilisées, suivie des résultats obtenus 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. Définition de l'environnement hospitalier

L'environnement hospitalier est l'ensemble des éléments qui entrent en contact avec les patients, le personnel et/ou les visiteurs ; ces éléments sont principalement : l'air, l'eau (eau de réseau, eau de dialyse...), les surfaces (sols, murs, linge, mobilier, équipement), l'alimentation, les dispositifs médicaux, et les déchets (Saouide el ayne *et al.*, 2014).

Les éléments constituant l'environnement hospitalier sont face à une contamination microbiologique très variable qualitativement et quantitativement d'un établissement à l'autre et au sein d'un même établissement en fonction des services, des patients (sains, colonisés, infectés), des soins et des techniques pratiqués (Hajjar *et al.*, 2000).

### I.2. Microorganismes présents dans l'environnement hospitalier

Le milieu hospitalier constitue un immense réservoir de divers agents pathogènes malgré les efforts considérables déployés pour les éliminer ou restreindre leur croissance (Tortora *et al.*, 2003) :

#### I.2.1. Bactéries

Les bactéries représentent la majorité des pathogènes retrouvés dans le milieu hospitalier dont l'origine peut être humaine et/ou environnementale. La peau et les muqueuses des porteurs sains et/ou malades sont la principale source humaine des bactéries parmi lesquelles des souches multirésistantes aux antibiotiques comme les *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline et les entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre élargi (Talon, 1999). L'air atmosphérique, l'eau et le sol représentent l'origine environnementale des bactéries dans le milieu hospitalier dont certaines ont de fréquentes résistances naturelles aux antibiotiques, notamment les bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacte rbaumannii*, *Legionella pneumophila* et les mycobactéries atypiques (Talon, 1999).

### I.2.2. Champignons

Plusieurs infections nosocomiales sont d'origine fongique puisque les levures et surtout les champignons filamenteux environnementaux sont très bien adaptés à la survie et la multiplication dans l'environnement hospitalier. Une corrélation positive a été rapportée par plusieurs études entre la contamination de l'environnement hospitalier par des champignons et l'apparition des infections fongiques (Ducel *et al.*, 2002).

### I.2.3. Virus

Certaines infections nosocomiales sont causées par des virus, ces derniers contaminent aussi l'environnement le plus souvent à partir des réservoirs humains que constituent les patients et le personnel (Green *et al.*, 1998). Les virus respiratoires sont considérés comme la première catégorie des virus responsables des épidémies nosocomiales du fait de sa contagiosité extrême et prolongée (Malek *et al.*, 1996). D'autres virus comme le VHB et les virus responsables des gastro-entérites (*Rotavirus, Astrovirus, Calicivirus...*) peuvent être aussi responsables d'infections nosocomiales (Hajjar *et al.*, 2000).

### I.2.4. Parasites

Les formes infectantes de certains parasites contaminent fréquemment l'environnement hospitalier, c'est le cas notamment de *Cryptosporidium parvum*, des kystes d'amibes, de *Giardia intestinalis* ou d'autres parasites comme *Cyclospora* et les microsporidies (Gibson *et al.*, 1998). Il est important de signaler le rôle des amibes libres présentes dans les réseaux d'eau dans la favorisation de la multiplication de certaines bactéries pathogènes telle que *Legionella* spp. La viabilité de ces parasites dans le milieu extérieur est prolongée et les moyens de détection et de prévention restent limités (CTIN, 2002).

## I.3. Rôle du milieu hospitalier dans la survenue des infections nosocomiales

Les infections nosocomiales sont des infections contractées dans un établissement de soins et elle était absente (ni symptomatique ni en incubation) à l'admission du malade (Desenclos *et al.*, 2009). Cette infection est attribuée soit par des pathogènes présente chez le patient avant l'hospitalisation (origine endogène) soit par des pathogènes peuvent

provenir de la flore transitoire ou résidente du personnel soignant ou à partir de l'environnement hospitalier (origine exogène) (Horan *et al.*, 2008).

Les épidémies d'infections nosocomiales sont presque toujours associées à une transmission interhumaine, ou à la contamination de dispositifs médicaux ou d'un liquide normalement stérile (Rhame *et al.*, 1998). L'eau et plus rarement l'air ont été régulièrement mis en cause lors d'infections, voire d'épidémies contractées à l'hôpital (Durocher *et al.*, 2002).

Le contact avec des surfaces contaminées, telles que des poignées de portes, des brancards, des linges, à mains nues ou gantées pourrait être une source de transmission des microorganismes aux patients et à d'autres objets (Zubair *et al.*, 2018).

Les microorganismes fréquemment isolés à partir de ces zones sont les *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), les entérocoques résistant à la vancomycine (ERV) et *Clostridium difficile* (Tagoe *et al.*, 2011). Par conséquent, la présence d'un agent pathogène sur une surface à n'importe quelle concentration peut présenter un risque de transmission (Dancer, 2004).

#### **I.4. Diffusion des bactéries multirésistantes dans l'environnement hospitalier**

Une bactérie multirésistante (BMR) est définie après effort conjoint de l'*European Society of Clinical Microbiology Infectious Disease* (ESCMID) et du *Centers for Diseases Control* (CDC) comme une bactérie ayant acquise une résistance à au moins trois molécules de trois familles ou groupes d'antibiotiques différents auxquels elle est normalement sensible (Brun-Buisson *et al.*, 2015).

Les facteurs contribuant à la diffusion des BMR dans le milieu hospitalier sont principalement liés à l'utilisation massive des antibiotiques, l'absence de réseaux nationaux et régionaux de surveillance de la résistance et l'absence de réglementation pour l'acquisition des antibiotiques (Shears, 2001).

La transmission des BMR au milieu hospitalier se fait dans la majorité des cas par un contact direct entre deux personnes, soit d'une transmission par l'eau, l'air, les surfaces et le matériel contaminés (stéthoscope ou brassard à tension, thermomètre non personnel lors des soins, brancard...). Le risque de transmission est directement lié à la fréquence

des contacts avec les patients porteurs de BMR et au non-respect des précautions d'hygiène (Sehulster *et al.*, 2003).

## II. *Bacillus*

### II.1. Classification

*Bacillus* est l'un des plus grands et des plus omniprésents genres qui acquis une notoriété auprès des taxonomistes pour son extrême diversité phénotypique et son hétérogénéité (Koneman's *et al.*, 1997). Sa classification est la suivante (Larpent, 2000) :

- Règne : *Bacteria*
- Phylum XII : *Proteobacteraia*
- Embranchement : *Firmicutes*
- Classe : *Bacilli*
- Ordre : *Bacillales*
- Famille : *Bacillaceae*
- Genre : *Bacillus*
- Espèce : Il comprend 268 espèces et 7 sous-espèces, réparties en 3 groupes sur la base de la morphologie de l'endospore et du corps bactérien.

### II.2. Caractères généraux

Les *Bacillus* sont des bâtonnets droits à extrémité carrée ou arrondie, à Gram positif (les cultures âgées peuvent apparaître à Gram négatif), de dimension variable vont de 0,5 par 1,2  $\mu\text{m}$  à 2,5 par 10  $\mu\text{m}$  de diamètre. Leur GC% est de 32 à 69, ils forment des endospores et le plus souvent mobiles à flagelles péritriches. Ils sont aérobies, parfois facultatifs, et catalase positif (Prescott *et al.*, 2003).

Les milieux de culture usuels permettent la croissance de la plupart des espèces du genre *Bacillus* (exemple : gélose nutritive, gélose à la pomme de terre...) (Avril *et al.*, 1992). La majorité est des mésophiles avec une température optimale entre 30 et 45 C°, mais le genre contient également un certain nombre d'espèces thermophiles avec température optimale plus de 65 C° (Todar, 2003).

Le type trophique de la plupart des espèces est généralement chimiohétérotrophe, elles utilisent une variété de composés organiques simples (sucres, acides aminés, acides organiques). Dans certains cas, elles fermentent également les hydrates de carbone par réaction mixte qui produit typiquement le glycérol et le butanediol (Avril *et al.*, 1992).

### II.3. Pouvoir pathogène

Plusieurs espèces du *Bacillus* sont connues pathogènes, il s'agit notamment de *B. anthracis* la responsable du charbon, *B. cereus* qui provoque des toxi-infections alimentaires et *B. licheniformis*, *B. subtilis* et *B. pumilus* qui peuvent également causer des gastro-entérites, des septicémies, endocardite, endophtalmie, des infections respiratoires et des infections des plaies chirurgicales (Teyssou *et al.*, 1998 ; Castagnola *et al.*, 2001 ; Frankard *et al.*, 2004 ; Adler *et al.*, 2005).

Plusieurs facteurs de virulence sont décelés chez les *Bacillus* :

- La capsule qui aide les bactéries à échapper au système immunitaire par réduction de la phagocytose et protection contre le complément (Oh *et al.*, 2011) ;
- La spore qui est la principale forme infectieuse de l'organisme (Hanna *et al.*, 1999) ;
- Les toxines qui sont principalement des entérotoxines et une toxine émétique. Les entérotoxines sont hémolytiques (ou non), cytotoxiques et certaines sont capables de former des pores et de perturber l'intégrité de la membrane plasmique de cellules épithéliales entraînant ainsi une lyse cellulaire (Fagerlund *et al.*, 2008). Le céreulide est la toxine responsable du syndrome émétique, il est capable d'inhiber l'oxydation des acides gras au niveau de la mitochondrie en formant un canal dans sa membrane (Mikkola *et al.*, 1999) ;
- Les hémolysines I et II qui ont une activité cytolytique en formant des pores dans les membranes cytoplasmiques (Laurent, 2019)

### II.4. Présence de *Bacillus* dans le milieu hospitalier

Les *Bacillus* sont omniprésents dans l'environnement (Vilas-Boas *et al.*, 2007), ils se trouvent souvent dans le sol, l'air, l'eau et la nourriture (Fang *et al.*, 2007 ;

Ohsaki *et al.*, 2007). Les endospores de *Bacillus* sont des formes de vie particulièrement robustes qui permettent leur dispersion (Nicholson *et al.*, 2000 ; Nicholson, 2002). Dans l'environnement hospitalier, ces bactéries ont été détecté au niveau de plusieurs sites à savoir : des équipements, des gants, des draps, des poussières, des machines de ventilation, des cathéters veineux centraux, des solutions de calcium, de coton, des cultures de sang, des bouteilles et des équipements de laboratoire (Adler *et al.*, 2005 ; Berthelot *et al.*, 2006 ; Ohsaki *et al.*, 2007 ; Dohmae *et al.*, 2008).

Les spores des espèces des *Bacillus* survivent longtemps sur les surfaces et résistent à de nombreux désinfectants hospitaliers, ce qui les rend difficiles à éradiquer du milieu hospitalier (Brown, 2000).

## II.5. Résistance de *Bacillus* aux agents antibactériens

### II.5.1. Résistance de *Bacillus* aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques peut être naturelle où toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique, comme elle peut être acquise grâce à la capacité des bactéries de se transférer de l'information génétique entre elles (Tenover *et al.*, 1999).

#### II.5.1.1. Résistance aux $\beta$ -lactames

La pénicilline est un des tous premiers antibiotiques utilisés pour traiter l'anthrax. Toutefois, des études récentes démontrent que de 2 à 16 % des souches de *B. anthracis* d'origine clinique et environnementale ont une résistance acquise à la pénicilline (Fluit *et al.*, 2001 ; Cavallo *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 2003). La présence de  $\beta$ -lactamases et pénicillases inductibles explique souvent la résistance de *B. anthracis* à la pénicilline (Beharry *et al.*, 2004).

Les principaux mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines chez les autres *Bacillus* sont également enzymatiques ( $\beta$ -lactamases et pénicillases). Ces enzymes clivent le lien amide de l'anneau  $\beta$ -lactame de l'antibiotique et l'inactive (Fluit *et al.* 2001). En plus, la pénicilline se lie sur des protéines nommées PBP (penicillin binding proteins) et inhibe la formation des liens inter-peptidoglycanes qui résulte en une affinité réduite pour les  $\beta$ -lactames (Diekema *et al.*, 2004).

### II.5.1.2. Résistance à la vancomycine

La vancomycine est un antibiotique naturel de la classe des glycopeptides qui inhibe la synthèse de la paroi externe des bactéries à Gram positif (Fluit et al., 2001).

Le mécanisme de résistance à la vancomycine, le plus fréquent, rencontré chez les *Bacillus* est celui de l'altération de la cible de l'antibiotique. Les gènes connus pour conférer cette résistance sont *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2*, *vanC3*, *vanD*, *vanE* et *vanG*, mais le gène de résistance le plus répandu est le *vanA* ; Ce gène produit une enzyme alternative qui a pour effet de modifier la structure des précurseurs du peptidoglycane qui ne sont plus reconnus par l'antibiotique (Courvalin, 2006).

### II.5.1.3. Résistance à la ciprofloxacine

La ciprofloxacine est un antibiotique synthétique de la classe des fluoroquinolones ; elle est généralement utilisée pour traiter certaines infections causées par les *Bacillus* comme l'anthrax (Laflamme, 2008).

Le mécanisme de résistance à cet antibiotique est une mutation bien ciblée dans les gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE* encodant l'ADN gyrase (*gyr*) et la topoisomérase IV (*par*). Un autre mécanisme de résistance, moins fréquent, est de pomper l'antibiotique hors de la cellule limitant ainsi la pénétration de l'antibiotique à la cible (Fluit et al., 2001).

### II.5.1.4. Résistance à autres antibiotiques

- **Résistance aux tétracyclines :** Parmi les tétracyclines utilisés vis-à-vis des *Bacillus* est la doxycycline qui inhibe la synthèse protéique bactérienne (Tenover et al., 1999). Plusieurs gènes *tet* ont été identifiés chez les *Bacillus* et qui sont responsables de trois grands mécanismes de résistance soit de l'efflux actif (gènes *tetA* à *tetD* et *tetK*), de la modification de la cible (gène *tetM*) et de la modification enzymatique de l'antibiotique (gène *tetX*) (Chopra et al., 2001 ; Fluit et al., 2001).
- **Résistance à la rifampicine :** La rifampicine a été identifiée comme un antibiotique efficace pour traiter l'anthrax (Inglesby et al., 2002). C'est un antibiotique à large spectre qui empêche la transcription de l'ARN messager (ARNm) en se liant à la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase bactérien. Les *Bacillus* résistants à la rifampicine

produisent un ARN polymérase doté d'une sous-unité  $\beta$  différente mais fonctionnelle qui n'est plus reconnu par l'antibiotique (Telenti *et al.*, 1993 ; Campbell *et al.*, 2001).

- **Résistance au chloramphénicol** : Le chloramphénicol fait partie de la classe des phénicol, c'est un inhibiteur de la synthèse protéique en se liant à la sous-unité ribosomale 50S (Laflamme, 2008). Le mécanisme de résistance le plus fréquent décrit chez *Bacillus* est enzymatique médié par l'intermédiaire du gène *cat* (chloramphenicol acetyltransferase) (Fluit *et al.*, 2001) ;
- **Résistance à l'érythromycine** : L'érythromycine (classe des macrolides) est un antibiotique actif seulement contre les bactéries à Gram positives, il inhibe la synthèse protéique en se liant à la sous-unité ribosomale 50S (Murray *et al.*, 1999 ; Pechère, 2001). Trois mécanismes de résistance à cet antibiotique sont observés à savoir la modification de la cible (gène *erm* : erythromycin methylase gene), l'efflux actif (gènes *mef* : macrolide efflux pomp) et l'inactivation de l'antibiotique (avec des éléments conjugatifs) (Pechère, 2001).

#### II.5.2. Résistance des *Bacillus* à autres agents antibactériens

Plusieurs agents antibactériens sont utilisés pour lutter contre la contamination de l'environnement et des surfaces, mais malheureusement les spores bactériennes du genre *Bacillus* sont invariablement les plus résistantes de tous les types d'antiseptiques et de désinfectants (Russell, 1997). Ceci est souvent associé à l'incapacité d'un agent pour pénétrer la ou les couches externes de spores et atteindre une cible sensible dans la spore (Leggett *et al.*, 2012). La résistance de *Bacillus* aux antiseptiques et aux désinfectants développés pendant la sporulation peut être précoce, intermédiaire ou (très) tardive événement (Russell *et al.*, 1991).

Les *Bacillus* peuvent aussi résister à plusieurs ions métalliques toxiques grâce à des systèmes d'absorption limitant leur absorption accidentelle et des pompes à efflux souvent régulés par des régulateurs transcriptionnels (Brown *et al.*, 200 ; Busenlehner *et al.*, 2003). Certaines études montrent que des isolats de *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis* pourraient être utilisés comme biosorbants prometteurs pour l'élimination du cuivre et les ions plomb des solutions aqueuses (Shawky *et al.*, 2016).



### III. *Pseudomonas*

#### III.1. Classification

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (Braun et al., 2001). La classification phylogénétique de ce genre est la suivante (Delarras, 2014):

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

#### III.2. Caractères généraux

Les *Pseudomonas* sont des bactéries à Gram négatif qui forment des bâtonnets de 1 à 3 µm de long sur 0,5 à 1,0 µm de diamètre, non sporulés, généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires, aérobies à métabolisme strictement respiratoire et chimio-organotrophes (Eyquem et al., 2000 ; Palleroni, 2008).

La culture de ces bactéries est facile sur des milieux minéraux synthétiques avec une source simple de carbone (acétate, pyruvate) et sur des milieux sélectifs à base de cétrimide (Avril et al., 2000). Elle peut croître entre 5 et 42°C avec un optimum de 30°C. Par contre, elle supporte des moindres variations de pH (6,5 à 7,5) avec un optimum de 7,2. Certaines espèces produisent des pigments caractéristiques (la pyoverdine, la pyocyanine) (Delarras, 2014).

*Pseudomonas* peut utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons en croissance anaérobie, fermentant le glucose mais pas le lactose, oxydase positive, catalase négative, citrate de simmons positive, et hydrolysant la gélatine (gélatinase très active) (Walsh et al., 2001).

### III.3. Pouvoir pathogène

L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est imposée comme le pathogène hospitalier le plus important des *Pseudomonas* du fait du nombre et de la gravité des infections causées (Cholley, 2010). Elle est principalement responsable d'infections pulmonaires, urinaires, ostéo-articulaires, oculaires, ORL, méningées, cutanées, mais aussi de bactériémies, entérites et endocardites (Talon et al., 1995 ; Speijer et al., 1999).

*Pseudomonas* possède de nombreux facteurs de virulence (Filloux, 2003 ; Prescott, 2009):

- Les flagelles et les pilis : Elles sont le moteur principal de déplacement et d'adhésion ;
- Les lipopolysaccharide (LPS) : Ils sont également impliqués dans l'attachement des bactéries à des surfaces diverses selon leur taille et leur caractère plus ou moins hydrophobe ;
- Les exoenzymes : sont au nombre de quatre chez les *Pseudomonas*, l'Exo S et T qui provoquent l'inhibition des processus cellulaires comme la mobilité ou la phagocytose, l'Exo U qui dégrade les composants de la membrane cellulaire et les membranes des compartiments internes et l'Exo Y qui conduit à la formation d'espaces entre les cellules augmentant la perméabilité et fragilisant les tissus ;
- Les exotoxines et les hémolysines (phospholipase C) : l'activité d'exotoxine A dans la cellule cible est l'ADP ribosylation du facteur d'élongation, conduisant au blocage de la synthèse des protéines et à la mort cellulaire (Perdu, 2013). Les phospholipase C dégradent les phospholipides présents notamment dans le surfactant pulmonaire et les membranes des cellules eucaryotes. Elle participe ainsi aux dommages tissulaires et facilite l'invasion bactérienne (Boles et al., 2005).

### III.4. Présence de *Pseudomonas* dans le milieu hospitalier

Les bactéries du genre *Pseudomonas* occupent la plupart des environnements naturels. Elles sont isolées de l'eau, du sol, des poussières en suspension dans l'air et des végétaux. En pathologie infectieuse, *P. aeruginosa* est l'espèce pathogène opportuniste

la plus fréquemment isolée. Elle peut être rencontrée au niveau du tube digestif, de la gorge, du nez ou de la peau (Avril *et al.*, 2000 ; Eyquem *et al.*, 2000 ; Freney *et al.*, 2007).

En raison de sa haute résistance aux antibiotiques et aux désinfectants, cette bactérie est fréquemment présente dans différents environnements hospitaliers, notamment les surfaces humides comme l'eau du robinet, l'évier, l'équipement respiratoire, la bronchoscope et certaines solutions antiseptiques. De plus, les travailleurs de la santé sont un réservoir possible contribué aux flambées nosocomiales (Deplano *et al.*, 2005). Peu d'études ont documenté leur présence dans l'air intérieur des établissements de santé (Ekhaise *et al.*, 2008).

### III.5. Résistance de *Pseudomonas* aux agents antibactériens

#### III.5.1. Résistance de *Pseudomonas* aux antibiotiques

L'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique. En 2017, l'OMS a classé *Pseudomonas aeruginosa* dans le groupe des bactéries pathogènes les plus problématiques du point de vue de l'antibiorésistance (WHO, 2017).

*P. aeruginosa* est caractérisé par une résistance naturelle à de nombreuses familles d'antibiotiques et par son aptitude à l'acquisition de nouvelles résistances vis-à-vis de composés habituellement actifs. Les principales familles d'antibiotiques présentant un intérêt thérapeutique sont les  $\beta$ -lactamines, les aminosides et les fluoroquinolones (Bert *et al.*, 2000).

##### III.5.1.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines incluant les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes constituent la famille d'antibiotiques la plus fréquemment utilisée dans le traitement des infections à bactéries Gram négatif, notamment *P. aeruginosa* (Chen *et al.*, 1995 ; Rio *et al.*, 2002).

Les mécanismes de résistances à cette famille d'antibiotique observés chez les *Pseudomonas* sont les suivants :

- La production d'une bêta-lactamase chromosomique inductible de classe C qui hydrolyse préférentiellement les céphalosporines de première génération ([Sougakoff et al., 2003](#)). Des mutations dans le système de régulation de la production de cette  $\beta$ -lactamase entraînent une production stable à haute niveau d'Amp C qui affecte l'activité de l'ensemble des  $\beta$ -lactamines à l'exception de celles des carbapénèmes ([Poirel, 2006](#)).
- La modification de la protéine de membrane externe *OprD* reste le mécanisme le plus fréquent de la résistance aux carbapénèmes en particulier à l'imipénème ([Barbier et al., 2010](#)).
- Les bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) dérivées d'oxacillinase de classe D (OXA-2, OXA-10, OXA-18) hydrolysent la plupart des  $\beta$ -lactamines y compris les céphalosporines, l'imipénème et le méropénème ([Pechère et al., 2008](#)). L'OXA-18 est la seule  $\beta$ -lactamase de classe D inhibée par l'acide clavulanique identifiée chez *P. aeruginosa* ([Naas et al., 1999](#)).
- Les résistances acquises aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G), soit par hyperproduction de céphalosporinase, soit par BLSE ([Emile, 2008](#)).
- Le système d'efflux membranaire MexAB-OprM, capable d'exporter les antibiotiques en dehors de la cellule. Cette pompe à efflux est composée de trois protéines, *MexA*, *MexB* et *OprM*, incorporées dans les membranes internes et externes de la paroi bactérienne ([Masuda et al., 2000](#)).

### III.5.1.2. Résistance aux aminosides

- La résistance aux aminosides est liée le plus souvent à l'acquisition d'enzymes inactivatrices qui limitent l'interaction avec les ribosomes : les aminosides phosphotransférases (APH) qui phosphorylent des groupements hydroxyles, les aminosides nucléotidyltransférases ou O-adénylyl (ANT ou AAD) qui adénylent des groupements hydroxyles et les aminosides acétyltransférases (AAC) qui catalysent l'acétylation des groupements aminés ([Bonomo et al., 2006](#) ; [Jehl et al., 2012](#)).

- Considérant que, la pompe d'efflux (MexXY- oprM) est décrite comme la principale manifestation de la résistance aux aminosides, la modification de la cible (ARNr 16S) a également représenté plusieurs cas de résistance aux aminosides (Sohidul, 2008).

### III.5.1.3. Résistance aux fluoroquinolones

La résistance de haut niveau est principalement liée à des mutations au niveau de *gyrA* et *gyrB* (sous unités A et B de l'ADN gyrase) ou de la sous unité *parC* de la topoisomérase entraînant une baisse d'affinité pour l'antibiotique et/ou de ceux régulant l'expression des systèmes d'efflux (Meradji, 2017).

### III.5.1.4. Résistance à autres antibiotiques

Les autres mécanismes de résistances décrits chez *Pseudomonas* sont (Moskowitz et al., 2004 ; Murakami et al., 2006 ; Mesaros et al., 2007 ; Muller et al., 2011 ; Buyck et al., 2012):

- **Résistance aux macrolides** : La résistance intrinsèque de *P. aeruginosa* aux macrolides était en partie attribuable à expression constitutive des pompes à efflux (MexAB – OprM et MexXY – OprM) Ainsi, les antibiotiques sont piégés par MexB, transférés dans la cavité OprMet finalement rejetés dans le milieu extérieur à l'aide de MexA) ;
- **Résistance aux phénicoles** : Il s'agit d'un chloramphénicol acétyltransférase (CAT) capable d'acétyler le groupement hydroxyle de la molécule ;
- **Résistance à la colistine** : C'est une imperméabilité membranaire qui est assurée par une modification déterminée de la composante lipidique A du LPS ;
- **Résistance aux tétracyclines** : Dépend à un system d'énergie qui expulsant les tétracyclines en dehors de la bactérie et fournir une protection du ribosome par une protéine soluble ;
- **Résistance à la rifampicine** : S'explique par sa ribosylation c'est-à-dire par la fixation d'un sucre sous l'influence d'une ADP-ribosyl transférase produite par *P. aeruginosa* ;
- **Résistance aux sulfamides** : Elle est d'origine chromosomique, due à une diminution de perméabilité, une hyperproduction d'acide para-aminobenzoïque ou une hyperproduction de la dihydroptérate synthétase.

### III.5.2. Résistance de *Pseudomonas* à autres agents antibactériens

Les antiseptiques et les désinfectants sont largement utilisés dans les hôpitaux et d'autres établissements de soins de santé pour lutter contre la colonisation des microorganismes (Rutala, 1995 ; Larson, 1996). L'utilisation généralisée de ces agents antibactériens a suscité des spéculations sur le développement de la résistance bactérienne, en particulier *P. aeruginosa*. La résistance de cette espèce est liée à la structure de la membrane externe et au LPS, qui font obstacle au passage des molécules biocides (McDonnell et al., 1999 ; Mérens et al., 2013). Ainsi, il apparaît que le développement de la résistance est associé à des changements dans l'enveloppe cellulaire, limitant ainsi l'absorption d'antiseptiques et de désinfectants (McDonnell et al., 1999). Les antiseptiques et les désinfectants les plus actifs sur *P. aeruginosa* sont principalement les dérivés chlorés, les dérivés iodés, les ammoniums quaternaires et les dérivés mercuriels ou argentiques (McDonnell et al., 1999).

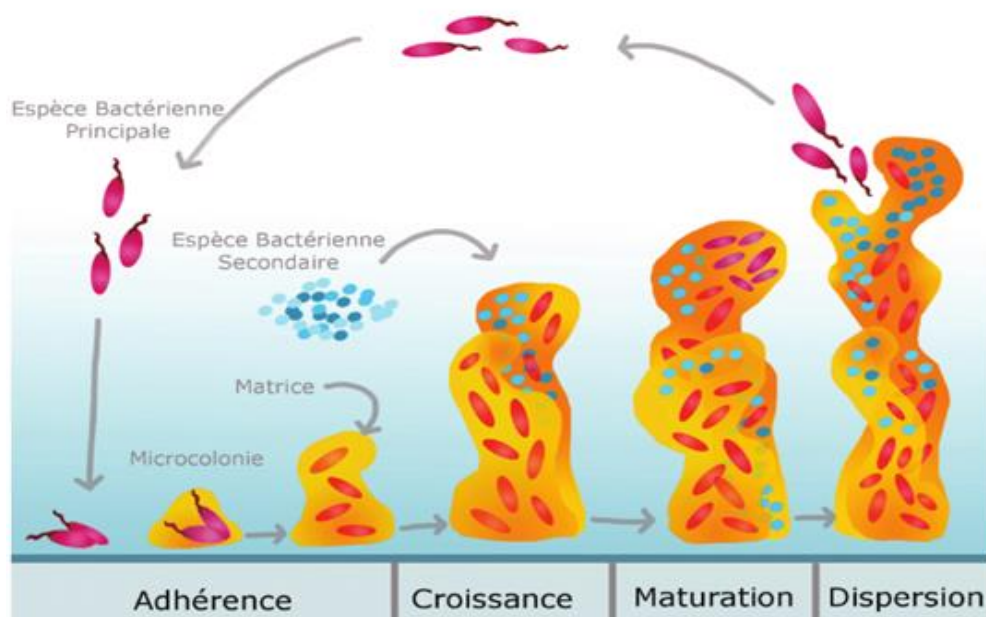
*P. aeruginosa* a été fréquemment isolées d'environnements contaminés en métaux (Hassan et al., 1999) et il a été démontré que cette espèce a plusieurs mécanismes de résistance, comme l'opéron *mer* qui réduit le mercure ( $Hg^{2+}$ ) toxique en Hg volatil qui diffuse ensuite hors de la cellule (Outten et al., 2000). Cependant, chez ces bactéries, les systèmes d'efflux sont un mécanisme de résistance plus courant pour traiter les métaux lourds. Un tel système est le système *cop* de *Pseudomonas syringae* qui contient les gènes structurels *copABCD*. Les gènes *copB* et *copD* sont impliqués dans le transport du cuivre à travers la membrane, tandis que les produits des gènes *copA* et *copC* sont des protéines de la membrane externe qui se lient au  $Cu^{2+}$  dans le périplasme, protégeant la cellule du cuivre (Cooksey, 1994 ; Silver, 1996).

## IV. Biofilm et environnement hospitalier

### IV.1. Mécanisme de formation des biofilms

Le biofilm est généralement défini comme des communautés de cellules microbiennes associées à une surface enfermées dans une matrice extracellulaire qui présente une structure caractéristique et qui est responsable de la résistance accrue aux agents antimicrobiens et aux stress environnementaux (Aaron *et al.*, 2002). Ainsi, le biofilm présente souvent une architecture complexe, très variable d'un biofilm à l'autre selon les microorganismes qui le composent et les conditions environnementales (Sutherland, 2001).

Les mécanismes employés par les différentes espèces bactériennes pour la formation des biofilms sont universels telles que l'établissement d'interactions cellules-cellules, la production d'une matrice extracellulaire entourant les cellules, une phase de maturation du biofilm avant sa dispersion et le retour à l'état planctonique (Fig. 1).



**Figure 1** : Étapes de la formation d'un biofilm (Yannick *et al.*, 2014).

#### IV.1.1 Conditionnement de la surface et adhésion

Les surfaces constituent généralement le siège d'une adsorption spontanée de composés du milieu (molécules organiques et ions) ce qui conduit au conditionnement d'un micro-environnement favorable à l'adhésion stable des bactéries (La Barre *et al.*, 2007).

Deux phases d'adhésion correspondent à une fixation active et spécifique des bactéries sur une surface (Van, 2005) :

- Une adhésion réversible qui est le résultat de l'interaction entre les bactéries et un substrat solide. Les cellules s'adsorbent sur une surface pendant un certain temps, mais peuvent se détacher (Muller *et al.*, 2014) ;
- 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 (Bellifa, 2014). Une fois attachés, les microorganismes se divisent et forment des micro-colonies (Philips *et al.*, 2011).

#### IV.1.2. Maturation de biofilm

Le biofilm a une croissance exponentielle se traduisant par une augmentation importante de son épaisseur jusqu'à la formation d'un film hétérogène tridimensionnel (Costerton *et al.*, 1995 ; Davey *et al.*, 2000 ; Sauer *et al.*, 2002). Dans cette structure se forment des canaux permettant la circulation de nutriments, d'oxygène et l'évacuation des produits issus du métabolisme bactérien. L'épaisseur du biofilm se stabilise lorsque ses phénomènes d'arrachement compensent sa croissance (Costerton *et al.*, 1999).

#### IV.1.3. Dispersion du biofilm

L'étape de dispersion du biofilm permettant aux bactéries de coloniser de nouvelles surfaces. Celle-ci intervient lorsque les conditions environnementales (pH, niveau de nutriments, accumulation de déchets métaboliques toxiques...) deviennent défavorables (Sauer *et al.*, 2002 ; Sauer *et al.*, 2004).



## IV.2. Diversité bactérienne 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. Les bactéries formatrices de biofilm proviennent généralement de la flore commensale 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 :

- ***Pseudomonas aeruginosa*** : Cette bactérie qui est à l'origine des infections chroniques se caractérise par la formation de biofilm grâce à sa grande capacité à coloniser les surfaces (Denis *et al.*, 2007). En prenant le mode de croissance du biofilm, *P. aeruginosa* devient un agent pathogène hautement résistant, avec des conséquences importantes pour l'hôte (Rogan *et al.*, 2004).
- **Staphylocoques** : Responsables de la grande majorité des infections causées par des biofilms. *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus aureus* sont les agents les plus fréquemment responsables d'infections sur les dispositifs médicaux, qui impliquent la formation de biofilm (Fey, 2010).
- **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. Les flagelles et les fimbriae (ou pili), plutôt impliqués dans les étapes d'adhérence aux surfaces et de développement précoce du biofilm, ainsi que l'antigène 43, le PGA (Poly- $\beta$ -1,6-N-acétylglucosamine), la cellulose ou l'acide colanique qui ont un rôle dans la maturation du biofilm (Van Houdt *et al.*, 2005).
- ***Bacillus*** : Toutes les espèces de *Bacillus* forment des biofilms et l'un de ces structures les mieux caractérisés est celui de *B. subtilis* (Ren *et al.*, 2004) ; Cet organisme environnemental commun a été caractérisé phénotypiquement et génétiquement dans le mode de croissance du biofilm (Morikawa, 2006). De même, *B. anthracis*, la responsable de l'anthrax, et grâce à son pouvoir pathogène forme facilement des biofilms qui sont plus résistants aux antibiotiques que les cellules planctoniques (Lee *et al.*, 2007).

- **Legionella** : *Legionella pneumophila*, l'agent de légionellose, est une bactérie formatrice de biofilms par excellence surtout sur les parois internes des canalisations et dans les systèmes de climatisation. Elle prolifère fréquemment dans les établissements de santé et représente un risque sanitaire, en particulier pour les personnes les plus fragiles (Campèse et al., 2006).
- **Acinetobacter** : Elle est apte à former des biofilms, son phénotype de résistance est directement associé à celui-ci. L'espèce *A. baumannii* ayant la capacité à la colonisation sur les surfaces abiotiques, les surfaces des équipements hospitaliers et les dispositifs médicaux (Djeribi et al., 2012). En effet, il devient de plus en plus évident que la capacité de formation de biofilm est l'un des principaux facteurs de virulence commun à un grand nombre d'isolats cliniques d'*A.baumannii* (King et al., 2009 ; Longo et al., 2014).

#### IV.3. Stratégies antibiofilm

La capacité de formation des biofilms par les microorganismes est considérée comme un facteur de virulence important ce qui conduit à des infections chroniques et récurrentes persistantes (Grant et al., 2013). Afin de lutter contre la formation des biofilms (et/ou l'élimination des biofilms formés), plusieurs stratégies sont utilisées :

- Le meilleur moyen ancien utilisé pour empêcher la formation de biofilms en milieu hospitalier repose sur les conditions d'hygiène strictes, afin d'éviter au maximum toute contamination microbienne (Francolini et al., 2010). Le nettoyage mécanique et le nettoyage qui précède la désinfection restent encore parmi les moyens les plus efficaces (Stickler, 2002 ; Wanner, 2006). Le but de ces derniers est de détruire les bactéries du biofilm, qui n'auraient pas été éliminées préalablement par le nettoyage (Wanner, 2006). En revanche, la plupart des antiseptiques et désinfectants ont du mal à pénétrer au sein des biofilms, et les bactéries des biofilms sont résistantes à leur action ce qui diminue l'efficacité de cette méthode (Stickler, 2002) ;
- Ces dernières années et vu la capacité des micro-organismes d'adhérer aux surfaces en acier inoxydable environ 28 jours (Casey et al., 2010), des options de lutte alternatives sont utilisés telles que les composés naturels (N-heptylsulfanylacétyl-l-homosérinelactone extrait d'ail, fraction d'acétate d'éthyle de *Coccolustrilobus*,

polyphénols de la canneberge) (Bodet *et al.*, 2008), les nouveaux produits chimiques (Tween 20 et Triton X-100) (Chen *et al.*, 2000) et les métaux inorganiques comme le cuivre et les alliages de cuivre ( le laiton, le cupronickel, le cuivre-nickel-zinc et le bronze) (Warnes *et al.*, 2015). Les pansements contenant du cuivre et les peintures incorporées au cuivre ont été utilisés pour surmonter la montée des micro-organismes (Beeton *et al.*, 2014). Les surfaces abiotiques imprégnées de cuivre telles que les cathéters urinaires peuvent empêcher la colonisation d'agents pathogènes tels que *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* O157 : H7, *Enterobacter aerogenes* champignons et virus ;

- Actuellement, des stratégies basées sur l'utilisation des enzymes bactériennes comme la dispersine B (capable de dégrader le polymère de N-acétyl-glucosamine de la matrice du biofilm) et des bactériophages ont également montré une capacité de lutter contre la formation des biofilms (Kaplan *et al.*, 2004 ; Donlan, 2009).

**Chapitre II :**  
**Étude**  
**expérimentale**

## I. Cadre d'étude

Cette étude a porté sur huit souches d'origine hospitalière à savoir 04 souches appartenant au genre *Bacillus* et 04 souches de *Pseudomonas*.

Le choix de ces deux espèces bactériennes est basé sur :

- ✓ Leur caractère ubiquitaire dans l'environnement ;
- ✓ Leur sensibilité différente vis-à-vis aux antibiotiques ;
- ✓ 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** : Contient 220 lits et dispose de trois principaux services : Phtisiologie, Maladies infectieuses et Hémodialyse ; en plus de l'hôpital du jour qui comprend le service de Diabétologie et Hématologie ;
- ✓ **Hôpital El Hakim Okbi** : Il comprend 311 lits distribués sur huit services : Les urgences, Bloc opératoire et Réanimation, Pédiatrie, Gynécologie et Néonatalogie, Médecine générale, Chirurgie générale, Traumatologie et Oto-Rhino-Laryngologie ;
- ✓ **Complexe Mère-enfant** : Établissement hospitalier spécialisé représente l'unique pôle d'accueil permanent des urgences pédiatriques.

Les dates et les sites de prélèvements réalisés au cours de cette étude sont détaillés dans le tableau 01. 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 01). Ces points de prélèvement sont classés parmi les zones à risque pour les patients et les visiteurs ([IHGF, 2017](#)). Les prélèvements ont été effectués le matin après le nettoyage et/ ou la désinfection quotidienne.

**Tableau 01** : 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-P2-P3	Drain d'évier	Inox	18.02.2020
	P4	Poignée de la porte	Inox	18.02.2020
	P5	Robinet	Inox	18.02.2020
Hôpital El Hakim Okbi	P6- P7	Lavabo	Céramique	18.02.2020
	P8	Cuvette de toilette	Céramique	18.02.2020
	P9- P10	Mur	Céramique	18.02.2020
Complexe Mère-enfant	P11- P12	Interrupteur (WC)	Plastique	18.02.2020
	P13-P14	Drain d'évier	Inox	18.02.2020
	P15	Robinet	Inox	18.02.2020

### II.2. Technique de prélèvement

La technique de prélèvement utilisée est la méthode d'écouvillonnage qui consiste à ([Zenouaki et al., 2015](#)):

- Frotter sur la surface sèche à analyser, l'extrémité cotonnée de l'écouvillon préalablement humidifiée à l'aide d'eau physiologique ;
- Tromper 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

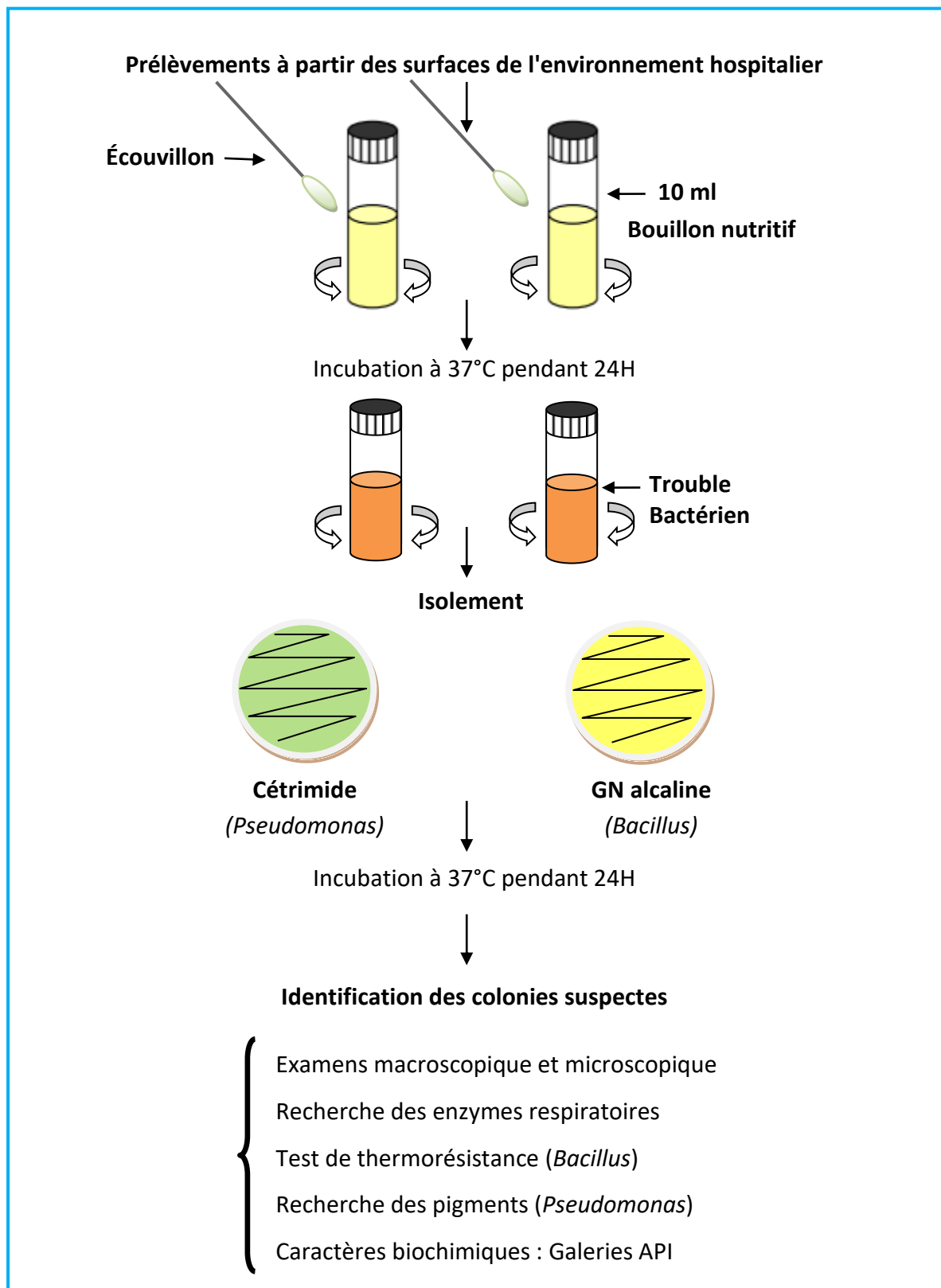
Le schéma 01 illustre l'étape d'isolement et d'identification des deux genres bactériens à étudier.

##### III.1.1. Isolement des souches bactériennes

À partir des milieux d'enrichissements présentant une croissance bactérienne, nous avonsensemencé 02 milieux de culture ([Larpent, 1997](#) ; [Guiraud, 2003](#)):

- La gélose au cétrimide qui est un milieu sélectif permettant l'isolement des *Pseudomonas* et notamment de *P. aeruginosa*. Sur ce milieu de très nombreuses bactéries sont inhibées de par la présence de l'antiseptique cétrimide (bromure de N-cétyl-N-tri méthylammonium) ainsi que par la présence de l'antibiotique acide nalidixique (inhibiteur de nombreuses bactéries à Gram négatif) ;
- La Gélose nutritive (GN) à pH alcalin qui est utilisé pour l'isolement des bactéries alcalophiles comme les *Bacillus*.

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



**Schéma 1** : Isolement et identification des souches de *Bacillus* et *Pseudomonas*.



### 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).

Sur la gélose au cétrimide les colonies suspectes de *Pseudomonas* sont généralement vertes pâles présentant une fluorescence. Sur la GN à pH alcalin les colonies des *Bacillus* sont blanchâtres et à contours irréguliers (Larpent, 1997).

- **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 lavé rapidement par l'eau courante ;
- Mordançage : 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 feuilles de papier buvard propre.
- Examiner le frottis, à immersion à l'objectif  $\times 100$ .

### 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

Deux enzymes respiratoires sont recherchées : l'oxydase et la catalase (Tableau 02).

**Tableau 02** : Recherche des enzymes respiratoires.

Enzyme	Propriété	Technique	Lecture	Référence
Catalase	Dégrade Le peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur ;</li> <li>• Prélever un fragment de la colonie à Etudier ;</li> <li>• Dissocier la colonie dans la goutte.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Catalase positive</b> : Apparition des bulles de gaz, la bactérie possède la catalase.</li> <li>• <b>Catalase négative</b> : Absence des bulles de gaz, la bactérie ne possède pas la catalase.</li> </ul>	(Guiraud, 2003)
Oxydase	Catalyse les réactions d'oxydo- réduction	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Déposer le disque d'oxydase sur une lame propre, l'humidifier avec deux gouttes d'eau distillée stérile ;</li> <li>• Ecraser la colonie testée sur le disque.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Oxydase positif</b> : Colonie prend une couleur violette.</li> <li>• <b>Oxydase négatif</b> : La colonie reste incolore, donc absence d'enzyme recherché.</li> </ul>	(Prescott <i>et al.</i> , 1999)

### III.1.2.3. Test de thermorésistance

Le test de thermorésistance permet la mise en évidence de la sporulation, il est réalisé pour les *Bacillus* comme suit (Guiraud, 2003):

- Réaliser une culture âgée (3 à 10 jours) sur bouillon nutritif additionné de 0,004% de sulfate de manganèse ;
- Chauffer la culture à 80°C pendant 10 minutes ;
- Repiquer la culture obtenue sur un autre bouillon nutritif ;

Incuber à 30°C pendant 2 à 5 jours ; le développement bactérien est une présomption de la sporulation qui reste à confirmer par un examen microscopique.

### III.1.2.4. Recherche des pigments

À partir des cultures pures de *Pseudomonas*, nous avons recherché deux pigments : la pyocyanine et la pyoverdine

- Inoculer les deux milieux King A et King B par une strie médiane ;
- Incuber à 37°C pendant 1 à 4 jours ;

Le milieu King A est destiné à favoriser sélectivement la synthèse de la pyocyanine (pigment élaboré spécifiquement par *Pseudomonas aeruginosa* (bacille pyocyanique). Le milieu King B est destiné à favoriser la synthèse du pigment jaune-vert fluorescent (pyoverdine) par le bacille pyocyanique et divers autres *Pseudomonas*. Exemple : *Pseudomonas fluorescens*.

#### Lecture

- Couleur bleue sur le milieu King A : présence de pyocyanine ;
- Couleur jaune-vert fluorescent sur le milieu King B sous UV : présence de pyoverdine.

**Remarque :** En cas de doute pour la production de la pyocyanine, verser 0,5 ml de chloroforme à la surface de la culture sur le King A et laisser les tubes inclinés pendant 10 à 15 minutes. La pyocyanine est soluble dans le chloroforme coloré celui-ci en bleu (Guiraud, 2003).

#### III.1.2.5. 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 pour l'identification des *Bacillus*, et l'API 20NE pour les *Pseudomonas*.
- La préparation et l'inoculation des galeries citées-ci-dessus sont résumées dans le tableau 03.

#### III.1.3. Conservation des souches bactériennes

Les 8 souches bactériennes ont été purifiées par des repiquages successifs et conservées jusqu'à l'étude de la résistance aux antibiotiques. La conservation des souches a été réalisée à la température ambiante, par ensemencement par stries sur la gélose nutritive inclinées en tubes à essai (Guiraud, 2003).

**Tableau 03** : 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
<b>API 20 E</b>	-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 distillée 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"> <li>- Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne ;</li> <li>- Remplir uniquement les tubes des autres tests ;</li> <li>- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine ;</li> <li>- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lecture directe ou après addition de réactifs : se référant au tableau de lecture spécifique à chaque API* ;</li> <li>- 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.</li> </ul>	L'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification apiwebTM**. Enter manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres.
<b>API 20 NE</b>	-Comporte 20 tests -Destinée aux bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux.		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Remplir uniquement les tubes des tests NO3 à PNPG ;</li> <li>- Créer une anaérobiose (par l'huile de paraffine) dans les tests : GLU, ADH, URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine ;</li> <li>- Remplir les tubes et les cupules des tests : GLU à PAC avec la suspension bactérienne ;</li> <li>- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures.</li> </ul>		

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

### 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, 2020).

#### 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 Ferland ( $\sim 10^8$  UFC/ml).
- **Ensemencement de la gélose Mueller Hinton (MH)**
  - Couler la gélose MH en boîtes de Pétri, Laisser sécher et solidifier sur paillasse avant utilisation ;
  - Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum préparé ( $\sim 10^6$  UFC/mL pour les *Bacillus* et  $\sim 10^7$  UFC/mL pour les *Pseudomonas*) ;
  - 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 ensemencer 15 à 20 min 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 d'Institut Pasteur Production. 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 différentes souches bactériennes sont représentés dans le tableau 04.

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 04** : Critères des antibiotiques testés sur les souches bactériennes (IPP, 1981).

Genre bactérien	Antibiotique	Famille d'antibiotique	Classe	Code	Charge du disque	Diamètres critiques (mm)	
						S ≥	R <
<i>Bacillus</i>	Amoxicilline	Bêta -lactamine	Pénicilline	AMX	25 Unité	21	14
	Pénicilline G	Bêta -lactamine	Pénicilline	P	10	29	8
	Ofloxacin	Quinolone	Fluoroquinolone	OFX	5	22	16
	Chloramphénicol	Aminoglycoside	Divers	C	30	23	19
	Céfotaxime	Bêta -lactamine	Céphalosporine	CTX	5	21	15
<i>Pseudomonas</i>	Colistine	Polymyxine	Pénicilline	CT	10Unité	15	-
	Ceftazidime	Bêta -lactamine	Céphalosporine	CAZ	30	21	15
	Chloramphénicol	Aminoglycoside	Divers	C	30	23	19
	Céfazoline	Bêta -lactamine	Céphalosporine	CZ	30	18	12
	Vancomycine	Glycopeptide	Glycopeptide	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 ; Crémet *et al.*, 2013).

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.*, 2008);
- 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 min à température ambiante ;



- Remettre en solution le cristal violet qui a pénétré dans les bactéries par l'ajout de 200  $\mu$ L d'éthanol à 95 % dans chaque puits, ce qui permet d'améliorer la sensibilité de lecture avec le spectrophotomètre ;
- Après 10 min 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 08 souches rattachées aux deux genres bactériens *Bacillus* et *Pseudomonas* :

Quatre souches de *Bacillus* proviennent des prélèvements P1, P5, P8 et P14, tandis que les quatre souches de *Pseudomonas* sont isolées à partir des prélèvements P3, P7, P10 et P15.

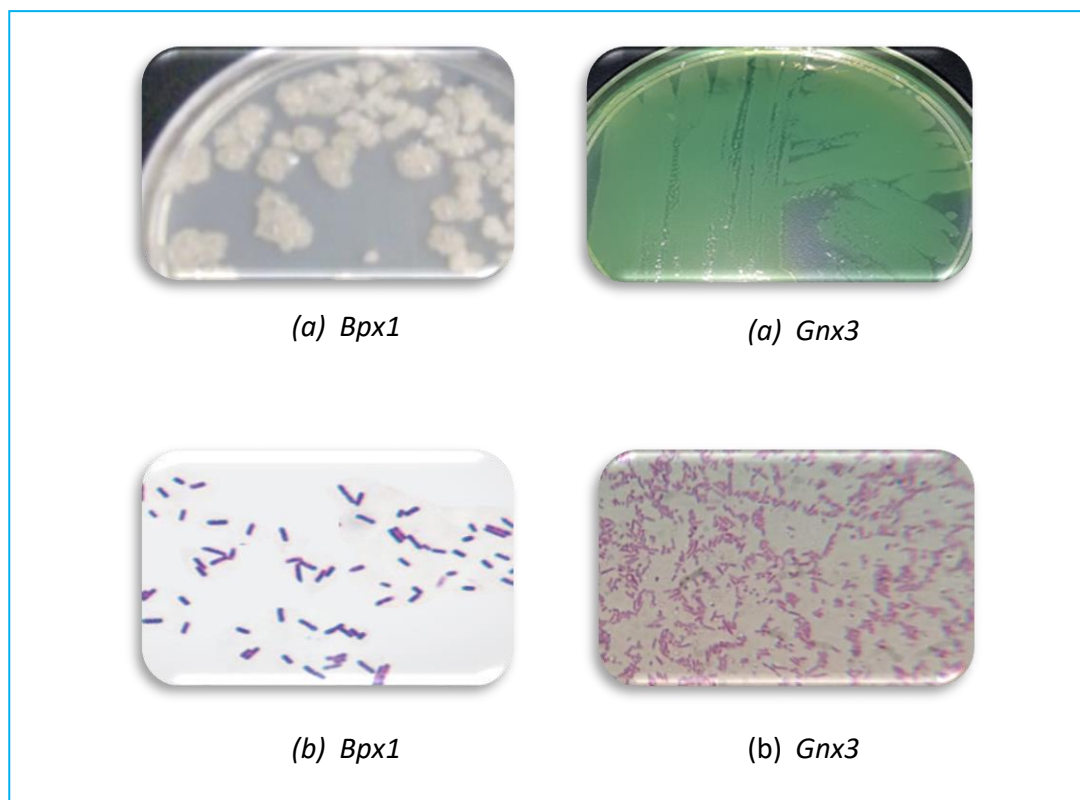
### I.1. Identification morphologique

Les aspects macroscopiques et microscopiques des colonies suspectes des *Bacillus* et *Pseudomonas* sont représentés dans le tableau 05.

**Tableau 05 :** Aspects macroscopiques et microscopiques des *Bacillus* et *Pseudomonas* isolés à partir de l'environnement hospitalier de certains établissements publics de la région de Guelma.

Site de prélèvement	Genre bactérien	Code de la souche	Milieu de culture	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
P1	<i>Bacillus</i>	Bpx1	GN alcalin	Grosses colonies, blanchâtres, mates, à contour irrégulier	Bacilles à Gram positif avec centre transparent
P5		Bpx2			
P8		Bpx3			
P14		Bpx4			
P3	<i>Pseudomonas</i>	Gnx1	Cétrimide	Colonies moyennes crémeuses, bleues-vertes, aplaties, à contours réguliers.	Bacilles courts isolés à Gram négatif.
P7		Gnx2			
P10		Gnx3			
P15		Gnx4			

Les aspects macroscopiques et microscopiques des souches Bpx1 et Gnx3 sont illustrés dans la figure 02.



**Figure 02 :** (a) Aspects macroscopiques et (b) microscopiques de certains isolats bactériens.

## I.2. Enzymes respiratoires

Les résultats obtenus de la recherche des enzymes respiratoires sont représentés dans le tableau 06.

**Tableau 06 :** Recherche des enzymes respiratoires des isolats bactériens.

Code de la souche bactérienne	Catalase	Oxydase
Bpx1	+	+
Bpx2	+	-
Bpx3	+	+
Bpx4	+	-
Gnx1	+	+
Gnx2	+	+
Gnx3	+	+
Gnx4	+	+

(+) : test positif (-) : test négatif

La figure 03 illustre l'aspect des tests positifs et négatifs des enzymes respiratoires recherchées.

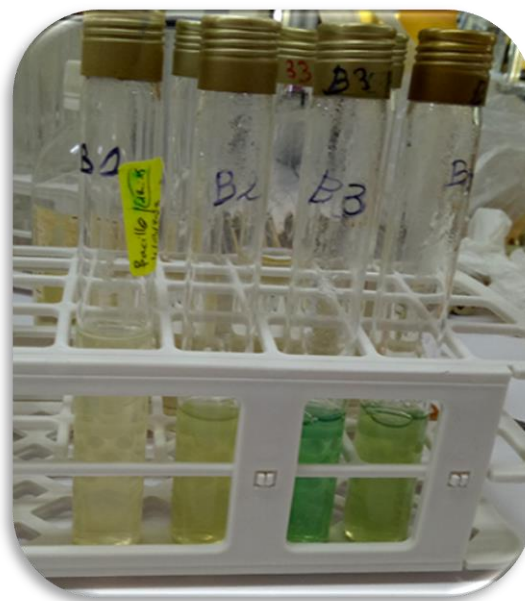


**Figure 03** : Présence et/ou absence des enzymes respiratoires chez certains isolats bactériens.

### I.3. Test de thermorésistance

Après sélection thermique, la présomption de la sporulation des isolats Bpx1, Bpx2, Bpx3 et Bpx4, a été mise en évidence par l'apparition de trouble et de voile blanchâtre dans le bouillon nutritif après 24 H d'incubation (Fig. 04). Ce test a été confirmé par une observation microscopique qui a confirmé la présence de bacilles à Gram positif sporulés.

Il est très important aussi de signaler que les quatre souches sont productrices d'un pigment vert (Fig. 04)



**Figure 04** : Résultat du test de présomption de la sporulation des souches de *Bacillus* avec production de pigment vert.

### I.4. Recherche des pigments de *Pseudomonas*

Toutes les souches de *Pseudomonas* isolées dans la présente étude sont productrices de la pyocyanine et de la pyoverdine. La présence de ces pigments diffusibles a été confirmée par l'apparition de la couleur bleue et verte sur toute la pente du milieu King A et King B respectivement.

### I.5. Biotypage par microgalerie API

Les résultats des caractères biochimiques des isolats obtenus sont représentés dans le tableau 07.

**Tableau 07** : Profils biochimiques des isolats bactériens sur les galeries miniaturisées API.









API système	Souche	Profil biochimique	Code de l'API	Degré de parenté (%)
API 20 E	Bpx1		7736577	99,2
	Bpx2		7736773	100
	Bpx3		7736577	99,2
	Bpx4		7636773	100

Tableau 07 (Suite) :

API 20 NE	Gnx1		5554575	96,8
	Gnx2		5554575	96,8
	Gnx3		1154575	99,8
	Gnx4		1150475	98,7

❖ D'après les résultats d'identification, les espèces isolées à partir des milieux hospitaliers étudiés sont les suivantes (Tableau 08) :

**Tableau 08 :** *Bacillus* et *Pseudomonas* isolés à partir de l'environnement des établissements publics hospitaliers de la région de Guelma.

Prélèvement	Code de l'isolat bactérien	Espèce identifiée
P1	Bpx1	<i>Bacillus licheniformis</i>
P5	Bpx2	<i>Bacillus licheniformis</i>
P8	Bpx3	<i>Bacillus licheniformis</i>
P14	Bpx4	<i>Bacillus licheniformis</i>
P3	Gnx1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P7	Gnx2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P10	Gnx3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P15	Gnx4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

## 1.6. Discussion

La colonisation du milieu hospitalier par des bactéries pathogènes et résistantes est un problème majeur de santé publique extrêmement préoccupant, dont les conséquences se mesurent en termes de la diffusion des infections nosocomiales. En effet, il a été constaté que, dans des situations endémiques et épidémiques, il y a une contamination environnementale et un transfert des bactéries entre les patients et l'environnement (Oliveira et al., 2010).

Dans la présente étude, nous avons isolé 8 souches appartenant à deux espèces qui sont connues par leur résistance : *Bacillus licheniformis* et *Pseudomonas aeruginosa*.

En générale, nous avons trouvé que les quatre souches de *Bacillus licheniformis* sont Gram positif en forme de bâtonnet, ils possèdent une catalase avec une oxydase variable. Ces résultats sont en accord avec la littérature (Mandell et al., 2010).

L'identification biochimique a montré que l'espèce *B. licheniformis* est apparue sous trois profils différents, ce qui reflète bien la diversité au sein d'une même espèce en ce qui concerne les bactéries sporulés (Guiraud, 2003). Les résultats obtenus ont montré que les caractères biochimiques de *Bacillus* sont comparables à ceux rapportés par Francesco et al. (1995).

Tous les *Bacillus* isolés sont capables de former des spores qui sont une forme de résistance et de dormance (Leggett et al., 2012). La sporulation est un caractère distinctif de *Bacillus* et elle les rend particulièrement adaptés aux conditions hostiles. Les spores de *Bacillus* sont largement retrouvées dans l'environnement et elles sont capables de résister aux procédés de nettoyage et entraînant une recontamination rapide des surfaces (Faille et al., 2010).

Les *Bacillus* isolés ont montré la présence d'un pigment vert. Les pigments chez les *Bacillus* jouent un rôle de protection contre les dommages oxydatifs causés par le rayonnement ultraviolet (UV) par piégeage des radicaux libres (Moeller et al., 2005). Selon les travaux de Debopam et al. (2011), le pigment vert (9-méthyl-1, 4, 5,8-tetra-azaphénanthrene) mise en évidence chez les *Bacillus* a une activité antibactérienne vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus*.



L'isolement de *Bacillus licheniformis* à partir de robinet, cuvette de toilette et le drain d'évier pourrait s'expliquer par l'utilisation massive de ces sites par les patients et/ou les visiteurs qui peuvent être des porteurs de ces bactéries. 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 persistance de ce genre bactérien apte à la sporulation, rappelant que même avec des programmes de nettoyage bien établis, l'élimination totale des micro-organismes de l'environnement est difficile à réaliser (Shaheen et al., 2018). En plus, les spores de *Bacillus* ont la capacité d'adhérer fortement aux différents matériaux et surfaces à cause de leur hydrophobicité élevée (Faille et al., 2010). Selon Ronner et al. (1990), les procédés de nettoyage classique ne permettent d'éliminer que 40% des spores adhérentes à différents matériaux y compris l'acier inoxydable.

La présence de *B. licheniformis* au niveau de différents sites de sanitaires a été également décelée par Osman et al. (2017) qui ont montré la fréquence de *Bacillus licheniformis* au niveau de drain d'évier en composant des biofilms. Moore et al. (2002) suggèrent que les drains d'évier dans les hôpitaux sont considérés comme des sources possibles de maladies infectieuses et abritent généralement des micro-organismes pathogènes.

Il est important de signaler que *B. licheniformis* est de plus en plus reconnu comme un pathogène humain et provoque des infections graves, principalement chez les patients immunodéprimés (Haydushka et al., 2012) et des infections chez le nouveau-né de très faible poids à la naissance (Lépine et al., 2009). Les maladies attribuées à *B. licheniformis* comprennent la bactériémie, l'ophtalmite suite à un traumatisme et des cas d'intoxication alimentaire et un cas unique d'endocardite (Francesco et al., 1995). La possibilité que *B. licheniformis* persiste sous forme d'endospores dormantes, non affectées par les antimicrobiens dans l'intestin, pourrait représenter une voie potentielle par laquelle des spores en germination périodique pourraient provoquer une infection récurrente (Haydushka et al., 2012).

En ce qui concerne l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, morphologiquement tous les isolats sont des bâtonnets isolés à Gram négatif, ils sont positifs pour la catalase et l'oxydase.

L'identification définitive de l'espèce, *Pseudomonas aeruginosa*, comprenant l'identification de la production des pigments et les caractères biochimiques est en accord avec la littérature (Nyaledome, 2016 ; Meradji, 2017).

Nos souches de *P. aeruginosa* ont été isolées de lavabo, de drain d'évier, mur de sanitaire et de robinet, ceci pourrait s'expliquer par leur capacité à croître dans des conditions humides avec des nutriments simples et en raison de leur capacité à résister à des agents antibactériennes et désinfectants (Milind et al., 2014). Nos résultats sont similaires à ceux retrouvés par Ghane et al. (2014).

Lashéras et al. (2006) rapportent que *P. aeruginosa* a été classé comme le microorganisme le plus fréquent qui semble survivre particulièrement bien dans les milieux humides, notamment les points d'eau (lavabos et siphons) d'où l'intérêt de la désinfection régulière de ces sites.

La nature, exogène ou endogène, des sources de contamination par *P. aeruginosa*, est encore très discutée. Floret et al., (2009) ont suggéré que l'origine de *P. aeruginosa* dans l'environnement hospitalier sont majoritairement les patients porteurs sains. Cependant, des études récentes ont démontré que plusieurs agents pathogènes majeurs nosocomiaux sont éliminés par les patients et contaminent les surfaces de l'hôpital à des concentrations suffisantes pour la transmission, survivent pendant de longues périodes, persistent malgré les efforts de désinfection, et peuvent être transférés aux mains des personnel de santé (Otter et al., 2011). La transmission de *P. aeruginosa* des éviers aux mains pendant le lavage de ces derniers a été démontrée ; D'autres recherches ont également montré que lorsque l'évier était utilisé pour le lavage des mains, le contenu du drain éclaboussé à au moins 1 mètre de l'évier et pollue l'eau infecte les patients (Hota et al., 2009).

La contamination par *P. aeruginosa* peut provoquer diverses infections nosocomiales en raison de sa capacité à survivre en milieu hospitalier et à développer une résistance aux antibiotiques et aux désinfectants (Milind et al., 2014). Elle provoque des bactériémies, des infections intestinales, respiratoires et urinaires et des otites externes pouvant être mortelles chez les diabétiques. *P. aeruginosa* peut aussi engendrer des kératites ulcéreuses chez les

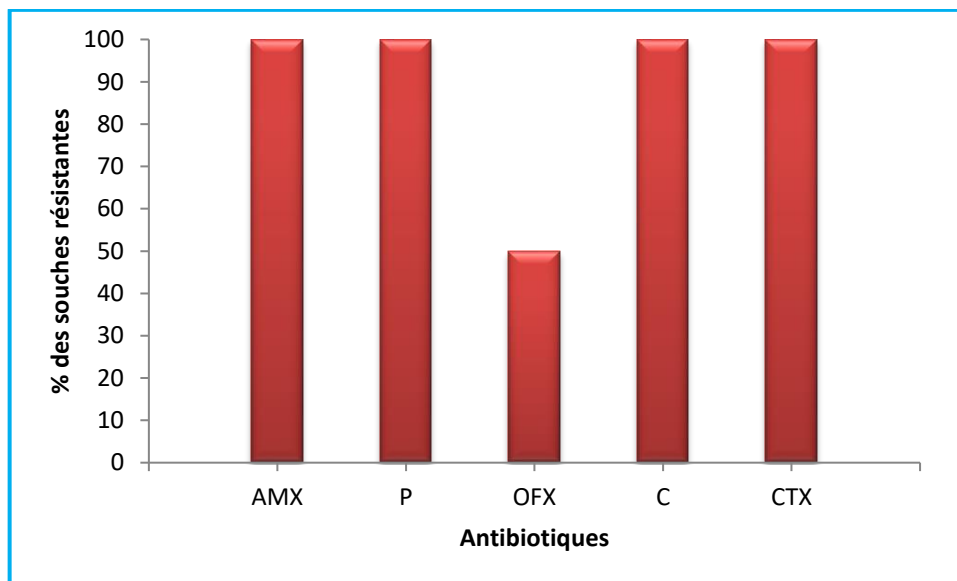
porteurs de lentilles de contact, des infections de la peau, des plaies et des infections secondaires des brûlures (Lazdunski, 2003 ; Mesaros et al., 2007).

## II. Étude de la résistance des bactéries aux antibiotiques

### II.1. *Bacillus*

Toutes les souches de *Bacillus licheniformis* sont résistantes au moins à quatre antibiotiques. Cent pour cent (100 %) des souches sont résistantes à l'amoxicilline, la pénicilline G, la céfotaxime et le chloramphénicol. Des taux significatifs de résistance sont enregistrés à l'ofloxacine (50 %) (Fig. 05).

D'après le tableau 09 : les souches de *Bacillus* résistent à 4 et/ou à 5 antibiotiques en présentant 2 profils antibiotypiques.



**Figure 05 :** Résistance aux antibiotiques des *Bacillus licheniformis*.

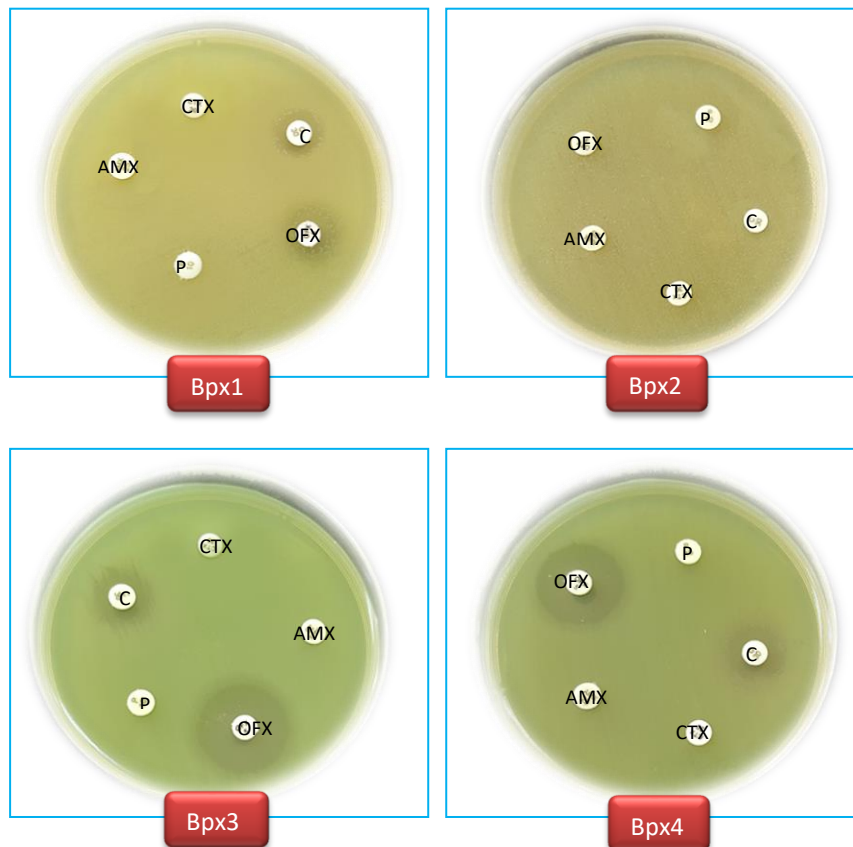
AMC : Amoxicilline ; P : Pénicilline G ; OFX : Ofloxacine ; C : Chloramphénicol ;  
CTX : Céfotaxime.

**Tableau 09** : Profils antibiotypiques associés aux souches de *Bacillus licheniformis*.

Profils de résistance	Nombre d'antibiotiques	Nombre des souches	Souches résistantes
AMX/P/C/CTX	4	2	Bpx3, Bpx4
AMX/P/OFX/C/CTX	5	2	Bpx1, Bpx2

AMX : Amoxiciline ; P : Pénicilline G ; OFX : Ofloxacine ; C : Chloramphénicol ; CTX : Céfotaxime.

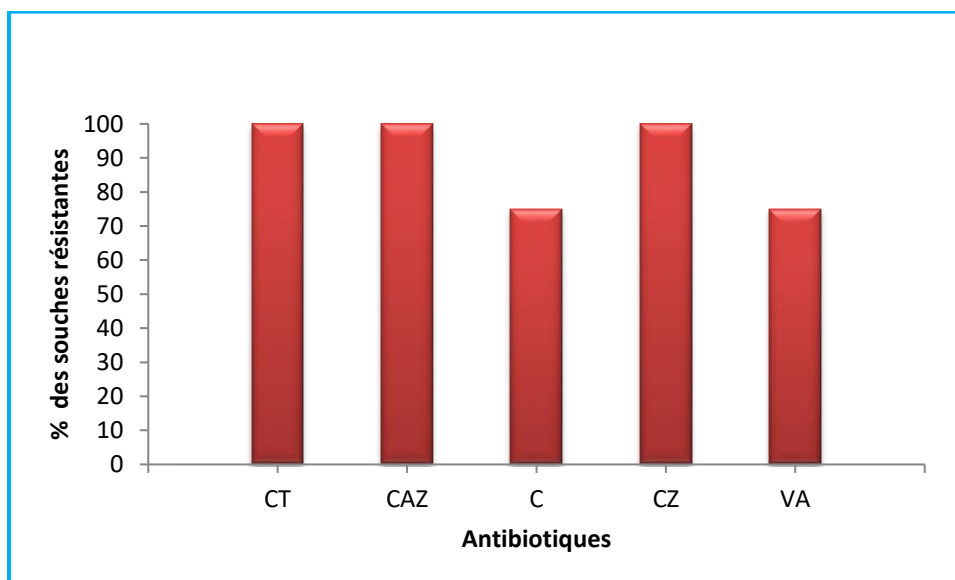
Les résultats de l'antibiogramme des isolats de *Bacillus* sont illustrés dans la figure 06.



**Figure 06** : Antibiogramme des différents isolats de *Bacillus licheniformis*.

## II.2. *Pseudomonas*

L'antibiogramme des *Pseudomonas* montre une résistance totale à la colistine, la ceftazidime et à la céfazoline (100%), suivi par une résistance à la vancomycine et au chloramphénicol (75 %) (Fig. 07)



**Figure 07 :** Résistance aux antibiotiques des *Pseudomonas aeruginosa*.  
 CT : Colistine ; CAZ : Ceftazidime ; CZ : Céfazoline ; C : Chloramphénicol ;  
 VA : Vancomycine.

Les résultats obtenus montrent que les souches de *Pseudomonas* résistent à 3 et/ou à 5 antibiotiques en présentant 2 profils antibiotypiques (Tableau 10).

**Tableau 10 :** Profils antibiotypiques associés aux souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

Profils de résistance	Nombre d'antibiotiques	Nombre des souches	Souches résistantes
CT/CAZ/CZ	3	1	Gnx4
CT/CAZ/C/CZ/VA	5	3	Gnx1, Gnx2, Gnx3

CT : Colistine ; CAZ : Ceftazidime ; CZ : Céfazoline ; C : Chloramphénicol ; VA : Vancomycine.

Les résultats de l'antibiogramme des isolats de *Pseudomonas* sont illustrés dans la figure 08.

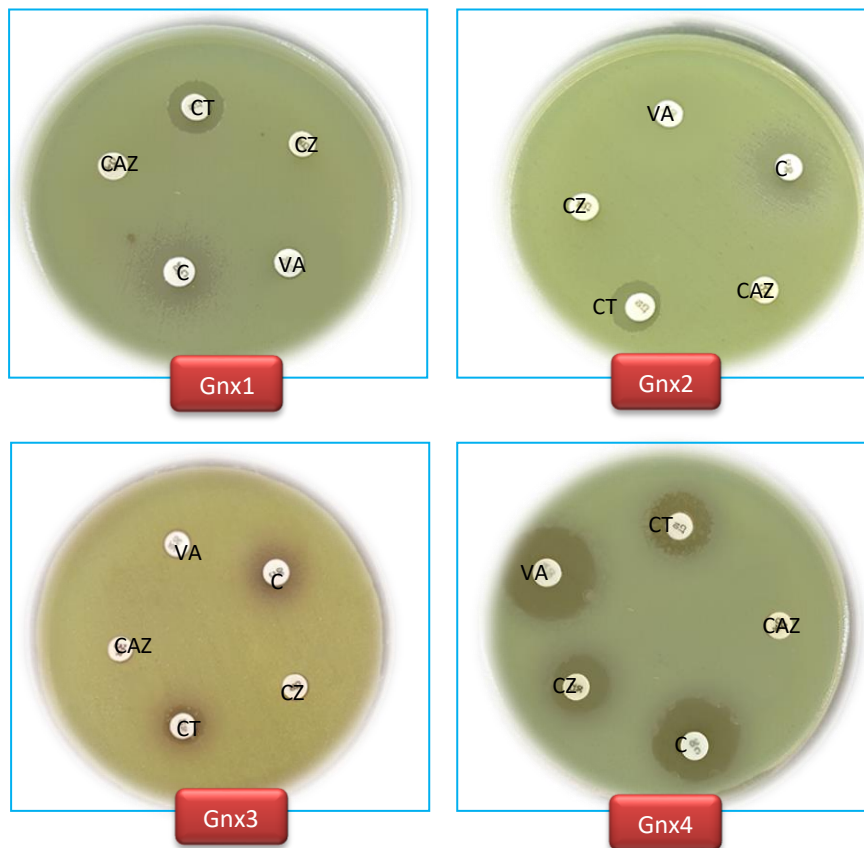


Figure 08 : Antibiogramme des différents isolats de *Pseudomonas*.

### II.3. Discussion

Les résultats de l'antibiogramme de *Bacillus licheniformis* montrent une résistance importante aux  $\beta$ -lactamines (Amoxiciline, pénicilline G et céfotaxime). Ce résultat est comparable à ceux d'[Sorokulova et al. \(2008\)](#). Généralement, les espèces de *Bacillus* sécrètent de l'enzyme  $\beta$ -lactamase qui hydrolysent les antibiotiques  $\beta$ -lactamines et provoquent le développement d'une résistance à ces antibiotiques ([Frère, 1995](#)).

La résistance à l'ofloxacine s'explique par la présence d'une protéine *qnr* se fixant sur les topoisomérases, cibles des fluoroquinolones, réduisent l'affinité de cette classe d'antibiotiques pour leurs cibles ([Robiczek et al., 2006](#) ; [Cavaco et al., 2009](#) ; [Wang et al., 2009](#)). [Ozkocaman et al. \(2006\)](#) ont également rapporté la résistance des souches des *Bacillus licheniformis* à l'ofloxacine.

Concernant la résistance aux aminoglycosides (chloramphénicol), récemment, les travaux d'[Yvonne et al. \(2019\)](#) montrent qu'une nouvelle protéine chloramphénicol acétyltransférase (CAT) a été trouvée dans le chromosome des souches de *Bacillus licheniformis* résistantes au chloramphénicol. [Sorokulova et al. \(2008\)](#) a aussi rapporté la résistance au chloramphénicol chez les *Bacillus*.

Les *Pseudomonas* de notre étude présentent des taux de résistances remarquables aux  $\beta$ -lactamines (ceftazidime et céfazoline) ce qui peut être expliqué par la surproduction de la céphalosporinase AmpC associée à une imperméabilité et/ou une surexpression d'efflux ([Cavallo et al., 2002](#)). Nos résultats sont comparables à ceux rapportés par [Réa-raisin \(2013\)](#) qui a montré une résistance importante des *Pseudomonas* au ceftazidime.

La résistance à la chloramphénicol est due probablement à une réduction de la perméabilité membranaire de l'antibiotique, une mutation sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien ou à la présence d'une enzyme appelée chloramphénicol acétyltransférase ([Courvalin et al., 2006](#)). 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.

La résistance importante des *Pseudomonas* isolés dans notre étude à la colistine peut être résulter d'une modification de lipopolysaccharides (LPS). En effet, la fixation de la colistine à la membrane externe est rendu possible grâce à des interactions électrostatiques entre les cations et les groupements négatifs portés par le LPS, la colistine franchit la membrane externe puis s'insère dans la membrane cytoplasmique créant une fuite des composés cellulaires et un arrêt de la respiration cellulaire fatale pour la bactérie ([Vettoretti, 2009](#)). Notre présent résultat se diffère à celui rapporté par [Landman et al. \(2005\)](#).

La vancomycine est un antibiotique utilisé pour traiter diverses infections nosocomiales ([Rayner et al., 2005 ; Liu et al., 2011](#)), mais elle n'est pas un choix principal pour le traitement des cas de *P. aeruginosa*, sa prescription élevée a provoqué l'apparition de niveaux de résistance excessifs ([Leekha et al., 2011](#)). En effet, cette résistance due à une surexpression d'une protéine de la membrane externe, *oprF*, qui protège le LPS de se lier aux

antibiotiques (Gilleland *et al.*, 1989). Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par Ahmadi *et al.* (2016).

Dans la présente étude nous avons constaté que toutes les souches de *Bacillus licheniformis* et *Pseudomonas aeruginosa* sont multirésistantes (résistance au moins à trois classes d'antibiotiques actifs).

La résistance bactérienne aux antibiotiques est le fruit de multiples facteurs, dont la consommation importante (Goossens *et al.*, 2005) et mésusage des antibiotiques (Guillemot *et al.*, 1998). En général les services ou les hôpitaux qui consomment le plus d'antibiotiques ont la plus forte prévalence de bactéries résistantes (Ballou *et al.*, 1992).

Les antibiotiques se comportent comme des mutagènes aléatoires responsables de la résistance à diverses classes d'antibiotiques. La résistance, soit par mutation soit par acquisition de gène exogène, peut être dramatiquement augmentée par la présence de faibles concentrations d'antibiotiques dans l'environnement des bactéries (Chow *et al.*, 1991 ; Meyer *et al.*, 1993). Les conditions sanitaires inadéquates et les mauvaises pratiques de prévention et de contrôle des infections contribuent à l'émergence et encouragent la propagation des bactéries multirésistantes (Jyoti *et al.*, 2014).

Malheureusement, la multi-résistance peut rendre difficile le traitement de certaines infections qui nécessitent le recours à une antibiothérapie très prolongée, comme elle peut déclencher l'utilisation de thérapies plus coûteuses car les agents pathogènes sont devenus résistants aux médicaments disponibles dans le commerce (Fishbain *et al.*, 2010 ; WHO, 2014).



### III. Capacité de formation de biofilm : étude synthétique

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 échoué 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 deux espèces isolées dans notre étude : *Bacillus licheniformis* et *Pseudomonas aeruginosa*.

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 ; Charles *et al.*, 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 y a peu de données sur la formation de biofilm par les espèces du genre *Bacillus*. En effet, de nombreuses sources rapportent que *Bacillus licheniformis* est une excellente bactérie formatrice de biofilm.

Norbaizura *et al.* (2017) ont montré que trois isolats de *B. licheniformis* sont fortement formatrices de biofilm à 30 °C, par contre, neuf isolats ont produit des biofilms modérés à 37 °C et des biofilms faibles à 55 °C. Ils ont observé que les isolats de *B. licheniformis* pourraient

produire des exopolysaccharides localisée à l'interface air – liquide qui génèrent la formation de biofilms.

L'ensemble des observations de [Randrianjatovo-Gbalou et al. \(2017\)](#) a montré qu'une souche de *B. licheniformis* est capable de former une matrice de biofilms stabilisée par la formation d'une « ultrastructure » formée par l'ADN extracellulaire (ADNe) et les amyloïdes. Cette hypothèse a été déjà donnée par l'étude de [Devaraj et al. \(2015\)](#) et [Gallo et al. \(2015\)](#) qui ont suggéré que l'ADN extracellulaire tend à former un composite en s'incorporant dans des protéines ou amyloïdogénique peptides.

[Parker et al. \(2003\)](#) ont montré qu'une variété de souches de *B. licheniformis* pouvait se fixer à l'acier inoxydable. Par conséquent, ces bactéries peuvent développer des biofilms sur toute surface où les conditions sont propices à leur croissance ([Donlan 2002 ; Flint et al., 2001 ; Norbaizura et al., 2017](#)).

En tant que bactérie ubiquiste, *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie modèle qui a la capacité à former des biofilms. L'étude d'[Abd El Galil et al. \(2013\)](#) a révélé que 84% des isolats de *P. aeruginosa* de différents sites d'urologie des hôpitaux universitaires égyptiennes étaient de grands producteurs de biofilms, alors que 16% des isolats étaient des producteurs soit des biofilms modérés soit des biofilms faibles.

[Lattab \(2018\)](#) a testé la capacité de certaines souches de *P. aeruginosa* à former des biofilms par la méthode de la microplaque 96 puits sous l'influence de nombreux facteurs parmi lesquels la surface et le milieu, il a observé un taux de formation des biofilms élevé sur des surfaces hydrophobes.

De même, [Pezhman et al. \(2019\)](#) ont testé des isolats de *P. aeruginosa* d'origine clinique (prélèvements de plaies) et environnementale (échantillons de plancher et de ventilation médicale) et ils ont trouvé que 80% des isolats environnementaux et 94,8% des isolats cliniques sont formatrices de biofilm.

La colonisation des surfaces dans l'environnement hospitalier par *P. aeruginosa* est souvent associée à la présence d'un biofilm qui sert de réservoir à la bactérie et conduit à une certaine tolérance aux agents antibactériens. [Jailton et al. \(2018\)](#) ont montré que 48,4% des isolats cliniques de *P. aeruginosa* classés comme producteurs de biofilms étaient des BMR et 51,6% étaient des BMS suggérant que la formation de biofilm n'était pas pertinente pour

la résistance aux antimicrobiens. Ces résultats différents à ceux trouvés par [Perez et al., \(2011\)](#) où tous les isolats de *P. aeruginosa* produisant des métallo-bêta-lactamases (M $\beta$ L) ont produit un biofilm.

Selon [Perez et al., \(2013\)](#), la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* est liée à l'existence des mécanismes de régulation de l'expression des gènes *Quorum Sensing* (QS). En revanche, les résultats rapportés par [Karatuna et al., \(2010\)](#) ont montré que la détection des gènes QS n'était pas aussi élevée que celles rapportées dans des études antérieures. Il a été également montré que la formation de microcolonies chez *P. aeruginosa* a été attribuée à de nombreux facteurs, il s'agit notamment des pili de type IV, des flagelles, de l'ADN libre, de l'alginate et des polysaccharides *Pel* et *Psl*. Même si l'un des facteurs ne fonctionne pas, le biofilm est toujours en mesure de bien fonctionner ([Stapper et al., 2004](#)).

La virulence bactérienne est aussi un facteur majeur pour *P. aeruginosa* formatrice de biofilm ce qui provoque sa survie dans divers environnements et entraîne par conséquent des infections chroniques ([de Almeida Silva et al., 2017](#)).

La capacité de *B. licheniformis* et *P. aeruginosa* à former des biofilms sur différentes surfaces, propriété importante de ces espèces, 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

Les résultats de l'étude de l'antibiorésistance et la capacité de formation de biofilm chez *Bacillus* et *Pseudomonas* isolés du milieu hospitalier, permettent de tirer les conclusions suivantes :

- Quatre *Bacillus licheniformis* et 4 *Pseudomonas aeruginosa* ont été isolés à partir de différents sites dans les sanitaires des établissements hospitaliers ;
- La présence de ces bactéries pathogènes opportunistes reflète bien la tolérance des souches et/ou la mauvaise utilisation des désinfectants ;
- Toutes les souches isolées sont des bactéries multi-résistantes ;
- La moitié des *Bacillus* et la majorité des *Pseudomonas* 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 *Bacillus* que pour les *Pseudomonas* doit être envisagée afin de mieux comprendre les échecs de désinfection ;
- Des essais *in vitro* de bactéricidie sur biofilms doivent être réalisés afin de déduire les concentrations efficaces de désinfectants sur les populations bactériens cultivables.

# **Références Bibliographiques**

**A**

- Aaron S.D., Ferris W., Ramotar K., Vandemheen K., Chan F. (2002).** Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with fibrosis. *Clinical Microbiology*. 40 : 4172–4179.
- Abd El Galil K., AbdelGhani S.M., Mohamed A.S., Wael E.N. (2013).** Detection of biofilm genes among clinical isolates of *pseudomonas aeruginosa* recovered from some egyptian hospitals. *Egyptian Journal of Microbiology*. 36 : 86-101.
- Adler A., Gottesman G., Dolfin T., Arnon S., Regev R., Bauer S., Litmanovitz I. (2005).** *Bacillus* species sepsis in the neonatal intensive care unit. *Infection*. 51 : 390-395.
- Ahmadi K., Hashemian A.M., Bolvardi E., Hosseini P.K. (2016).** Vancomycin-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Cases of Trauma. *Medical Archives*. 70(1) : 57–60.
- Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Monteil H. (2000).** Bactériologie clinique. Ellipses, 3ème édition. 602p.
- Avril. J. L., Dabernat H., Denis F., Monteil H. (1992).** Bactériologie clinique. Ellipses. p : 135-522.

**B**

- Baba Ahmed-Kazi Tani Z., Arlet G. (2014).** News of antibiotic resistance among Gramnegative bacilli in Algeria. *Pathologie Biologie*. 62 : 169-78.
- Baghdadi I., Lydia Bengriche L., Immessaoudene F., Djebbar. D., Mougari I., Bensalem A., Zebboudj F., Djenouhatk K. (2020).** Rôle du CLIN lors d’une infection nosocomiale dans un hôpital d’Alger Est. *Annales de Biologie Clinique*. 78(1).
- Ballow C.H., Schentag J.J. (1992).** Trends in antibiotic utilization and bacterial resistance: report of the National Nosocomial Resistance Surveillance Group. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 15: 37-42.
- Barbier F., Wolff M. (2010).** Multirésistantes chez *Pseudomonas aeruginosa* vers l’impasse thérapeutique. *Medecine Sciences*. 11(26) : 960-968.
- Beeton M.L., Aldrich-Wright J.R., Bolhuis A. (2014).** The antimicrobial and antibiofilm activities of copper (II) complexes. *Inorganic Biochemistry*. 140 : 167–72.
- Beharry Z., Chen H., Gadhachanda V.R., Buynak J.D., Palzkill T. (2004).** Evaluation of penicillin-based inhibitors of the class A and B  $\beta$ -lactamases from *Bacillus anthracis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 313 : 541-545.
- Bellifa S. (2014).** Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat. Université abou bekr belkaid, Tlemcen. p : 15-16.
- Bert F., Lambert-Z. N., (2000).** *Pseudomonas aeruginosa* : actualités sur la résistance aux  $\beta$ -lactamines et implications thérapeutiques. *Antibiotiques*. 2(3) : 195-201.
- Berthelot P, Dietemann J, Fascia P, Rosa, Olivier F.M., LuchtF., PozzettoB., GrattardF. (2006).** Bacterial contamination of nonsterile disposable gloves before use. *American Journal of Infection Control*. 34(3) : 128–130.
- Bodet C., Grenier D., Chandad F., Ofek I., Steinberg D., Weiss E.I. (2008).** Potential oral health benefits of cranberry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48 : 672–680.
- Boles B.R., Thoendel M., Singh P.K. (2005).** Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Molecular Microbiology*. 57 : 1210-1223.
- Bonomo R.A., Szabo D. (2006).** Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*. 43 : S49-56.
- Braun C., Ockhuijsen E., Eppens M., Koster W. (2001).** Maturation of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Biological Chemistry*. 276 : 26030-26035.
- Bright K.R., Boone S.A., Gerba C.P. (2010).** Occurrence of bacteria and viruses on Elementary classroom surfaces and the potential role of Elementary Classroom hygiene in the spread of infectious diseases. *School Nursing*. 26(1) : 33-41.
- Brown K.L. (2000).** Control of bacterial spores. *Le British Medical Bulletin*. 56 : 158-171.
- Brown N.L., Stoyanov J.V., Kidd S.P., Hobman J.L. (2003).** The *MerR* family of transcriptional regulators. *Federation of European Microbiological Societies microbiology reviews*. 27 : 145– 163.
- Brun-Buisson C. (2015).** Le dépistage des porteurs de bactéries multirésistantes : chez quels patients. *Réanimation*. 24(2) : 304-314.
- Busenlehner L.S., Pennella M.A., Giedroc D.P. (2003).** The *SmtB/ArsR* family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance. *Federation of European Microbiological Societies microbiology reviews*. 27 : 131– 143.

Buyck J.M., Plesiat P., Traore H., Vanderbist F., Tulkens P.M., Bambeke F.V. (2012). Increased susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to macrolides and ketolides in eukaryotic cell culture media and biological fluids due to decreased expression of *oprM* and increased outer-membrane permeability. *Clinical Infectious Diseases*. 55: 534–542.

C

Campès C., Jarraud S., Bitar D., Maine C., Che D. (2006). Les légionelloses survenues en France en 2005. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire* n° 26. 43 : 265-267.

Camps M. (2011). Bio-essais anti-adhésion sur des bactéries marines pour le criblage de molécules et de revêtements antifouling. Thèse de Doctorat en biologie marine. Université de Toulon, Toulon. 42p.

Casey A.L., Adams D., Karpanen T.J., Lambert P.A., Cookson B.D., Nightingale P., Miruszenko L., Shillam R., Christian P., Elliott T.S.J. (2010). Role of copper in reducing hospital environment contamination. *Journal of Hospital Infection*. 74 : 72–77.

CA-SFM, COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE. (2020). Recommandation. p : 12-15, 27,46-48.

Castagnola E., Fioredda F., Barretta M. A., Pescetto L., Garaventa A., Lanino E., Micalizzi C., Giacchino R., Dini G. (2001). *Bacillus sphaericus* bacteraemia in children with cancer: case reports and literature review. *Hospital Infection*. 48 :142-145.

Cavaco L.M., Hasman H., Xia S., Aarestrup F.M. (2009). *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* sérovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53 : 603-608.

Cavallo J.D., Ramisse F., Girardet M., Vaissaire J., Mock M., Hernandez E. (2002). Antibiotic susceptibilities of 96 isolates of *Bacillus anthracis* isolated in France between 1994 and 2000. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46 : 2307-2309.

Charles G. Roberts M.S. (2013). The role of biofilms in reprocessing medical devices. *American Journal of Infection Control*. 41(5) : 77-80.

Chen H.Y., Yuan M., Livermore D.M. (1995). Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *Medical Microbiology*. 43(4) : 300-309.

Chen X., Stewart P.S. (2000). Biofilm Removal Caused by Chemical Treatments. *Water Research*. 34(17) : 4229-4233.

Chen, Y., Succi, F., Tenover C., Koehler T.M. (2003).  $\beta$ -Lactamase Genes of the Penicillin-Susceptible *Bacillus anthracis* Sterne Strain. *Bacteriology*. 185 : 823-830.

Cholley P. (2010). Analyse génétique des souches multi-résistantes de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'est de la France, apport prédictif potentiel sur le risque infectieux. Thèse de doctorat en science de la vie et de la santé. Université de Franche –compte. Besançon. 21p.

Chopra L., Roberts M. (2001). Tetracycline antibiotics : mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65 : 232-260.

Chow J.W., Fine M.J., Shlaes D.M. (1991). *Enterobacter bacteremia*: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Annals of Internal Medicine*. 115 : 585-90.

Cooksey D.A. (1994). Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 14 : 381-386.

Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*. 49 : 711-45.

Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284 : 1318-1322.

Courvalin P. (2008). La résistance des bactéries aux antibiotiques : combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*. 161p.

Courvalin P., (2006). Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases*. 42(1) : S25-34.

Crémet L., Corvec S., Batard E., Auger M., Lopez I., Pagniez F., Dauvergne S., Caroff N. (2013). Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of *Escherichia coli*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 75(3) : 252-5.

CTIN, Comité Technique national des Infections Nosocomiales. (2002). Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé : air, eaux et surfaces. *Ministère chargé de la santé*. 78p.

D

Dancer S.J. (2004). How do we assess hospital cleaning? A proposal for microbiological standards for surface hygiene in hospitals. *Hospital Infection*. 56 : 10–15.



- Davane M., Suryawanshi N., Pichare A., Nagoba B. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* from hospital environment. *Microbiology and Infectious Diseases*. 4(1) : 42-43.
- Davey M.E., O'Toole G.A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64 : 847-867.
- De Almeida Silva K.C.F., Calomino M.A., Deutsch G., De Castilho S.R., De Paula G.R., EspeR L.M.R., Teixeira L.A. (2017). Molecular characterization of multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn center. *Burns*. 43 : 137-143.
- Debopam B., Sandipan C., Banerjee U. C., Arun K. G., Lalitagauri R. (2011). Green Pigment from *Bacillus cereus* M<sup>16</sup> (MTCC 5521): Production Parameters and Antibacterial Activity. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 164 : 767-779.
- Degremont. (1998). Mémento technique de l'eau. Degremont, Paris. 592p.
- Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Tec and DOC. p : 289- 476.
- Delarras C. (2014). Pratique en microbiologie de laboratoire, recherche des bactéries et de levures-moisissures. TEC and DOC. p : 269-411.
- Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E., Quentin R. (2007). Bacilles à Gram négatif non fermentaires, Genre *Pseudomonas*. In Bactériologie Médicale, techniques usuelles. ElsevierMasson, 2ème édition, France. p : 330-343.
- Deplano A., DenisO., PoirelL., HocquetD., NonhoffC., BylB., NordmannP., VincentJ. L. (2005). Struelens Molecular Characterization of an Epidemic Clone of Panantibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology*. 43.(3) : 1198-1204.
- Desenclos J. C., RAISIN Working Group. (2009). A national program early warning investigation and surveillance of healthcare associated infection in France. *Eurosurveillance*. 14(46) : 19408.
- Devaraj A., Justice S.S., Bakaletz L.O., Goodman S.D. (2015). DNABII proteins play a central role in UPEC biofilm structure. *Molecular Microbiology*. 96(6) : 1119-1135.
- Diekema D., Dodgson K., Sigurdardottir B., Pfaller M.A. (2004). Rapid detection of antimicrobial-resistance organism carriage: an unmet clinical need. *Clinical Microbiology*. 142 : 2879-2883.
- Djeribi R., Bouchloukh W., Jouenne T., Menaa B. (2012). Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. *American journal of infection control*. 40 : 854-859.
- Dohmae S., Okubo T., Higuchi W., Takano T., Isobe H., Baranovich T., Kobayashi, M Uchiyama S., Tanabe Y., Itoh M., Yamamoto T. (2008). *Bacillus cereus* nosocomial infection from reused towels in Japan. *Hospital Infection*. 69(4) : 361-367.
- Donlan R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 8 : 881-890.
- Donlan R.M. (2009). Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends in Microbiology*. 17 : 66-72.
- Ducel G., Fabry J., Nicolle L., Girard R., Perraud M., Prüss A., Savey A., Tikhomirov E., Thuriaux M., Vanhems P. (2002). Prévention des infections nosocomiales. Guide pratique, 2ème édition. 69 : 44.
- Durocher A., Hajjar J., Hugonnet S. (2002). Prévention de la transmission des micro-organismes en réanimation. Indicateurs et modalités de surveillance. *Réanimation*. 11 : 288-301.

### E

- Emile C. (2008). Modalités de détection des BLSE chez les entérobactéries. *Option Biology*. 19(396) : 18.
- Eyquem A., Alouf J., Montagnier J.L. (2000). Traité de microbiologie clinique : deuxièmes mises à jour et compléments. PICCIN, Italie. 238p.
- Ekhaise F.O., Ighosewe O.U., Ajakpovi O.D. (2008). Hospital Indoor Airborne Microflora in Private and Government Owned Hospitals in Benin City, Nigeria. *Medical Sciences*. 3(1) : 19-23.

### F

- Fagerlund A., Simon P. H. (2008). *Bacillus cereus* Nhe Is a Pore-Forming Toxin with Structural and Functional Properties Similar to the ClyA (HlyE, SheA) Family of Haemolysins, Able to Induce Osmotic Lysis in Epithelia. *Microbiology*. 154 (3) : 693-704.
- Faille C., Sylla Y., Le Gentil T., Benezech C., Slomianny Y. (2010). Viability and surface properties of spores subjected to a cleaning-in-place procedure: consequences on their ability to contaminate surfaces of equipment. *Food Microbiology*. 27 : 769-776.
- Fang Z., Ouyang Z., Zheng H., Wang X., Hu L. (2007). Culturable airborne bacteria in outdoor environments in Beijing, China. *Microbial Ecology*. 54(3) : 487-496.
- Fey P.D., Olson M.E. (2010). Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiology*. 5 : 917-933.

- Filloux A.V.I., (2003).** Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Médecine sciences.* 19(1) : 7.
- Fishbain J., Anton Y.P. (2010).** Treatment of *Acinetobacter* Infections. *Clinical Infectious Diseases.* 79-84.
- Flint S.H., Palmer J., Bloemen K., Brooks J., Crowford R. (2001).** The growth of *Bacillus stearotherophilus* on stainless steel. *Applied Microbiology.* 90 : 151–157.
- Florence B.J. (2014).** Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de bactéries marines. Thèse de doctorat en Microbiologie/Biochimie. Université de Toulon, Toulon. 76p.
- 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.
- Fluit A.C., Maarten R.V., Schmitz F.J. (2001).** Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clinical microbiology Reviews.* 14 : 836-871.
- Francesco S., Valentino B., Guido A., Alessandro M. (1995).** *Bacillus licheniformis* Prosthetic Aortic Valve Endocarditis. *Clinical Microbiology.* 33(11) : 3070–3073.
- Francolini I., Donelli G. (2010).** Prevention and control of biofilm-based medical-device-related, infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 59(3) : 227–238.
- Frankard J., Li R., Taccone F., Struelens M. J., Jacobs F., Kentos A. (2004).** *Bacillus cereus* pneumonia in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 23 : 725-728.
- Freny J., François R., Roland L., Philippe R. (2007).** Précis de bactériologie clinique. Alexandre lacassagne et ESKA, 2ème édition, France.p : 795-910, 1037-1093, 1121-1148.
- Freny J., Reanaud F., Hansen W., Bollet C. (2000).** Précis de bactériologie clinique. ESKA, Paris. p : 557- 611.
- Frère J.M. (1995).**  $\beta$ -Lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Molecular Microbiology.* 16 : 385-95.

## G

- Gallo P.M., Rapsinski G.J., Wilson R.P., Oppong G.O., Sriram U., Goulian M., Buttaro B., Caricchio R., Gallucci S., Tükel Ç. (2015).** Amyloid-DNA composites of bacterial biofilms stimulate autoimmunity. *Immunity.* 42 : 1171–1184.
- Ghane M., Azimi Z. (2014).** Isolation, Identification and Antimicrobial Susceptibility of *Pseudomonas* spp Isolated from Hospital Environment in Tonekabon, North of Iran. *Applied and Environmental Microbiology.* 2(4) : 97-101.
- Gibson C.J., Hass C.N., Rose J.B. (1998).** Risk assessment of waterborne protozoa: status and future trends. *Parasitology.* 117 : 205-212.
- Gibson R.L., Burns J.L., Ramsey B.W. (2003).** Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 168 : 18–951.
- Gilleland L.B., Gilleland H.E., Gibson J.A., Champlin F.R. (1989).** Adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *Medical Microbiology.* 29 : 41–50.
- Goossens H., Ferech M., Stichele R.V., Elseviers M. (2005).** Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national data base study. *The Lancet.* 365(9459) : 579-87.
- Grant S.S., Hung D.T. (2013).** Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence.* 4 : 273-283.
- Green J., Wright P.A., Gallimore C.I., Mitchell O., Morgan-Capner P., Brown D.W. (1998).** The role of environmental contamination with small round structured viruses in a hospital outbreak investigated by reverse-transcriptase polymerase chain reaction assay. *Hospital Infection.* 39(1) : 39- 45.
- Guillemot D., Carbon C., Balkau B., Geslin P., Lecoœur H., Vauzelle-Kervroëdan F., Bouvenot G., Eschwège E. (1998).** Low Dosage and Long Treatment Duration of  $\beta$ -Lactam: Risk Factors for Carriage of Penicillin-Resistant *Streptococcus pneumoniae*. *The American Medical Association.* 279(5) : 365-70.
- Guiraud J. (2003).** Microbiologie alimentaire. Dunod. p : 185-265.

## H

- Hajjar H., Hartemann P., Luu-Duc D., Nicolle M. C., Perraud M., Bertrou A., Cetre J. C., Chapuis C., Guignement S., Fabry J. (2000).** Vigilance environnementale: Contrôles microbiologiques de l'environnement hospitalier. *Hygiènes.* (3) : 139-179.
- Hanna P.C., Dixon T.C., Meselson M., Guillemin J. (1999).** Anthrax. *The New England.* 341 : 815–826.
- Hassan M.T., van der Lelie D., Springael D., Romling U., Ahmed N., Mergeay M. (1999).** Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene.* 238: 417-425.
- Haydushka A.I., Markova N., Kirina V., Atanassova M. (2012).** Recurrent Sepsis Due To *Bacillus licheniformis*. *Global Infectious Diseases.* 4(1) : 82–83.

- Hola, V.; Ruzicka, F. (2011). The formation of poly-microbial biofilms on urinary catheters. In: Urinary Tract Infections. Thèse de doctorat. Masaryk University, Brno Czech Republic. p : 322,249-289.
- Horan T., Andrus M., Dudeck M. (2008). Surveillance definition of health care associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Infection Control*. 36 : 309-332.
- Hota S., Hirji Z., Stockton K., Lemieux C., Dedier H., Wolfaardt G., Gardam M.A. (2009). Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 30 : 25-33.

I

- IHG, International Health Facility Guidelines. (2017). p: 10-18.
- Inglesby T.V., O'Toole T., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S., Eitzen E., Friedlander A.M., Gerberding J., Hauer J., Hughes M.J., Osterholm M.T., Parker G., Perl T.M., Russell P.K., Tonat K. (2002). Anthrax as a biological weapon. Updated recommendations for management. *The American Medical Association*. 287 : 2236-2252.
- IPP, Institut Pasteur Production. (1981). Milieux et réactifs de laboratoires Pasteur. Paris. p : 589.

J

- Jailton L.D.C.L., Lilian R.A., Paula R.L., Araújo J., João P.B.N., Maria A.V.M., Marcia M.C.M. (2018). Biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and structural changes in LasR protein of isolates non biofilm-producing. *Infectious diseases*. 22(2) : 129–136.
- Jehl F., Chomar M., Tankovic J., Gerard A., Schrenzel J., Gutmann L., Stahl J.P. (2012). De l'antibiogramme à la prescription. BioMérieux, 3eme édition, France. p : 76.
- Juan C., Gutiérrez O., Oliver A., Ayestarán J.I., Borrell N., Pérez J.L. (2005). Contribution of clonal dissemination and selection of mutants during therapy to *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance in an intensive care unit setting. *Clinical Microbiology and Infection*. 11 : 887-892.
- Jyoti T., Shrayanee D., Zeeshan F., Saif H. (2014). Multidrug Resistance: An Emerging Crisis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 7p.

K

- Kaplan J.B., Ragunath C., Velliyagounder K., Fine D.H., Ramasubbu N. (2004). Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48 : 2633-2636.
- Karatuna O., Yagci A. (2010). Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates. *Clinical Microbiology and Infection*. 16 : 1770–5.
- King L.B., Swiatlo E., Swiatlo A., McDaniel L.S. (2009). Serum resistance and biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 55 : 414-421.
- Koibuchi H., Kotani K., Taniguchi N. (2013). Ultrasound probes as a possible vector of bacterial transmission. *Medical Ultrasonography*. 15(1) : 41–44.
- Koneman's E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn W.J. (1997). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams and Wilkins, 5eme edition. p: 651-708.

L

- La Barre S., Dominique H. (2007). Rencontres avec les bactéries marines. *La Société de Biologie*. 201(3) : 281-289.
- Lafamme C. (2008). Agents du bioterrorisme : détection in situ de gènes de résistance aux antibiotiques chez les spores de *Bacillus* SP. *Thèse de doctorat*. Université Laval. p : 17-22.
- Landman D., Bratu S., Alam M., Quale J. (2005). City wide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B. *Antimicrobial Chemotherapy*. 55 : 954-957.
- Larpet J. (1997). Microbiologie des eaux d'alimentaire : Technique de labo. Tec et Doc. p : 294-300.
- Larpet J. P. (2000). Introduction à la nouvelle classification bactérienne et les principaux groupes bactériens. *Lavoisier*. 4 : 183-212.
- Larson E.L. (1996). Hand washing and skin preparation for invasive procedures. *Infection control and applied epidemiology, Principles and practice*, Mosby-Year Book. p : 19-1–19-7.
- Lashéras A., Guisset O., Boulestreau H., Rogues A.M., Fiore M., Szajner S., Bezian M.C., Gabinski C., Gachie J.P. (2006). Réservoirs et transmission de *Pseudomonas aeruginosa* en réanimation médicale. *Médecine et maladies infectieuses*. 36 : 99-104.
- Lattab A. (2018). Effet des composés naturels sur l'adhérence et la formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem. 69p.

- Laurent C. (2019).** Mécanismes d'acquisition du fer de l'hôte chez *Bacillus cereus* : rôle du couple bacillibactine-FeuA et expression des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer in vivo durant l'infection intestinale chez l'insecte. Thèse de doctorat. Université Paris-Saclay, France. 22p.
- Lazdunski A. (2003).** *Pseudomonas aeruginosa* : modèle de choix pour l'étude d'une bactérie pathogène opportuniste. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*. 22 : 523-526.
- Lee K., Costerton J.W., Ravel J., Raymond K.A., David M.W., Paul K., Jeff G.L. (2007).** Phenotypic and functional characterization of *Bacillus anthracis* biofilms. *Microbiology*. 153 : 1693–1701.
- Leekha S., Terrell C.L., Edson R.S. (2011).** General Principles of Antimicrobial Therapy. *Mayo Clinic Proceedings*. 86(2) : 156–167.
- Leggett M.J., McDonnell G., Denyer S.P., Setlow P., Maillard J.-Y. (2012).** Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *Journal of Applied Microbiology*. 113(3) : 485-98.
- Lépine F., Michel C., Nicaise G., Imbert R., Vialet L., Thomachot J.N.D., Marco P., Lagier C.M. (2008).** *Bacillus licheniformis* Septicemia in a Very-Low-Birth-Weight Neonate: A Case Report. *Infection*. 37 : 156–158.
- Liu C., Bayer A., Cosgrove S.E., Daum R.S., Fridkin S.K., Gorwitz R.J., Kaplan S.L., Karchmer A.W., Levine D.P., Murray B.E., Rybak M.J., Talan D.A., Chambers H.F. (2011).** Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Adults and Children. *Infectious Diseases Society of America*. 52 : 1–38.
- Longo F., Vuotto C., Donelli G. (2014).** Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiologica*. 37 : 119-127.

**M**

- Malek K., Mino J. C., Lacombe K. (1996).** Santé publique : médecine légale, médecine du travail. ESTEM. p : 49-51.
- Mandell G.L., Bennett J.E. Dolin R. (2010).** Mandel, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone, 7th Edition, Philadelphia. 53p.
- Marchaim D., Taylor A.R., Hayakawa K., Bheemreddy S., Sunkara B., Moshos J., Chopra T., Abreu-Lanfranco O., Martin E.T., Pogue J.M., Lephart P.R., Panda S., Dhar S., Kaye K.S. (2011).** Hospital bath basins are frequently contaminated with multidrug-resistant human pathogens. *Journal of Infection Control*. 40(6) : 562-564.
- Masuda N., Sakagawa E., Ohya S., Gotoh N., Tsujimoto H., Nishino T. (2000).** Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44 (12) : 3322-3327.
- McDonnell G., Russell A.D. (1999).** Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 12 : 147–79.
- Méar J.-B. (2014).** Étude de la modulation de la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* par *Candida albicans* dans un modèle de pneumonie. Thèse de doctorat. Université Lille nord de France, France. 25p.
- Meradji S. (2017).** *Pseudomonas aeruginosa* : Facteurs de virulence et évaluation de la résistance aux bêta-lactamines et aux quinolones. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar, Annaba. p : 10-28.
- Mérens A., Jaut P., Bargues J.D., Cavallo. (2013).** Infection à *pseudomonas aeruginosa*. *EMC- Maladies infectieuses*. 12 : 1166-8598.
- Mesaros N., Nordmann P., Plesiat P., Roussel D.M., Van Eldere J., Glupczynski Y., Laethem Y.V., Jacobs F., Lebecque P., Malfroot A., Tulkens P.M., Bambeke F.V. (2007).** *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical Microbiology and Infection*. 13(6) : 560-78.
- Meyer K.S., Urban C., Eagan J.A. (1993).** Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. *Annals of Internal Medicine*. 119 : 353-8.
- Mikkola R., Saris N. E. L., Grigoriev P. A., Andersson M.A., Salkinoja-Salonen M. S. (1999).** Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide - The emetic toxin of *B. cereus*. *European Journal of Biochemistry*. 263 : 112-117.
- Milind D., Namdev S., Asha P., Basavraj N. (2014).** *Pseudomonas aeruginosa* from hospital environment. *Microbiology and Infectious Diseases*. 4(1) : 42-43.
- Moeller R., Gerda H., Facius R., Stackebrandt E. (2005).** Role of pigmentation in protecting *Bacillus* sp. Endospores against environmental UV radiation. *FEMS Microbiology Ecology*. 231–236
- Moore J.E., Thompson I., Crowe M., Xu J., Shaw A., Millar B.C., Redmond A.O.B., Reid A.J.M., Clarke C., Elborn J.S. (2002).** *Burkholderia cepacia* from a sink drain. *Hospital Infection*. 50 : 235-237.
- Morikawa M. (2006).** Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *Bioscience and Bioengineering*. 101 : 1–8.

- Moskowitz S.M., Ernst R.K., Miller S.I. (2004). PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *Bacteriology*. 186 : 575-579.
- Muller A., Guaguere E. (2014). L'Antibiothérapie n'est pas la seule source d'antibiorésistance : notion de biofilm. *Congrès national d'association Française des Vétérinaires pour Animaux de Compagnie*. 2p.
- Muller C., Plesiat P., Jeannot K. (2011). A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55 : 1211-1221.
- Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C., Tenover R.H. (1999). Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology, 7th edition. p : 1474-1504.

N

- Naas T., Laurence P., Laurent P., Ronco E., Nordmann P. (1999). An SHV-Derived Extended-Spectrum-Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43 : 1281-1284.
- Nagant C., Tré-Hardy M., Devleeschouwer M., Dehaye J.P. (2010). Study of the initial phase of biofilm formation using a biofomic approach. *Journal of Microbiological Methods*. 82:243- 248.
- Nicholson W.J., Munakata N., Horneck G., Melosh H.J., Setlow P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64 : 548-572.
- Nicholson W.L. (2002). Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59 : 410-416.
- Norbaizura S.M.Z., Steve H.F., Rod B., Hong-Soon T. (2017). Characterisation and biofilm screening of the predominant bacteria isolated from whey protein concentrate 80. *Dairy science technology*. 96 : 285–295.
- Nyaledome A.I. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* : Epidemiologie et état actuel des resistance à l'hôpital militaire d'instruction mohammed v. Thèse de doctorat en Pharmacie. Université mohammed V, Rabat. p : 30-31.

O

- Oh S.Y., Budzik J.M., Garufi G., Schneewind O. (2011). Two capsular polysaccharides enable *Bacillus cereus* G9241 to cause anthrax-like disease. *Molecular Microbiology*. 80(2) : 1365-2958.
- Ohsaki Y., Koyano S., Tachibana M., Shibukawa K., Kuroki M., Yoshida I., Ito Y. (2007). Undetected *Bacillus* pseudo-outbreak after renovation work in a teaching hospital. *Infection*. 54(6) : 617–622.
- Oliveira A.C., Damasceno Q.S. (2010). Surfaces of the hospital environment as possible deposits of resistant bacteria: a review. *The University of São Paulo Nursing School Journal*. 44(4) : 1112-7.
- Osman M.E., Ibrahim H.Y., Yousef F.A., Abo Elnasr A.A., Saeed Y., Abdel Hameed A.A. (2017). A study on microbiological contamination on air quality in hospitals in Egypt. *Indoor and Built Environment*. 0(0) : 1–16.
- 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) : 6–11.
- Oутten F.W., Oутten C.E., O'Halloran T. (2000). Metalloregulatory systems at the interface between bacterial metal homeostasis and resistance. *American Society for Microbiology*. p : 145-157.
- Ozkocaman V., Ozcelik T., Ali R., Ozkalemkas F., Ozkan A., Ozakin C., Akalin H., Ursavas A., Coskun F., Ener B., Tunali A. (2006). *Bacillus* spp. among hospitalized patients with haematological malignancies: clinical features, epidemics and outcomes. *Hospital Infection*. p : 1-8.

P

- Palleroni N.J. (2008). The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. In Cornelis P. *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Belgium. p : 1–18.
- Pantanello 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.
- Parkar S.G., Flint S.H., Brooks J.D. (2003). Physiology of biofilms of thermophilic bacilli—potential consequences for cleaning. *Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30 : 553–560.
- Pechère J., Köhler T. (2008). Patterns and modes of  $\beta$ -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection*. p : 5-15-18.

- Pechère, J.C. (2001).** Macrolide resistance mechanisms in Gram-positive cocci. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 18 : S25-S28.
- Perdu, C. (2013).** Etude de deux protéines impliquées dans l'injection de toxines par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université de Grenoble, Grenoble. 24p.
- Perez L.R., Costa M.C., Freitas A.L., Barth A.L. (2011).** Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42 : 476–9.
- Perez L.R., Machado A.B., Barth A.L. (2013).** The presence of quorum-sensing genes in *Pseudomonas* isolates infecting cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. *Current Microbiology*. 66 : 418–20.
- Pezhman K., Parviz M., Rasool Y.M., Manoochehr K., Mojtaba H.Y., Dara D., Mohammad Y.A. (2019).** Molecular characterization of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn center. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 1731-1736.
- Philips P.L., Wolcott R.D., Fletcher J., Schultz G.S. (2011).** Biofilms made easy. *Wounds International*. 1(3) : 1-6.
- Poirel L. (2006).** Nouveaux mécanismes de résistance chez *Pseudomonas aeruginosa* : quelles perspectives. XVIIe Congrès nationale de la SFHH-Nantes. p : 25.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (2003).** Microbiologie. De boeck De BoeckSupérieur. 2ème édition, France. p : 525-526.
- Prescott M. (2009).** Microbiologie. De Boeck, 2eme édition, France. p : 600-603.
- Prescott M., Harley P., Klein A. (1999).** Microbiologie. De BoeckUniversité. 981p.

**R**

- Randrianjatovo-Gbalou I., Rouquette P., Lefebvre D., Girbal-Neuhauser E., Marcato Romain C-E. (2017).** In situ analysis of *Bacillus licheniformis* biofilms: amyloid-like polymers and eDNA are involved in the adherence and aggregation of the extracellular matrix. *Applied Microbiology*. 1364-5072.
- Rayner C., Munckhof W.J. (2005).** Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Internal Medicine*. 35(2) : 3–16.
- Réa-raisin, réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (2013).** Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte. 20p.
- Ren D., Bedzyk L. A., Setlow P., Thomas S. M., Ye R. W., Wood T. K. (2004).** Gene expression in *Bacillus subtilis* surface biofilms with and without sporulation and the importance of yver for biofilm maintenance. *Biotechnology and Bioengineering*. 86 : 344–364.
- Rhame F., Benett J., Brachman P. (1998).** The inanimate environment. *Hospital infections*. 299-324.
- Rio Y., Pina P., Jurin F., Allouch P., Didion J., Chardon H., Chiche D. (2002).** Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics isolated from patients of intensive care units in France in 1998. Resistant phenotypes to beta-lactams. *Pathologie Biologie*. 50(1) : 12-7.
- 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.
- Robicsek A., Strahilevitz J., Jacoby G.A., Macielag M., Abbanat D., Park C.H., Bush K., Hooper D.V. (2006).** Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*. 12 : 83-8.
- Rochemonteix A. C. (2009).** Les biofilms et la peau. Thèse de doctorat vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, Paris. 49p.
- Rogan M.P., Taggart C.C., Greene C.M., Murphy P.G., O'Neill S.J., McElvaney N.G. (2004).** Loss of Microbicidal Activity and Increased Formation of Biofilm Due to Decreased Lactoferrin Activity in Patients with Cystic Fibrosis. *Infectious Diseases*. 190 : 1245-1253.
- Ronner U., Husmark U., Henriskon A. (1990).** Adhesion of *Bacillus* speices in relation to hydrophobicity. *Applied Bacteriology*. 69 : 550-556.
- Roux A., Ghigo J.M. (2006).** Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*. 159 (3) : 261-269.
- Russell A.D. (1997).** Plasmids and bacterial resistance to biocides. *Applied and Environmental Microbiology*. 82 : 155–165.
- Russell A.D., Dancer B.N., Power E.G.M. (1991).** Effects of chemical agents on bacterial sporulation, germination and outgrowth. *Society for Applied Bacteriology*. 27 : 23–44.
- Rutala W.A. (1995).** APIC guidelines for selection and use of disinfectants. *American Journal of Infection Control*. 23 : 313–342.

## S

- Saouide el ayne N., Echchelh A., Chaouch A., Auajjar N., Hamama S., Soulaymani A. (2014). Rôle de l'environnement hospitalier dans la prévention des infections nosocomiales : surveillance de la flore des surfaces à l'hôpital el idrissi. *European Scientific*. 1857–7881
- Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.d., Costerton J.W., Davies D.G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Bacteriology*. 184 : 1140-1154.
- Sauer K., Cullen M.C., Rickard A.H., Zeef L.A.H., Davies D.G., Gilbert P. (2004). Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *Bacteriology*. 186 : 7312-7326.
- Schmidt M.G., Attaway H.H., Sharpe P.A., John J.Jr., Sepkowitz K.A., Morgan A., Fairey S.E., Singh S., Steed L.L., Cantey J.R., Freeman K.D., Michels H.T., Salgado C.D. (2012). Sustained Reduction of Microbial Burden on Common Hospital Surfaces through Introduction of Copper. *Journal of Clinical Microbiology*. 50 : 2217-2223.
- 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. *Mycologie médicale*. 27 : 20-27.
- Schulster L., Chinn R. Y., Arduino M. J., Carpenter J., Donlan R., Ashford D., Besser R., Fields B., McNeil M. M., Whitney C., Wong S., Juranek D., Cleveland J. (2003). Guidelines for environmental infection control in health-care facilities: recommendations of CDC and the healthcare infection control practices advisory committee (HICPAC). *Preventing Chronic Disease*. 52(10) : 1–42.
- Shaheen M., FRCPath., FCPATH., Joost H.M.D., DTMH M.D., Adriano D., MBBCh M.T., DTMH. (2018). Guide to infection control in the hospital chapter 8 Patient Areas and Environmental Cleaning. *International Society for Infectious Diseases*. p : 3.
- Shawky Z.S., Bahgt M.R., Usama M.T. (2016). Biosorption of copper and lead using bacterial biomass of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* isolated from el-manzala lake, Egypt. *International Journal of Advanced Research*. 263-274.
- Shears P. (2001). Antibiotic resistance in the tropics. Epidemiology and surveillance of antimicrobial resistance in the tropics. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 95(2) : 127- 30.
- Shiferaw T., Beyene G., Kassa T., Sewunet T. (2013). Bacterial Contamination, Bacterial profile and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Isolates from Stethoscopes at Jimma University Specialized Hospital. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 12 : 39.
- Silver S. (1996). Bacterial resistance to toxic metal ions—a review. *Gene*. 179 : 9-19.
- Sohidul I. (2008). Mécanismes de résistance aux antibiotiques dans chromosomiques *Pseudomonas aeruginosa* et *Neisseria gonorrhoeae*. Thèse de doctorat. Université de Tlemcen, Tlemcen. 5p.
- Sorokulova I.B., Pinchuk I.V., Denayrolles M., Osipova I.G., Huang J.M., Cutting S.M., Urdaci M.C. (2008). The Safety of Two Bacillus Probiotic Strains for Human Use. *Digestive Diseases and Sciences*. 53 : 954–963.
- Sougakoff W., Trystram D. (2003). Résistance aux  $\beta$ -lactamines. Université Pierre et Marie Curie. Faculté de médecine. 78p.
- Speijer H., Savelkoul P.H.M., Bonten M.J., Stobberingh E.E., Tjhie J.H.T.(1999). Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an intensive care unit. *Clinical Microbiology*. 37 : 3654-61.
- Stapper A.P., Narasimhan G., Ohman D.E., Barakat J., Hentzer M., Molin S., Kharazmi A., Høiby N., Mathee K. (2004). Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture but is not essential for biofilm formation. *Medical microbiology*. 53(7) : 679-90.
- Stickler D.J. (2002). Susceptibility of antibiotic resistant Gram-negative bacteria to bacteriocides: a perspective from the study of catheter biofilms. *Symposium series Society for Applied Microbiology*. 31 : 163S-170.
- Sutherland I.W. (2001). The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*. 9 : 222-227.

## T

- Tagoe D.N., Gyande V.K., Ansah E.O. (2011). Bacterial Contamination of Mobile Phones: When Your Mobile Phone Could Transmit More Than Just a Call. *WebmedCentral*. 2(10) : 2294.
- Talon D. (1999). The role of the hospital environment in the epidemiology of multiresistant bacteria. *Hospital Infection*. 43 : 13-17.
- Talon D., Cailleux V., Thouverez M., Michel-Briand Y. (1995). Discriminatory power and usefulness of pulsed field gel electrophoresis in epidemiological studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *Hospital Infection*. 30 : 125-31.

- Telenti, A., Imboden P., Marchesi F., Schmidhein T., Bodmer T. (1993). Direct, automated detection of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 37 : 2054-2058.
- Tenover, F.C., Rasheed J. K.Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover R.H. (1999). Genetic methods for detecting antibacterial and antiviral resistance genes. *American Society for Microbiology*. 1578–1592.
- Teyssou R., Hance P., Nicand E., Nizou J. Y., Buisson Y. (1998). Les infections à *Bacillus cereus* : bactériologie, clinique et traitement. *La Lettre de l'Infectiologue*. 99-104.
- Thomas H. M, Stuart B, Levy M.D. (2004). Confronting the antibiotic resistance crisis: making appropriate therapeutic decisions in community medical practice. *Infections in medicine*. 21(3) : 114–122.
- Todar's K. (2003). Online textbook of bacteriology. University of Wisconsin-Madison. Department of bacteriology. p : 579: 462-477.
- Tortora G. J., Funke B. R., Case C. L. (2003). Introduction à la microbiologie. Editions du nouveau pédagogique inc, Quebec. p : 945.
- 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.

V

- Van H.R., Michiels C. (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Novel Research in Microbiology*. 156 : 626-633.
- Vettoretti L., Floret N., Hocquet D., Dehecq B., Plesiat P., Talon D., Bertrand X. (2009). Emergence of extensive drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 28(10) : 1217–22.
- Vilas-Boas G.T., Peruca A.P., Arantes O.M. (2007). Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Journal of Microbiology*. 53(6) : 673–687.

W

- Walsh F., Morrissey J., O'Gara F. (2001). *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Current Opinion in Biotechnology*. 12 : 289-295.
- Wang M., Guo Q., Xu X., Wang X., Ye X., Wu S., Hooper D. C., Wang M. (2009). New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53 : 1892-1897.
- Wanner O., Bauchrowitz M. (2006). Les biofilms sont omniprésents. *EAWAG News*. 60 : 4-7.
- Warnes S.L., Summersgill E.N., William Keevil C.W. (2015). Inactivation of Murine Norovirus on a Range of Copper Alloy Surfaces Is Accompanied by Loss of Capsid Integrity. *Applied and Environmental Microbiology*. 8(3) : 1085-1091.
- WHO, World Health organization. (2009). Guidelines on Hand Hygiene in Health Care: a Summary. 6p.
- WHO, World Health organization. (2014). Antimicrobial resistance global report on surveillance. 12p.
- WHO, World Health organization. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 3p.

Y

- Yannick D.N.T., Skander 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.
- Yvonne A., Karin B., Elke B., Eric J., Bea N., Roland S., Birgitte S.L., Michiel W., Ahmad A.Z. (2019). Putative antibiotic resistance genes present in extant *Bacillus licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis* strains are probably intrinsic part of the ancient resistome. *PLOS One*. 14(1) : 1-24

Z

- Zenkouai I., Azizi R. (2015). *Manuel de prélèvement*. INH. 43- 44p.
- Zubair M., Sila I., Aizza Z., Humera J., Muhammad A., Khalid O. A. A., Hasan E. (2018). Role of Hospital Surfaces in Transmission of Infectious Diseases. *Medical and Health Sciences*. 12(2) : 857.



# Annexes

## Annexe I

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

**1. Gélose au cétrimide (g/ litre d'eau distillée)**

Peptone	20
Chlorure de sodium	3
Sulfate de potassium	10
Monohydrogénophosphate de potassium	0,3
Cétrimide (bromure de tétradonium)	0,2
Acide nalidixique	0,015
Agar-agar	12
pH = 7,1 / autoclavage 20 min à 121°C.	

**2. Gélose nutritive alcaline (g/ litre d'eau distillée)**

Peptone pepsique de viande	5
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2
Chlorure de sodium	5
Agar-agar	15
pH = 8 / autoclavage à 120°C pendant 15 minutes.	

**3. Milieu Luria Bertani Agar (g/ litre d'eau distillée)**

Peptone	10
Extrait de levure	5
Chlorure de sodium	5
Agar-agar	15
pH = 7,2 / autoclavage à 120°C pendant 15 minutes.	

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

Infusion de viande de bœuf	3
Peptone de caséine	17
Amidon de maïs	1.5
Agar-agar	17
pH= 6.7/ autoclavage 15 min à 121°C.	

**5. Milieu Luria Bertani tamponné (g/ litre d'eau distillée)**

Peptone	10
Glucose	5

NaCl	5
Tampon citrate pH=5.6	

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

Peptone	20
Glucose	2,5
Chlorure de sodium	5
Hydrogénophosphate de potassium	2,5
pH= 7,3 ± 0,2 / autoclavage 15 min à 121°C.	

#### 7. 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.	

#### 8. 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° Cpendant 15 min	

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

##### 1. Violet de Gentiane

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

##### 2. Lugol

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

**3. Fuchshine**

Fuchsine basique	1g
Alcool éthylique	100ml
Phénol	5g
Eau distillée	100ml

**4. Réactif TDA (pour la recherche de tryptophane désaminase)**

Perchlorure de fer	3,4g
Eau distillée	100ml

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

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

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

Hydroxyde de potassium	40g
Eau distillée	100ml

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

Alpha naphthol	6g
Ethanol	100ml

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

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

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

Naphtylamine	0,5 g
Acide acétique 5N	100 ml

**10. Réactif ZYM A**

Tris-hydroxyméthyl-aminométhane	25 g
Acide chlorhydrique à 37 %	11 ml
Laurylsulfate Na	10 g
H <sub>2</sub> O	100 ml

### 11. Réactif ZYM B

Fast Blue BB	0,35 g
2-méthoxy éthanol	100 ml

## Annexe II

**Tableau 11** : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20E (source : <http://www.biomerieux.com>).

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

**Tableau 12** : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 NE  
(<http://www.biomerieux.com>).

Tests	Substrat	Enzymes/Réactions	Résultats				
			Négatif	Positif			
NO3	Nitrate de potassium	<i>Réduction des nitrates en nitrites</i>	<b>NIT 1 + NIT 2 / 5 mn</b>				
			Incolore	Rose/rouge			
		<i>Réduction des nitrates en azote</i>	<b>ZN / 5 mn</b>				
			Incolore	Rose			
TRP	Tryptophane	<i>Formation d'indole</i>	<b>TRP / 3-5 mn</b>				
			Incolore	Rose / rouge			
GLU	Glucose	<i>Fermentation</i>	Bleu à vert	Jaune			
ADH	Arginine	<i>Arginine dihydrolase</i>	Jaune	Orange/rose/rouge			
URE	Urée	<i>Uréase</i>	Jaune	Orange/rose/rouge			
ESC	Esculine	<i>Hydrolyse (β-glucosidase)</i>	Jaune	Gris/marron/noir			
GEL	Gélatine	<i>Hydrolyse (protéase)</i>	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir			
PNPG	p-Nitro-phényle-βD-Galactopyranoside	<i>B-galactosidase</i>	Incolore	Jaune			
GLU	Glucose	<i>Assimilation</i>	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-phenylène diamine				<i>Cytochrome oxydase</i>	Incolore	Violet