



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ ABOUBEKR BELKAID TLEMCEM
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre
et de l'Univers



Département de Biologie
*Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au
Biomédical et à l'Environnement*
مخبر الميكروبيولوجيا التطبيقية للأغذية للبيوطبي وللبيئة

MEMOIRE DE MASTER

Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : MICROBIOLOGIE

Présenté par :

M^{lle} CHIBI Amina

Intitulé du Thème

**Evaluation de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et
Staphylococcus aureus isolées de CHU Tlemcen**

Soutenu le 30/06/2015

Devant le Jury composé de :

Dr BARKAT S.	Maitre de conférence de classe A	Président
Dr TEFIANI C.	Maitre de conférence de classe A	Examineur
Dr REBIAHI Sid Ahmed	Maitre de conférence de classe B	Promoteur

Année Universitaire : 2014-2015

Remerciements

Au terme de ce travail, il m'est agréable d'exprimer mes remerciements à tous ce qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

Je tiens tout d'abord à remercier Mr REBLAHI S.A.; maitre de conférence A à la Faculté des sciences de la nature et de la vie, Science de la terre et de l'univers, de l'université Abou-Bakr-Belkaid de Tlemcen, pour son encadrement, ses précieux conseils, et les encouragements qui m'ont permis de réaliser ce travail.

Je voudrais remercier aussi monsieur BARKA M. S. maitre de conférence A à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Science de la terre et de l'univers de l'université Abou-Bakr-Belkaid de Tlemcen d'avoir accepté de me faire l'honneur de présider ce jury.

Mes très vifs remerciements vont aussi à monsieur TEFIANI C. maitre de conférence B à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Science de la terre et de l'univers de Abou-Bakr-Belkaid pour avoir contribué par sa participation à l'examination de ce travail.

Je ne saurai terminer sans remercier toutes ces personnes qui sont dans l'ombre et dont la contribution à mon travail est non négligeable notamment tout le personnel de laboratoire, de la bibliothèque et de l'administration.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail:

A Dieu, tout puissant, qui m'a donné la force, la santé et le courage de réaliser ce précieux travail.

A la mémoire de mon cher père, qu'Allah ait son âme.

A La personne la plus chère à mon cœur : Maman qui m'a supportée vaillamment pas à pas tout au long de ma vie ..., Les mots ne suffisent pas pour exprimer toute l'affection que j'éprouve pour toi ; je te dois ma réussite, mon éducation, ma fierté. Tu m'as aimé très profondément et tu as été toujours une mère idéale. Tu es la seule qui comprend ma vie : Je te demande pardon et encore une fois Merci.

A mes frères Mohamed, Bouziane et Abd Elatif, pour l'amour, l'attention et l'aide qu'ils m'ont apportés.

A mes très chères sœurs Karima & Malika ainsi que ses époux, qui ont toujours été présents dans les moments les plus difficiles malgré la distance qui nous sépare.

Spéciale dédicace à Khadidja et Fatima.

A mes chères copines : Hanane, Manel, Saliha, Mariem, Nihal, Imen.

A mes amis et à toutes les personnes qui j'aime...

A tous ce qui m'ont apporté d'aide de près ou de loin.

Amina

Liste des abréviations :

AHL : AcylHomosérines Lactones

BHIB: Bouillon Cœur cerveau

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CV: Cristal violet

DO : Densité Optique

IN : Infection nosocomiale

OMS : Organisation mondiale de santé

QS : Quorum Sensing

RCA : Red Congo Agar

TCP : culture de tissu en plaque

UFC : Unité Formant Colonie

PIA : polysaccharide intercellular adhesin

Listes des figures :

Figure 01 : Aspect de <i>P.aeruginosa</i> en microscopie électronique (X 20000).....	7
Figure 02 : Aspect de <i>S. aureus</i> en microscopie électronique (X 20000).....	9
Figure 03: Image obtenue par microscopie, image confocale d'un biofilm formé par <i>Staphylococcus spp.</i> à la surface d'un cathéter veineux.....	12
Figure 04 : Schématisation de biofilm par Zobell, 1943.....	13
Figure 05 : Schéma présentant les étapes du développement du biofilm.....	16
Figure 06 : Principe de l'utilisation d'antimicrobiens à la surface des implants.....	22
Figure 07 : Culture sur la gélose Rouge Congo.....	31
Figure 08 : Principe des techniques de quantification des biofilms en microplaques.....	32
Figure 09 : Principe de la mesure de la biomasse par la méthode de TCP.....	33
Figure 10: Fréquence de prélèvement positif à <i>P.aeruginosa</i> et <i>S.aureus</i>	34
Figure 11 : Pourcentage d'espèces de <i>P.aeruginosa</i> et <i>S. aureus</i> isolées.....	34
Figure 12: Distribution des souches <i>P.aeruginosa</i> et <i>S.aureus</i> dans le service d'urgence en fonction de site de prélèvement.....	35
Figure 13: Distribution des souches <i>P.aeruginosa</i> et <i>S.aureus</i> dans le service EHS en fonction de site de prélèvement.....	36
Figure 14: Distribution des souches <i>P.aeruginosa</i> et <i>S.aureus</i> dans La salle de réveil en fonction de site de prélèvement.....	37
Figure 15: Formation de biofilm par <i>P.aeruginosa</i> par TCP (sans supplément).....	45
Figure 16 : Formation de biofilm par <i>S.aureus</i> par TCP (sans supplément).....	45
Figure 17 : Formation de biofilm par <i>P.aeruginosa</i> par TCP (avec supplément).....	47
Figure 18: Formation de biofilm par <i>S.aureus</i> par TCP (avec supplément).....	47

Liste des photos :

Photo personnelle 01: Technique de formation de biofilm sur microplaque de titration.....	32
Photo personnelle 02: Détection et lecture de biofilm par méthode TCP.....	34
Photo personnelle 03 : Aspect de <i>S.aureus</i> sur gélose chapman.....	38
Photo personnelle 04: Culture de <i>P. aeruginosa</i> sur sur boîte Petri(gélose Mueller-Hinton)	38
Photo personnelle 05 : Aspect macroscopique des colonies de <i>Pseudomonas</i> sur milieu Mac Conkey.....	39
Photo personnelle 06 : Production de catalase par les souches isolées.....	39
Photo personnelle 07: Mise en évidence de la présence d'oxydase par les souches <i>P.aeruginosa</i> (+) et <i>S. aureus</i> (-).....	40
Photo personnelle 08: Identification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par la galerie API20 E...40	
Photo personnelle 09 : Identification de <i>Staphylococcus aureus</i> par la galerie API staph...41	
Photo personnelle 10: Production de slime chez les souches isolées sur milieu rouge congo.....	43
Photo personnelle 11 : Formation de biofilm par la technique TCP.....	44

Liste des tableaux :

Tableau 01 : Prévalence des infections nosocomiales par pays.....	4
Tableau 02 : Caractères distinctifs de <i>Staphylococcus aureus</i>	11
Tableau 03 : Tests biochimiques des deux biotypes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
Tableau 04 : Résultats Tests biochimiques du <i>S.aureus</i> , biotype 6336153.....	42
Tableau 05. Résultats de la production de slime par la méthode RCA.....	43
Tableau06 : Résultats de TCP sans supplément (2% saccharose).....	44
Tableau 07 : Résultats de TCP avec supplément (2% saccharose).....	46
Tableau 09 : Optimisation de la production de slime par la méthode TCP.....	48

Table de matière :

Liste des abréviations.....	I
Listes des figures	II
Liste des photos	III
Liste des tableaux.....	IV
Synthèse bibliographique	
Introduction.....	1
Chapitre I : Généralités sur les infections nosocomiales	3
1. Les infections nosocomiales.....	3
1.1. Définition	3
1.2. Fréquence et incidence.....	4
1.3. L'origine des infections nosocomiales.....	5
1.4. Facteurs étiologiques des infections nosocomiales.....	5
1.4.2. Infection endogène ou auto-infection.....	6
Chapitre II : Etude de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>.....	7
1. L'espèce <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.1. Caractères morphologiques.....	7
1.2. Caractères culturels.....	8
1.3. Pouvoir pathogène chez l'homme.....	8
1.4. Formation de biofilm par <i>P. aeruginosa</i>	8
2. L'espèce <i>Staphylococcus aureus</i>	9
2.1. Morphologie.....	9
2.2. Caractères culturels.....	10
2.3. Caractères physiologiques et biochimiques.....	10
2.4. Pouvoir pathogène de <i>S. aureus</i>	11
2.5. La formation de biofilm par <i>S. aureus</i>	12
Chapitre III : Formation de biofilm.....	13
1.1. Historique.....	13
1.2. Définition.....	13
1.3. Etapes de formation des biofilms	14
1.3.1. L'adhérence réversible.....	14
1.3.2. L'adhérence irréversible.....	14
1.3.3. Le développement précoce du biofilm.....	14
1.3.4. La maturation du biofilm.....	14
1.3.5. Le détachement de bactéries.....	15
1.4. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm.....	16
1.4.1. Caractéristiques de la surface.....	16
1.4.1.1. Rugosité de la surface.....	16
1.4.1.2. Propriétés physico-chimiques de la surface.....	17
1.4.1.3. Présence de films protéiques sur la surface.....	17

1.4.2. Caractéristiques du milieu.....	17
1.4.6. Propriétés des cellules.....	18
2. Biofilm dans le secteur médical.....	19
3. Régulation de la formation de biofilm.....	19
3.1. Les molécules impliquées dans le quorum sensing.....	19
3.2. Rôle du <i>quorum sensing</i>	19
3.3. Altération du <i>quorum sensing</i>	20
4. Rôle de biofilm dans la persistance bactérienne.....	20
Chapitre IV : La prévention des infections nosocomiales.....	21
1. Respect des règles d'hygiène et d'asepsie.....	21
1.1 Hygiène des mains.....	21
1.2. Traitement physico-chimique.....	21
1.3. Traitement par incorporation d'agents antimicrobien.....	22
1.5. Les nouveaux axes de recherche.....	23
Matériel et méthodes	
1. Lieu d'étude.....	24
2. Prélèvement.....	24
2.1. Lieux de prélèvement.....	24
2.2. Méthodes de prélèvement.....	24
3. Matériel.....	24
4. L'enrichissement.....	26
5. Isolement et purification.....	26
6. Identification.....	26
8. Les techniques d'évaluation de la formation de biofilm <i>in vitro</i>	29
8.1. La méthode du Rouge Congo Agar.....	29
8.2. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP).....	30
Résultats et discussion	
1. Prélèvement.....	34
1.1. Fréquence de prélèvements.....	34
1.2. Répartition des souches selon le site de prélèvement.....	35
2. Identification des souches isolées.....	37
4. Evaluation de la formation de biofilm.....	42
Conclusion.....	49
Références bibliographiques.....	50
Annexe.....	61

Introduction

Introduction :

L'hôpital est un lieu où l'on traite mais c'est également un lieu où le risque d'infection est très important et où les germes deviennent de plus en plus résistants. De ce fait, les infections contractées au niveau de l'hôpital sont reconnues comme des problèmes majeurs de santé publique de par leur fréquence, leur coût et leur gravité qui touche aussi bien les patients et leurs entourages que l'ensemble des professionnels de santé.

À l'hôpital, les surfaces susceptibles d'entrer en contact avec le patient soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire de dispositifs médicaux ou les mains des personnes peuvent constituer des réservoirs microbiens. Ces surfaces sont régulièrement colonisées par des microorganismes qui sont d'origines diverses et peuvent être issus de patients, du personnel soignant ou des visiteurs. Elles constitueraient donc une niche écologique de bactéries multirésistantes pouvant être un réservoir à partir duquel différentes infections peuvent se développer (**Méité et al., 2010**).

La plupart des micro-organismes (bactéries et champignons) dans la nature favorisent un mode de vie en communautés où se trouvent fixées sur un support plutôt que libre et isolées dans le milieu environnemental.

L'attachement sur une surface est une « stratégie de survie » qui permet à la bactérie de s'installer et de coloniser un environnement.

L'état planctonique (libre) pourrait se réduire au passage de la bactérie d'une surface à l'autre. Après attachement sur un support, les bactéries vont mettre en place et développer une communauté organisée à laquelle William Costerton a donné le nom de « biofilm » (**Fillox et Vallet, 2003**).

Les biofilms bactériens jouent un rôle majeur dans plus de 80% des infections (**National Institutes of Health, 2007**)

Les deux souches *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* constituent l'une des causes majeures des infections communautaires et nosocomiales. Ces germes sont responsables des infections aiguës et chroniques dont la plupart sont dues à leurs capacité à adhérer sur des surfaces abiotiques telles que les implants médicaux et à former un biofilm. D'après le Center for Disease Control and Prevention (CDC), 65% des infections bactériennes sont dues à la présence des biofilms. En outre, les infections associées aux biofilms constituent un problème majeur en clinique et sont la cause de l'augmentation de la mortalité et du coût de traitement.

Introduction générale

C'est dans cette optique que nous envisageons dans ce présent travail, d'étudier la mise en évidence de la présence de *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* dans les surfaces hospitalières et de vérifier la capacité de formation de biofilm par les deux souches isolées de différents sites de bloc opératoire des deux services (EHS, urgence)

Notre travail est divisé en trois parties

- Prélèvements.
- Isolement et identification des souches cliniques.
- Evaluation de la formation de biofilm par deux méthodes (RCA, TCP).

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les infections nosocomiales :

1. Les infections nosocomiales :

1.1. Définition :

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

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

Pour les infections du site opératoire, on considère comme nosocomiales les infections survenues dans les 30 jours suivant l'intervention, ou, s'il y a mise en place d'une prothèse ou d'un implant, dans l'année qui suit l'intervention.

Donc, se sont des infections contractées dans un établissement de santé. Cette définition est devenue moins adaptée aux pratiques de soins actuelles où, initialement, le critère discriminant était le lieu d'acquisition de l'infection. Elle a donc été actualisée en 2006 et a été intégrée de façon plus générale au sein des infections associées aux soins (**Raisin, 2009**)

Une infection est dite associée aux soins si elle survient au cours ou au décours d'une prise en charge (diagnostique, thérapeutique, palliative, préventive ou éducative) d'un patient, et si elle n'était ni présente, ni en incubation au début de la prise en charge (**Jean, 2002**).

Les infections liées aux soins sont contractées à l'occasion d'un acte médical. Elles génèrent un coût économique et humain considérable. Les identifier, connaître leur mode de transmission est un préalable indispensable

1.2. Fréquence et incidence :

La fréquence globale des infections nosocomiales (IN), mesurées par des études internationales, varie entre 5 et 10% des hospitalisés (**Vincent et al., 2008**).

Actuellement, l'OMS estime que plus de 1,4 million de personnes dans le monde souffrent d'infections nosocomiales, en permanence. Dans les pays développés, qui disposent d'hôpitaux modernes, entre 5 à 10 % des patients admis contractent une ou plusieurs infections. Un taux qui dépasse parfois 25 % dans les pays en développement (**Motaouakkil et Aalloula., 2011**).

L'European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) estime ainsi que 4 131 000 patients en Europe ont développé une IN en 2008, pour un total de 4 544 100 épisodes infectieux.

Aux Etats Unis d'Amérique (USA), c'était 1,7 million de patients touchés en 2002. Dans les pays en voie de développement (PED), la prévalence des IN est plus élevée, puisque c'est 10 à 15% des patients hospitalisés qui sont concernés (**Monnet, 2011**).

En Algérie, et d'après le ministre de la Santé, **M.Ould Abbès (2012)**, les différentes enquêtes réalisées au niveau des structures de santé sur les infections nosocomiales donnent un taux de prévalence national de 12 et 15 %.

Tableau 01 : prévalence des infections nosocomiales par pays (**Rossello et al., 2010**).

Pays	Patients infectés		Infections		Taux de prévalence ^a par hôpital (%)
	Nbre	Taux % (IC ₉₅ %)	Nbre	Taux (%)	min-max
Algérie	103	6,3 (5,2-7,6)	127	7,9	2,1-13,0
Égypte	114	9,9 (8,3-11,8)	125	10,9	0,0-30,2
Italie	44	11,9 (8,8-15,6)	53	14,3	5,4-15,3
Maroc	18	6,7 (4,0-10,4)	18	6,7	0,0-24,7
Tunisie	134	11,0 (9,3-12,9)	160	13,2	6,8-14,9
Total	413	8,9 (8,1-9,8)	483	10,5	0,0-30,2

Les infections nosocomiales représentent un taux maximal de prévalence en Egypte et en Maroc plus élevé que les autres pays avec un nombre important des patients infectés (**Rossello et al., 2010**).

1.3. L'origine des infections nosocomiales :

L'origine principale de ces infections est le manque de pratiques d'hygiène. En effet, Il a été montré récemment que la cause majeure de transmission des bactéries était d'une part, le manque d'hygiène (absence de lavage des mains...) et d'autre part les progrès de la médecine et de la chirurgie avec par exemple des soins et des thérapeutiques de plus en plus agressifs qui peuvent être des sources possibles d'infection (**Belhaj Soulami, 2010**).

Ces infections peuvent être directement liées aux soins dispensés au patient (par exemple l'infection sur cathéter) ou simplement survenir lors de l'hospitalisation, indépendamment de tout acte médical (par exemple une épidémie de grippe). Il existe plusieurs types d'infections nosocomiales relevant de modes de transmission différents :

• **Les infections d'origine "endogène"** : le malade s'infecte avec ses propres micro-organismes, à la faveur d'un acte invasif et/ou en raison d'une fragilité particulière (**Ministère de la santé, 2010**).

• **Les infections d'origine "exogène"** : les micro-organismes ont pour origine les autres malades (transmission croisée entre malades ou par les mains ou matériels des personnels), les personnels ou la contamination de l'environnement hospitalier (eau, air, équipements, alimentation ...) (**Ministère de la santé, 2010**).

1.4. Facteurs étiologiques des infections nosocomiales :

Le réservoir d'un micro-organisme est défini comme le lieu habituel et permanent où un Micro-organisme persiste et se multiplie (**Lasheras et Monnin, 2008**).

1.4.1. Les infections exogènes ou infections croisées :

La transmission des infections exogènes fait intervenir des sources de contamination ou réservoir de germes. Ces réservoirs de germes sont représentés par des éléments inanimés contaminés (objet, air, surface, aliments, etc...), ou par des êtres humains (le personnel, les visiteurs et les malades eux-mêmes) (**Faure, 2002**).

Il existe quatre modes de transmission exogène :

- Par contact :

Flore cutanée résidente ou transitoire présente sur les mains des soignants colonise ou infecte les patients.

Mais il n'y a pas que les mains ! Il y a aussi

- La tenue vestimentaire des soignants
- La flore de l'environnement :

-Plaie ouverte en contact avec des surfaces contaminées

-Flore des autres patients déposée sur des surfaces

- L'entourage direct du patient peut-être en cause (**Lasheras et Monnin, 2008**).

- Par gouttelette ou droplet (>5 µ) :

Ce sont des sécrétions du rhino-pharynx ou du tractus respiratoire, la source est alors proche du patient.

- Par voie aérienne par droplet nuclei (<5 µ) :

Il s'agit de microorganismes sur support de poussière ou de cellules squameuses, la source peut être distante du patient (**Vincent et al ., 2008**). .

- Par dispositifs médicaux, produits biologiques, aliments :

Dans ce cas il n'y a pas nécessité de multiplication des micro-organismes sur le support pour que le risque de transmission existe (**Vincent et al ., 2008**).

1.4.2. Infection endogène ou auto-infection :

La flore résidente constitue une véritable barrière bactérienne renforçant les défenses immunitaires de l'individu en le protégeant contre des germes potentiellement pathogènes.

L'hospitalisation entraîne une modification de la flore habituelle du patient au bout de 5 jours d'hospitalisation (**Vincent et al ., 2008**).

Certains gestes invasifs peuvent déplacer des germes d'un endroit où ils sont inoffensifs vers un autre où ils se multiplient différemment et deviennent pathogènes (**Vincent et al ., 2008**).

• Infections nosocomiales sur dispositifs médicaux :

Est définis comme tout instrument, appareil accessoire, machine, outil, implant, réactif ou agent d'étalonnage in vitro, logiciel, matériel, ou autre article similaire ou apparenté dont l'action principale voulue, sur ou dans le corps humain, n'est pas obtenue par des moyens exclusivement pharmacologiques, immunologiques ou métaboliques, et qui est destiné(e) à être utilisé(e) chez l'homme à des fins médicales Sont des infections dont le mode de transmission est toujours lié aux pratiques incorrectes de : Retraitement des dispositifs médicaux (DMx) après utilisation, Stockage après retraitement (lieu, matériel, conditions,...), Manipulation des DMx y compris au moment de leur utilisation (ne tenant pas compte des pratiques aseptiques) et Contact direct ou indirect avec un environnement contaminate (**Ramiro, 2006**).

Chapitre II : Etude de *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* :

La colonisation de surfaces médicales par des microorganismes est un événement fréquent, potentiellement à l'origine de la survenue ultérieure de pathologies infectieuses. Ces microorganismes proviennent essentiellement des flores des patients ou de leur environnement, et sont associés dans un certain nombre de cas à des épisodes infectieux. La caractérisation des microorganismes ainsi fixés sous forme de biofilms (Lewis, 2010).

1. L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* :

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

Ainsi, la principale source de contamination des patients hospitalisés est donc leur flore endogène mais l'environnement est également incriminé (Talon *et al.*, 1995; Bergmans *et al.*, 1998; Minchella *et al.*, 2010). La transmission croisée est le plus souvent manuportée par le personnel soignant, soit directement de patient à patient, soit indirectement à partir de surfaces inertes préalablement contaminées (Talon *et al.*, 1995; Bergmans *et al.*, 1998; Lister *et al.*, 2009).

1.1. Caractères morphologiques :

Ce sont des bacilles fins à Gram - ($0.5 \times 3 \mu\text{m}$), non capsulés, mobiles, son extrême mobilité est dû à une ciliature polaire en général monotriche, gram négative, il possède souvent des granulations plus fortement colorées (Hafiane et Ravaoarino, 2008)



Figure 01 : Aspect de *P.aeruginosa* en microscopie électronique (X 20000)
<http://www.futura-sciences.com/fr/news/t/medecine/>

1.2. Caractères culturels :

Pas d'exigence nutritive particulière : la pousse est possible sur des milieux non enrichis.

L'isolement à partir de prélèvements plurimicrobiens peut être facilité par l'utilisation de milieux sélectifs disponibles dans le commerce ou par l'incubation des milieux à 41°C (Lilet *et al*, 1983).

Certaines souches peuvent présenter des caractères différents : leurs colonies sont non pigmentées ou être colorées en brun ou en rouge (dû à la production de pyomélanine ou pyorubrine). Certaines souches se caractérisent par leur aspect mucoïde (souches isolées dans certaines pathologies chroniques : mucoviscidose, dilatation des bronches). D'autres souches peuvent apparaître sous forme de colonies naines et sont plus difficiles à cultiver (Amazian *et al.*, 2010).

1.3. Pouvoir pathogène chez l'homme :

P. aeruginosa est une espèce classée dans les pathogènes opportunistes. Les infections pourront avoir une origine endogène ou exogène (Henri leclerc, 2002). C'est un agent pathogène opportuniste essentiellement responsable d'infections nosocomiales. Une enquête méditerranéenne de prévalence en 2010, le classe comme étant le troisième principal agent des infections nosocomiales, juste après *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Amazian *et al.*, 2010).

Dans les infections communautaires, elle est responsable principalement de broncho-pneumopathies évoluant sur un mode chronique dans la mucoviscidose et les affections respiratoires dues à la dilatation des bronches ; d'otites externes, d'endophtalmies après traumatisme, d'infections cutanées dans les ulcères (Japoni *et al.*, 2009).

Dans les infections nosocomiales, elle est impliquée dans les pneumopathies chez les malades sous respirateur, les infections urinaires chez les malades sondés, les infections cutanées secondaires à des brûlures, les infections ostéo-articulaires sur matériel (Fuentefria *et al.*, 2011).

1.4. Formation de biofilm par *P. aeruginosa* :

Les biofilms formés par *P. aeruginosa* sont caractérisés par un complexe bactérien, très structuré. Ils sont initiés par l'attachement d'une cellule planctonique unique sur une surface (Vallet *et al.*, 2001).

La capacité de *P. aeruginosa* à former un biofilm lui confère plusieurs caractéristiques importantes, dont une augmentation importante de la résistance aux antibiotiques (**Brooun et al., 2000**), ainsi que aux mécanismes de défense de l'hôte et par conséquent sont difficiles à éradiquer. Les biofilms contribuent vers la pathogénicité de *P. aeruginosa* et conduisent souvent à des infections persistantes et récurrentes. La croissance de *P. aeruginosa* commence sous la forme de microcolonies, qui fusionnent ensuite pour former des biofilms (**Mittal et al., 2009**).

2. L'espèce *Staphylococcus aureus* :

2.1. Morphologie :

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif de forme sphérique de 0,5 à 1,5 μ de diamètre; ce n'est qu'au cours de la lyse ou de la dégénérescence (veilles cellules), que parfois les cellules perdent leur affinité tinctoriale et peuvent devenir à Gram variable (**El Kouir, 2003**)

Ainsi, ils sont immobiles, non sporulés, ne possédant pas de capsule visible au microscope optique sauf pour de très rares souches, d'autres forment des colonies mucoïdes et sont entourées d'une pseudocapsule (**Couture, 1990**).

Sur les cultures en milieu solide, ils se disposent en amas irréguliers polyédriques, évoquant l'aspect caractéristique de "grappes de raisin" (**Fauchere J.L., 2002**). Alors qu'en milieu liquide, ils sont souvent isolés, en diplocoques, en tétrades ou en très courtes chaînettes (en générale de 3 à 5 éléments) (**Couture, 1990**).

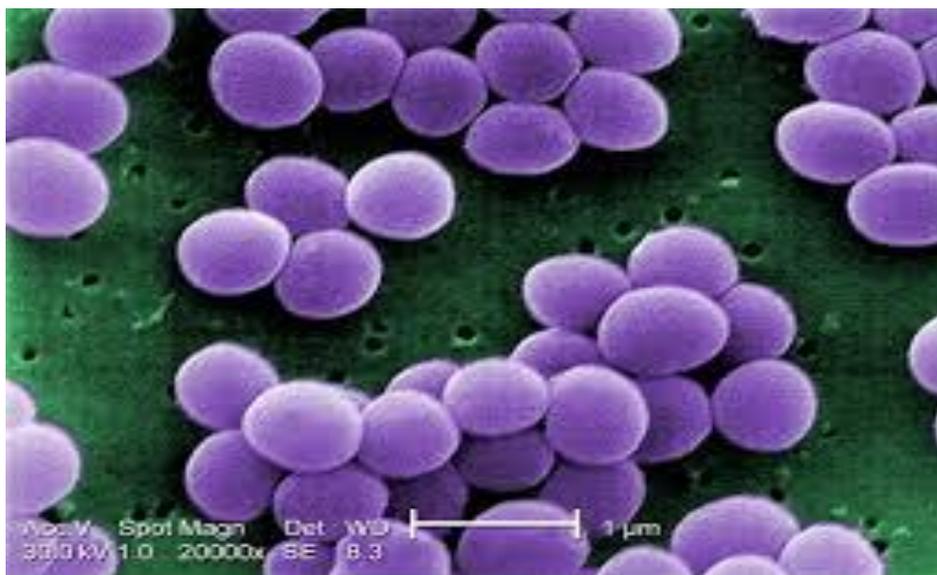


Figure 02 : Aspect de *S. aureus* en microscopie électronique (X 20000)

<http://www.futura-sciences.com/fr/news/t/medecine/>

2.2. Caractères culturels :

Peu exigeants sur le plan nutritif, les staphylocoques sont aérobies anaérobies facultatifs (quelques souches exigent le CO₂ pour croître), et croissent bien sur les milieux usuels simples, de même que sur la plupart des milieux qui favorisent la croissance des bactéries à Gram positif. Certains facteurs de croissance sont indispensables (Vitamine B1, acide nicotinique) mais ils n'exigent pas de biotine ni de tryptophane, ils poussent en milieu synthétique contenant des sels, du glucose et un de quatorze acides aminés dont la cystéine, la thiamine et l'acide nicotinique. La température optimale de croissance est de 37°C et le pH optimal est de 7.5, mais de grandes variations sont tolérées (Couture, 1990).

En bouillon, la culture est rapide, en quelques heures un trouble homogène puis un dépôt sont observés, il n'y a pas de production de pigment en milieu liquide (Kloos et al., 1975).

Le milieu de Chapman est particulièrement utilisé, il ne laisse croître au bout de 24 à 48 heures que les staphylocoques, germes halophiles qui tolèrent des concentrations élevées de NaCl jusqu'à 7,5% (qui inhibe pour cette raison, la plupart des autres germes), ce milieu sélectif rendu différentiel par l'addition de Mannitol à 1% et d'un indicateur d'acidité, le rouge de phénol, permet à la fois d'isoler le staphylocoque à partir d'un prélèvement contenant un mélange de germes et nous oriente vers un *S. aureus* ou un *S. epidermidis* (Kloos et al.,1990).

2.3. Caractères physiologiques et biochimiques :

Toutes les souches produisent une catalase mais pas d'oxydase. Ainsi, les souches de *S. aureus* sont: indole -, acétone +, uréase +, réduisant le téllurite de potassium et les nitrates en nitrites, et produisant de l'ammoniaque à partir de l'arginine (Kloos et al., 1990).

De plus, la plupart des souches de *S. aureus* contrairement aux autres espèces produisent de l'hémolyse bêta, caractéristique utile lorsqu'on cherche à identifier un staphylocoque (Couture, 1990).

S. aureus possède également un équipement enzymatique lui permettant de métaboliser de nombreux et divers substrats glucidiques, protéiques et lipidiques (Ferron, 1984).

Le métabolisme glucidique est particulièrement intéressant. La plupart des sucres sont fermentés; (glucose, saccharose, lévulose, lactose et mannitol), le glucose est utilisé en anaérobiose et aérobie ainsi que le mannitol. L'utilisation du mannitol est une indication importante parce que ce polyalcool est fermenté par *S. aureus* et *S. epidermidis* (Fauchere, 2002 ;Fasquelle,1974).

Cependant, la production de pigments (caractères cultureux), d'hémolyse et la dégradation du mannitol n'ont pas toujours lieu; ce sont des indices auxquels on ne peut se fier pour identifier le germe de façon certaine. Il faut donc procéder à son identification par l'étude de différentes propriétés biologiques et biochimiques (**Fauchere, 2002**).

Ce qui caractérise mieux l'espèce *S. aureus*, c'est la production d'une staphylocoagulase (Tableau 2) (**Fauchere, 2002**). Cependant, certaines souches de *S. aureus* peuvent ne pas produire de coagulase libre en raison d'une mutation. Ainsi, une DNase thermostable permet de déterminer si le germe isolé est un *S. aureus* (**Couture, 1990**).

Tableau 02 : Caractères distinctifs de *Staphylococcus aureus* (**Fauchere, 2002**).

Espèce <i>S. aureus</i>		Autres espèces de staphylocoques
Aspects des colonies	Pigment doré	Blanches
Milieu de Chapman	Acidification du mannitol (jaune)	Pas d'acidification du mannitol (rouge) sauf <i>S. epidermidis</i>
Staphylo-coagulase	Positive	Négative

2.4. Pouvoir pathogène de *S. aureus* :

S. aureus est responsable de nombreux types d'infections chez l'homme et compte parmi les agents pathogènes les plus souvent isolés des infections nosocomiales et communautaires (**Vincenot et al., 2008; Kurlenda et Grinholc, 2012; Otto, 2012**). Les infections suppuratives superficielles cutanéomuqueuses tels les furoncles, les folliculites, les impétigos, les sinusites et les otites sont les plus couramment rencontrées. Ces infections peuvent se compliquer par une diffusion hématogène de la bactérie ou par une extension locorégionale de l'infection.

S. aureus est aussi responsable de méningites, des infections respiratoires et urinaires. Des infections non suppuratives d'origine toxique appelées toxémies staphylococciques sont, elles, dues à la diffusion de toxines à partir d'un foyer infectieux ou à l'ingestion d'une toxine préformée dans un aliment contaminé. Ces toxémies regroupent les syndromes cutanés staphylococciques par les exfoliatines, le choc toxique staphylococcique et les intoxications alimentaires par les entérotoxines (**Foster, 1996; Harris et al., 2002**). En plus des infections

aiguës, *S. aureus* peut provoquer des infections chroniques. La plupart d'entre elles sont dues à la capacité de ce pathogène à adhérer sur les implants médicaux temporaires (ex: cathéters) ou permanents (ex: prothèses orthopédiques, valves cardiaques) et à former un biofilm (von Eiff *et al.*, 2005; Harris et Richards, 2006; Bernard, 2006).

2.5. La formation de biofilm par *S. aureus* :

La formation d'un biofilm de *S. aureus* est un processus qui se déroule en deux phases. La première phase consiste en l'attachement initial des cellules sur une surface, et la seconde à la multiplication et à la formation d'une communauté structurée, mature et multicouche des cellules bactériennes. Ces deux phases sont physiologiquement différentes l'une de l'autre et requièrent chacune des facteurs spécifiques. Le détachement de cellules du biofilm mature permet la dissémination des bactéries et la colonisation de nouveaux sites d'infection chez l'homme (Otto, 2008).

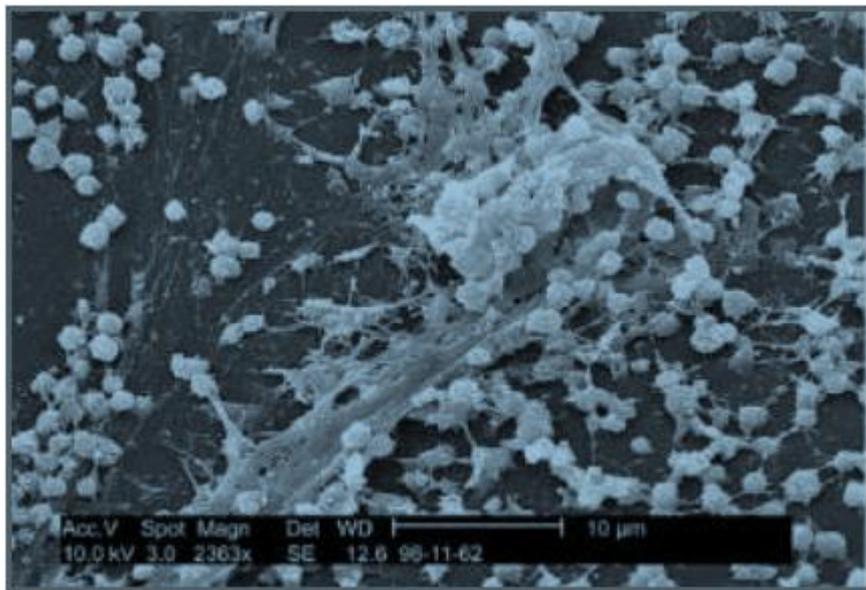


Figure 03: Image obtenue par microscopie, image confocale d'un biofilm formé par *Staphylococcus spp.* à la surface d'un cathéter veineux (Centers for Disease Control and Prevention, 2009).

Chapitre III : Formation de biofilm :

1.1. Historique :

On attribue la découverte des biofilms à l'inventeur du microscope Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723) ; qui observa vers 1683 avec cet appareil des communautés de microorganismes au niveau de ses dents (**Donlan, 2002**).

En 1932 ; **Henerici** observa des communautés bactériennes fixées sur ces lames lors l'expérience visant à observer la croissance des algues sur des lames de verre placées dans un aquarium. Il a été dérivé l'hypothèse que la plupart des bactéries vivant en milieu aqueux ne sont pas sous la forme planctonique, mais plutôt elles sont organisées sous forme de communautés sessiles fixées à une surface (**Henerici, 1932; Trautner et al., 2009**).

Le terme « biofilm » a été utilisé pour la première fois par Zobell en 1943 **Figure 1 :**

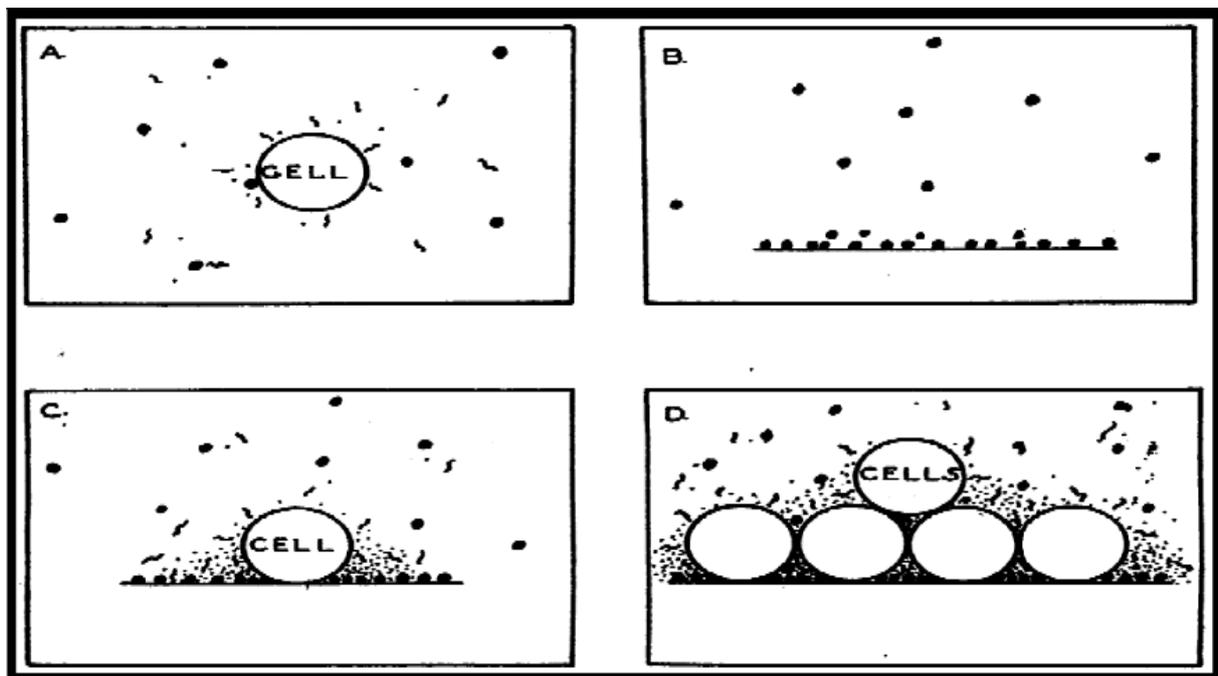


Figure 04 : Schématisation de biofilm par Zobell, 1943

1.2. Définition :

Le biofilm est une communauté structurée de micro-organismes, se fixant à une surface inerte ou vivante et réunis au sein d'une matrice d'exo-polysaccharides (**Jain et al., 2011**) adhésive et protectrice qu'ils secrètent. C'est une structure vivante en perpétuel remaniement. Il constitue le mode de vie majoritaire des micro-organismes, par opposition à l'état planctonique, libre et isolé dans l'environnement (**Espinasse et al., 2010 ; Van houdt et**

Michiels,2005).Un biofilm peut être constitué d'une ou plusieurs espèces de micro-organismes (**Behlau et Gilmore,2008**).

1.3. Etapes de formation des biofilms :

Les bactéries semblent initier la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale (**Annous et al. 2009**), telle que le manque d'oxygène et de nutriments ou la présence d'un traitement (**Vu et al., 2009**).

Les biofilms peuvent se développer sur une grande variété de surfaces incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, ou tout autre support retrouvé dans le sol ou dans les milieux aquatiques. On distingue généralement cinq étapes de formation de biofilm (figure) (**Talaro, 2008**).

1.3.1. L'adhérence réversible :

En milieu liquide ou exposé à l'humidité, les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide (**Høiby et al. 2011**) par mouvement brownien, par sédimentation ou par mobilité active (présence de flagelles). Elles s'y attachent de manière réversible des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques. Cette étape est influencée par des conditions environnementales impliquant le pH, l'osmolarité, la température, la concentration en oxygène et en nutriments et l'hydrodynamique de fluide (**Beloin et al.,2008**).

L'adhérence des bactéries est également influencée par la nature de la surface, notamment sa rugosité et son hydrophobicité. Les bactéries adhèrent facilement sur une surface rugueuse, hydrophobe et non polaire (**Beloin et al., 2008**).

1.3.2. L'adhérence irréversible :

La fixation à la surface solide devient irréversible en raison de la production d'exopolysaccharides par les bactéries (**Høiby, 2011**) et surtout grâce à des structures d'adhérence variables selon les espèces bactériennes, par exemple les fimbriae et les curli pour *E.coli*, qui interagissent avec des récepteurs spécifiques présents sur la surface (**Beloin et al., 2008**).

1.3.3. Le développement précoce du biofilm :

Les bactéries se multiplient lentement et continuent de produire des exopolysaccharides. Elles s'agrègent entre elles et forment des microcolonies, qui sont protégées par la matrice exopolysaccharidique (**Jacolsen et al., 2008**).

1.3.4. La maturation du biofilm :

L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation de canaux aqueux et de pores entre les microcolonies (**Folkesson et al. , 2008**), permettant l'acheminement

d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance de micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets (**Tenke et al., 2006**). La production et la sécrétion d'enzymes ou de toxines provoque la dégradation des résidus présents dans les surfaces environnantes et permet ainsi la libération de nutriments (**Jacolosen et al., 2008**).

1.3.5. Le détachement de bactéries :

Pour que la densité bactérienne sur une surface peut atteindre 10^7 Un biofilm est approximativement constitué de 85% de matrice extracellulaire et de 15% de micro-organismes (**Bahlau et Gilmore, 2008**). La matrice extracellulaire est principalement constituée d'eau (97%) et incluse également des polymères d'exo-polysaccharides, de protéines, des phospholipides, des nutriments et des métabolites. Cette matrice a un rôle protecteur et un rôle structurel (**Beloin et al., 2008**).

Les bactéries acquièrent un mode de croissance, une physiologie et un métabolisme différent des bactéries planctoniques. Ces changements phénotypiques résultent d'une révolution du profil d'expression de leurs gènes. Toutes ces transformations sont coordonnées grâce à un système de communication entre les bactéries d'une même espèce au sein du biofilm, appelé *quorum sensing* (**Behlau et Gilmore, 2008**). Ce système est fondé sur la production de molécules diffusibles par les bactéries, par exemples les acyl-homoserine lactones chez les bactéries à Gram négatif, qui donnent une indication de la densité cellulaire dans un environnement donné (**Filloux et Vallet, 2003**).

Les biofilms matures possèdent une structure tridimensionnelle avec plusieurs microenvironnements différents qui évoluent selon l'osmolarité, le pH et la densité cellulaire.

Du fait de cette hétérogénéité, l'état métabolique d'une bactéries diffère selon sa localisation : il existe une variété de phénotypes bactériens au sein de biofilm.

Les contacts rapprochés entre les micro-organismes favorisent le transfert horizontal de matériel génétique. Ce phénomène pourrait notamment faciliter la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques (**Trautner et Darouiche, 2004**).

cellules/cm², des bactéries se détachent du biofilm et se dispersent dans le milieu environnant après un retour à l'état planctonique. Traditionnellement, le détachement de bactéries est considéré comme un phénomène passif, dépendant notamment des forces du flux du milieu dans lequel le biofilm se trouve. Cependant, le détachement de bactéries peut aussi être une stratégie active, initiée par les bactéries elles mêmes, leur permettant de coloniser de nouvelles surfaces et de survivre lorsque l'espace et les nutriments deviennent limités. Les bactéries peuvent se détacher seules ou par petits ou gros amas selon les mécanismes

impliqués (Kaplan, 2010). Comme pour les autres étapes, le détachement de bactéries est un processus complexe qui implique des signaux environnementaux et une communication entre les bactéries (Joshi *et al.*, 2010).

Ainsi un biofilm établi constitue un réservoir de bactéries viables, capables d'aller coloniser d'autres surfaces (Joshi *et al.*, 2010).

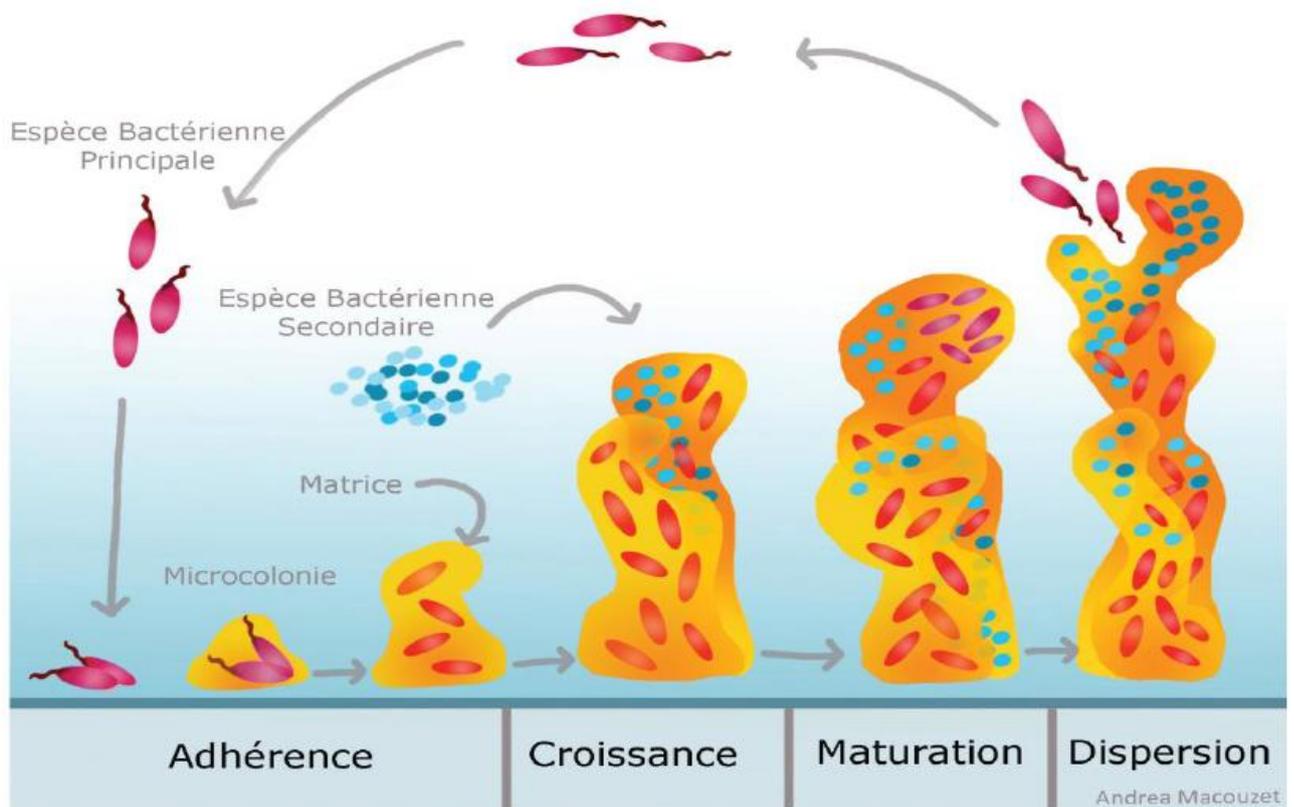


Figure 05 : Schéma présentant les étapes du développement du biofilm (Yannick *et al.*, 2014).

1.4. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs : caractéristiques du substrat sur lequel les bactéries vont se fixer, forces s'exerçant dans le milieu aqueux (hydrodynamique du fluide), caractéristiques du milieu et propriétés de la surface des cellules (Donlan, 2002).

1.4.1. Caractéristiques de la surface

N'importe quel matériau en contact avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm. La rugosité, les propriétés chimiques d'une surface et la présence préalable de films protéiques influent sur l'attachement des bactéries à cette surface et à la formation d'un biofilm (De Chalvet et De Rochemonteix, 2009).

1.4.1.1. Rugosité de la surface :

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des microcolonies est importante (**Characklis, 1990**). Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'aspérités (**Donlan, 2002**). Néanmoins, certaines souches sauvages de bactéries colonisent aussi des surfaces lisses. Les biofilms auront ainsi tendance à se former au niveau des aspérités des matériaux, formant des recoins propices aux proliférations bactériennes et moins sensibles aux agents désinfectants ou antiseptiques (**Donlan et Costerton, 2002**).

1.4.1.2. Propriétés physico-chimiques de la surface :

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

1.4.1.3. Présence de films protéiques sur la surface :

La présence de polymères sur un matériau modifie les propriétés physico-chimiques de sa surface, et a une influence directe sur l'attachement de bactéries à cette dernière. En effet, la présence préalable sur un biomatériau d'un film protéique comme le sang, les larmes, l'urine, la salive, le liquide interstitiel et les sécrétions respiratoires influence l'attachement de bactéries à sa surface, et favorise la formation de biofilms (**Nobbs, 2009**).

1.4.2. Caractéristiques du milieu :

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessitent des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux clefs (**O'Toole et al., 2000; Donlan, 2002 ; Martinez, 2007 ; Goller, 2008**):

a. La température : est importante non seulement parce qu'elle affecte l'activité métabolique et enzymatique des bactéries, mais aussi parce qu'elle influence certains paramètres physicochimiques (pH, activité ionique, agitation thermique et solubilité des gaz) ainsi que les propriétés de surface des microorganismes. La température de croissance peut avoir un effet significatif sur la mobilité cellulaire et la production de flagelles et, ainsi sur l'adhésion (**Dumas, 2007**).

b. Le pH : du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides suite au déplacement des équilibres d'ionisation (protonation/déprotonation) des groupements fonctionnels exposés selon leur pKa (**Hamadi et al., 2004**) ce qui peut avoir comme conséquence une réduction ou une augmentation des interactions électrostatiques répulsives défavorables à l'adhésion (**Boutaleb, 2007**).

c. Concentration en oxygène, concentration en fer, osmolarité, présence d'ions spécifiques.

d. Sources de carbone disponibles : elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation (**Martinez, 2007**).

e. Concentrations en nutriments : dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm ; ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique (**Spormann, 2008**).

f. Concentrations en certains cations : l'augmentation de la concentration de plusieurs cations (sodium Na⁺, Calcium Ca²⁺, ion ferrique Fe³⁺) influence l'attachement de *Pseudomonas fluorescens* sur des surfaces en verre, en réduisant les forces répulsives s'exerçant entre les bactéries chargées négativement et la surface de verre (**Fletcher, 1988**).

g. Hydrodynamique du fluide : selon la position du matériau dans un fluide, il sera plus ou moins exposé à des turbulences. La zone de moindres turbulences, à l'écart des flux laminaires, est appelée zone de fixation. C'est précisément dans cette zone qu'il est plus facile pour les micro-organismes de se fixer sur une surface, puisqu'ils sont moins soumis aux forces exercées par le fluide (**Donlan, 2002**).

1.4.6. Propriétés des cellules :

L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de fimbriae et de flagelles, et la production d'exopolysaccharides influencent l'attachement des bactéries sur une surface. L'hydrophobicité d'une surface est importante dans l'adhésion des micro-organismes à cette dernière. Moins les matériaux sont polarisés, plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes (**Donlan, 2002**).

La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Plusieurs éléments structuraux des bactéries interviennent dans leur attachement à une surface : flagelles, fimbriae, polysaccharides. Il peut y avoir des compétitions ou des coopérations entre cellules lorsque plusieurs espèces de bactéries sont

concernées. Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les fimbriae, certaines protéines, et les acides mycoliques (composants de certaines bactéries Gram positives) semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes. Les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles (**Donlan, 2002**).

La synthèse de fimbriae de type I par des bactéries est un processus complexe gouverné par les statuts nutritionnels des cellules (stimulation de la synthèse si déficit carboné ou en acides aminés chez les souches uropathogènes d'*Escherichia coli*) et par les conditions environnementales (pas de synthèse si pH bas ou température basse). L'expression des curli est sous le contrôle de cascades de phosphorylation. Les conditions environnementales répriment ou stimulent l'expression de gènes codant pour des caractères de motilité. La synthèse de curli est stimulée dans les conditions environnementales suivantes : faible osmolarité, basse température, faible disponibilité du milieu en azote, phosphate, fer et croissance ralentie (**Goller, 2008**).

2. Biofilm dans le secteur médical :

Parallèlement à la colonisation des muqueuses, l'implantation de bactéries sur des surfaces inertes représente également une source de contamination majeure pour les patients en milieu hospitalier. Les bactéries, dites sessiles peuvent alors former des tapis microbiens désignés sous le terme de biofilms (**Costerton et al., 1978**).

La compréhension des mécanismes de formation des biofilms présente donc un intérêt inéluctable, dans la mesure où elle permettrait de développer des stratégies curatives ou préventives afin de prévenir la multiplication et la persistance de ces pathogènes potentiels (**Balestrino, 2006**).

3. Régulation de la formation de biofilm :

3.1. Les molécules impliquées dans le quorum sensing :

Les molécules du quorum sensing sont différentes selon les types de bactéries (**Irie et Parsek 2008**). En général, on trouve des acylhomosérines lactones (AHL) chez la plupart des bactéries Gram négatives. La majorité des bactéries Gram-positives utilisent des peptides autoinducteurs (AI), dont la taille est très variable (de 5 à 87 acides aminés).

Les molécules du quorum sensing sont dégradées par des enzymes. On obtient par conséquent une ségrégation spatiale des molécules du quorum sensing au sein d'un biofilm (**Irie et Parsek, 2008**).

3.2. Rôle du *quorum sensing* :

Le *quorum sensing* régule la physiologie du biofilm en modulant la taille de la population du biofilm. Il initie les phénomènes de dispersion des bactéries planctoniques à partir du biofilm (**Irie et Parsek, 2008**). Le *quorum sensing* aurait aussi un rôle dans la détermination de l'épaisseur du biofilm. Il peut réprimer ou stimuler l'expression de certains caractères, comme par exemple la motilité ou certains facteurs de virulence extracellulaires, comme les protéases (**Irie et Parsek, 2008**).

3.3. Altération du *quorum sensing* :

L'altération des mécanismes de *quorum sensing* peut aboutir à d'importantes modifications phénotypiques des micro-organismes du biofilm, par exemple une sensibilité augmentée à des antibiotiques ou à des antiseptiques, ou des anomalies dans le cycle de développement du biofilm, surtout lors des étapes de formation et de dispersion (**Irie et Parsek, 2008**).

4. Rôle de biofilm dans la persistance bactérienne :

- **Protection vis-à-vis des agressions de l'environnement :**

Les bactéries du biofilm résistent mieux que leurs équivalents planctoniques à diverses agressions extérieures comme les UV, les changements de pH et d'osmolarité, la prédation et les agents antimicrobiens. Les biofilms tolèrent les antibiotiques à des concentrations 10 à 1000 fois plus importantes que les bactéries planctoniques (**Ceri et al., 1999**) : il a été proposé que la matrice agisse comme barrière de diffusion à la pénétration de certaines molécules toxiques. La présence de zones peu ou pas oxygénées dans les couches profondes du biofilm, peut également contribuer à la résistance à certains biocides qui peuvent être inactivés dans ces conditions ou qui sont peu efficaces sur les bactéries métaboliquement peu actives. Enfin, de plus en plus d'arguments expérimentaux suggèrent l'existence d'une résistance liée à l'expression de mécanismes génétiques particuliers. L'ensemble de ces caractéristiques suggère que le biofilm constitue un mode de vie favorable pour les bactéries, au point de constituer, pour certaines espèces bactériennes, un mode de vie par défaut (**Jefferson, 2004**).

Chapitre IV : La prévention des infections nosocomiales

1. Respect des règles d'hygiène et d'asepsie :

Hygiène hospitalière est une discipline médicale qui a comme objectif la lutte contre les infections nosocomiales, Elle repose sur des recommandations établies en ce qui concerne : les professionnels, les actes de soins, les dispositifs médicaux, les aspects hôteliers et logistiques (circuits, entretien, travaux, linge, déchets...) (**IFSI, 2006**).

Le risque de contamination nosocomiale, aux centres de santé reste notablement élevé. Donc le protocole d'hygiène et d'asepsie doit être une démarche systématique que toute personne doit appliquer quotidiennement.

1.1 Hygiène des mains :

L'hygiène des mains contribue à limiter la transmission manu-portée d'agents infectieux • du patient au soignant, du soignant au patient, de l'environnement au patient ou au soignant.

Préalables indispensables à tout traitement des mains :

- Ongles courts, sans vernis, Avant-bras dégagés, Absence de bijoux (**Ministère de la santé, 2006**).

- Port de gants à usage unique est Obligatoire pour tout risque de contact avec du sang ou autre liquide biologique

- Gants jetés immédiatement après chaque usage

- Gants changés entre 2 patients ou entre 2 soins différents chez le même patient

- Ne pas toucher l'environnement avec des gants souillés

- Port de masque et de lunettes si risque de projection de liquides biologiques

- Tenue de travail toujours propre, et cheveux attachés pour les femmes. Et la Port d'un tablier plastique à usage unique, par-dessus la tenue de travail, pour les toilettes, les gros pansements, les risques de projection de liquides biologiques et lors de l'entretien du matériel souillé (**Reboux et al., 2002**).

Pour tout malade de réanimation un isolement technique standard film et de la libération de CTL. La libération du CTL antimicrobien favorise ainsi l'élimination des pathogènes (**Christophe, 2013**).

1.2. Traitement physico-chimique :

La stérilisation des dispositifs médicaux est l'un des maillons de l'hygiène hospitalière en concourant à la lutte contre les infections nosocomiales. La stérilisation fait appel à des

procédés physico-chimiques dont il importe de maîtriser les bases scientifiques (**Dominique et al., 2013**).

Quel que soit le mode de nettoyage, un rinçage et un séchage efficaces et non contaminants du dispositif médical doivent être effectués avant le conditionnement afin d'éviter toute nouvelle contamination (**Swissmedic, 2005**).

L'idéal est d'utiliser un lave-instruments qui doit, non seulement, donner un bon résultat au niveau du nettoyage, mais également être capable de ramener la bio charge à un niveau acceptable (**VANDE et al., 2006**).

1.3. Traitement par incorporation d'agents antimicrobien :

Les agents antimicrobiens sont des médicaments indispensables pour assurer la santé et le bien-être de l'homme et de l'animal. L'antibiorésistance est un problème de santé publique de dimension mondiale, tributaire de l'utilisation des agents antimicrobiens tant en médecine humaine et de limiter le développement de résistance (**oie, 2014**). L'utilisation appropriée des antimicrobiens est essentielle pour réduire et prévenir la résistance aux antimicrobiens, par contre L'utilisation inappropriée de ces agents (pour de mauvaises raisons ou de façon incorrecte) entraîne l'apparition et la sélection de microbes résistant aux médicaments (**commission européenne, 2011**).

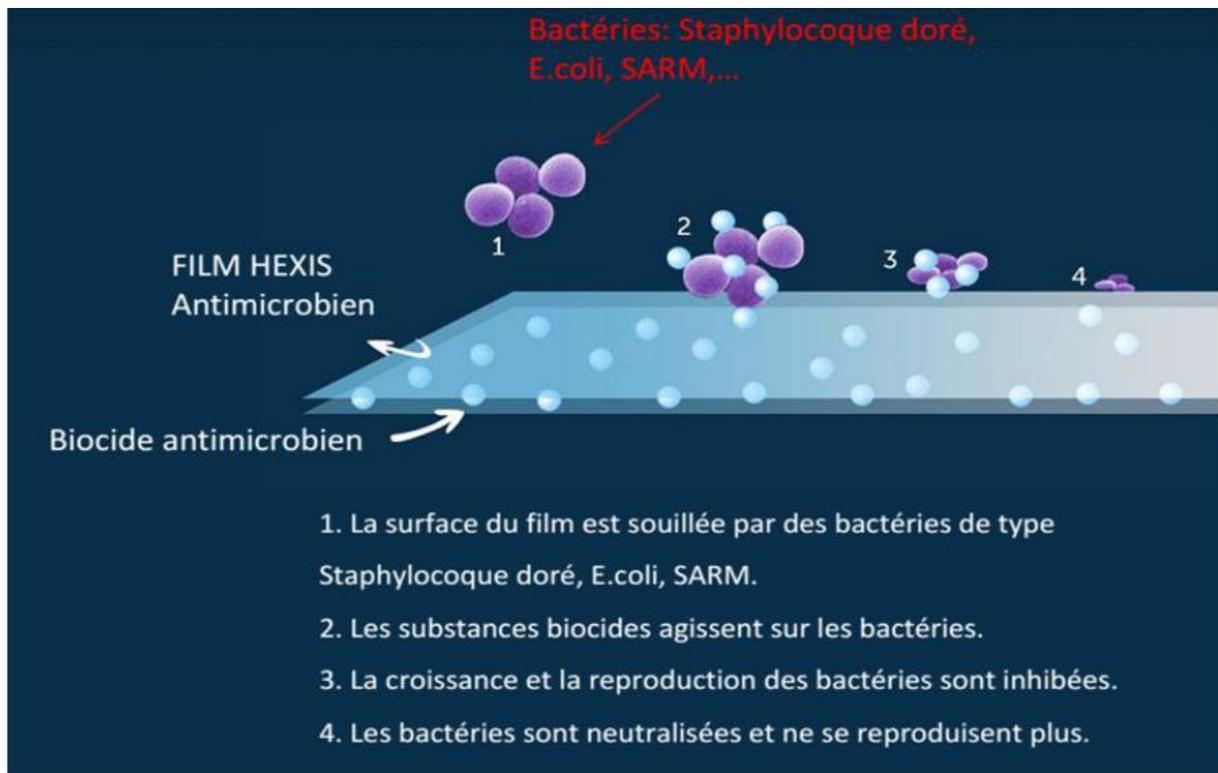


Figure 06 : Principe de l'utilisation d'antimicrobiens à la surface des implants (**commission européenne, 2011**).

1.5. Les nouveaux axes de recherche :

Cinq axes de travail avec pour objectif de réduire la fréquence des infections nosocomiales et la résistance bactérienne aux antibiotiques:

1. Améliorer l'organisation des soins et les pratiques des professionnels ayant un impact sur le risque infectieux
2. Adapter les structures et faire évoluer le dispositif de lutte contre les IN
3. Optimiser le recueil et l'utilisation des données de surveillance et du signalement des IN
4. Renforcer l'information du patient et la communication sur les IN.
5. Promouvoir la recherche sur les mécanismes, l'impact, la prévention et la perception des IN
(Denis, 2013).

Matériel et méthodes

1. Lieu d'étude :

Cette étude est réalisée au niveau de deux laboratoires : Laboratoire de biologie moléculaire et laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédical et l'Environnement (LAMAABE) de l'Université Abou-Bekr Bekaid-Tlemcen.

2. Prélèvement :

2.1. Lieux de prélèvement

Les prélèvements des échantillons ont été effectués dans les blocs opératoires du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen à partir de tous les instruments des salles d'opération aseptiques qui composent le bloc opératoire et des salles septiques (salle de réveil) entre Avril et Juin 2015. Ils ont été réalisés au niveau des services :

- Service de chirurgie d'Etablissement Hospitalier Spécialisé mère-enfant(EHS).
- Service des urgences.

Les prélèvements ont concerné: le poignet de porte, la porte, le sol, la table opératoire, table fixe, scialytique, l'évier, appareil d'anesthésie, stéribloc, table mayo, les masques, le sol, les murs, les appareils, les tuyaux, la boîte de savon, la boîte opératoire (les instruments), les robinets, lits.

2.2. Méthodes de prélèvement :

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

- Humidifier l'écouvillon avec l'eau physiologique stérile et éliminer l'excès de liquide en pressant légèrement le coton sur la paroi du tube ;
- Frotter l'écouvillon sur la surface verticalement, horizontalement et en diagonale, pendant moins de 20 secondes .une pression aussi forte que possible doit être appliquée et l'écouvillon doit être retourné.
- Replacer délicatement l'écouvillon dans son tube et acheminer au laboratoire (**Denis, 2011**).

3. Matériel :

- Ecouvillons stériles
- Anse de platine
- Pipette pasteur
- Pipette graduées
- Boîtes de pétri
- Tubes à essais
- Tubes à hémolyse

- Lames et lamelles
- Etuve
- Bec bunsen
- Vortex

3.1. Les milieux de culture :

- **Milieux de culture liquides**
 - Bouillon coeur cervelle (BHIB)
- **Milieux de culture solides**
 - **Le milieu Mac Conkey:** permet d'isoler les bactéries à Gram négatif, grâce à l'action des deux inhibiteurs le cristal violet et les sels biliaries (**Biokar, 2009**).
 - **Le milieu de Chapman :** est un milieu sélectif, surtout, permettant la croissance des germes halophiles, La forte concentration en chlorure de sodium inhibe la croissance de la plupart des bactéries autres que les staphylocoques (**BIO-RAD ,2007**).
 - **Gélose nutritive :** pour la conservation des souches à courte terme.

3.2. Tests biochimiques

- Galerie API20 NE
- Galerie API staph

3.3. Réactifs

- VogesProskauer (VP1 ,VP2)
- Nitrate (Nit1 et Nit 2)
- Zym A et Zym B
- Disque d'oxydase
- Huile de paraffine

3.4. Autre produit

- Eau oxygénée
- Eau distillé
- Violet de gentiane
- Lugol
- Fuchsine
- Ethanol

4. L'enrichissement :

L'enrichissement du nombre de microorganismes est réalisé en mettant chaque écouvillon dans un tube contenant le bouillant BHIB et laisser incubé 24h.

5. Isolement et purification:

Après incubation des deux milieux sélectifs ensemencés, il a été procédé à la purification des colonies bactériennes par réisolement sur les mêmes milieux sélectifs afin d'obtenir des souches pures pour entamer l'identification. Les colonies sont repérées selon leurs aspects et leurs morphologies.

6. Identification :

L'identification comporte une série d'étape, se succédant le plus souvent dans un ordre déterminé ; les souches isolées ont été identifiées par des techniques microbiologiques standards (la coloration de Gram , catalase et test d'oxydase) et par le système API Staph (BioMérieux) pour *S.aureus* et API 20NE pour *P.aeruginosa*. Les résultats obtenus au cours de chaque étape permettent l'orientation des démarches ultérieures.

6.1. Caractère macroscopique :

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

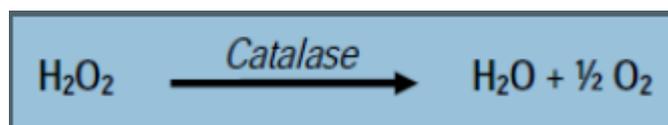
6.2. Caractère microscopique:

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

6.3. Recherche de la catalase :

Ce test permet de différencier les staphylocoques des streptocoques. A partir d'un isolement, une petite quantité de culture bactérienne est prélevée; puis placée sur une lame, on fait réagir la colonie dans 1 goutte de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (**Garnier et Denis ,2007**).

Une réaction positive se traduit par le dégagement de bulles de gaz (oxygène), la réaction se fait selon l'équation :



Ce test, peut être réalisé en tube contenant 0.5 ml de H_2O_2 . On prélevées des colonies et introduites dans le tube. Le résultat est identique à celui obtenu lors du test sur lame (**Aouati, 2009 ; Chaala, 2013**).

6.4. Test d'oxydase :

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à Gram négatif. Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semiquinonique rose violacé. L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires bactériennes, c'est une enzyme qui catalyse une réaction d'oxydo-réduction en impliquant une molécule d'oxygène comme accepteur d'électrons.

Les bactéries qui possèdent l'enzyme oxydase peuvent oxyder le N,N,N,N-tétraméthyl-1,4-phénylène diamine qui est un composant du réactif de la recherche du cytochrome oxydase en bactériologie, ce qui donne des produits violacés.

Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une couleur rouge violacée au bout de 10 secondes ; la réaction est tardive entre 10 et 60 secondes, et elle est négative après 60 secondes.

6.5. Identification par la galerie API 20E :

- **Principe :**

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif, comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

Ce système comporte 20 cupules tests qui contiennent un milieu réactionnel déshydraté. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.

- **Techniques :**

Préparation de la galerie :

-Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

-Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

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

Préparation de l'inoculum :

-une colonie est prélevée sur un milieu gélosé et en suite mise dans un tube de 5 ml d'eau distillée stérile, a fin d'obtenir une suspension bactérienne.

Incubation de la galerie :

-homogénéiser la suspension bactérienne.

-Pour les tests CIP, VP, GEL remplir les tubes et les cupules.

-Pour les autres tests, remplir uniquement les tubes.

-Recouvrir les tests ODC, ADH, LDC, H₂S, URE avec 2 gouttes d'huile de paraffine.

-Mettre le couvercle de la galerie.

-Incuber à 35-37 °C pendant 18 à 24 h.

- **Lecture et interprétation :**

L'interprétation de la galerie s'effectue après incubation, en se référant au tableau de lecture.

6.6. Identification par la galerie (API®Staph)

API®Staph BioMérieux est un système standardisé pour l'identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus*, comprenant 20 tests biochimiques classiques de différencier les espèces de *Staphylococcus*. Les tests étudiés par cette galerie sont :

Attaque de différents sucres ou polyalcools ;

Recherche de nitrate réductase, de phosphatase, d'arginine dihydrolase et d'uréase
(Chaalal,2013).

- **Technique**

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

Un inoculum bactérien d'opacité égale à 0,5 de McF est préparé avec l'eau physiologique stérile à partir d'une culture pure de 18 heures sur gélose au sang. À l'aide d'une pipette, remplir l'eau physiologique ensemencée dans les tubes de la galerie à l'exception des cupules sans pour autant dépasser le niveau des tubes.

Créer une anaérobiose dans les tests ADH et URE, en remplissant leurs cupules d'huile de paraffine ensuite renfermer la boîte d'incubation et incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.

La lecture peut s'effectuer directement par rapport aux résultats du tableau d'identification (annexe 03), ou bien après transformation de ces résultats en code chiffré dont la signification est donnée par un inde numérique (API web) (Murray, 2003).

- Par le catalogue analytique
- Par un logiciel d'identification

7. Conservation des souches

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

8. Les techniques d'évaluation de la formation de biofilm *in vitro* :

8.1. La méthode du Rouge Congo Agar

La gélose Rouge Congo Agar est un milieu très convenable pour la détection des souches productrices de slime. Sur ce milieu les souches exprimant le PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesion) donnent des colonies noires avec une surface rugueuse contre des colonies de couleur rouge et à surface lisse pour les souches PIA négatives (Ziebuhr *et al.*, 2001).

- **Technique**

La formation de biofilm a été recherchée sur le milieu Rouge Congo. Ce milieu a été préparé en

- additionnant 0,8 g de Rouge Congo et 50 g de saccharose à 1 L de gélose coeur-cerveille, puis
- autoclavé à 115°C pendant 10 minutes.

Le milieu est ensemencé avec une anse d'une suspension de notre souche (une colonie dans 20 ml d'eau distillée). La lecture a été faite après une nuit d'incubation à 37°C et 24 heures supplémentaires à température ambiante (Touati *et al.*, 2007).

- **Lecture**

Les souches productrices de slime donnaient des colonies noires à surface rugueuse contre (figure 07) des colonies rouges à surface lisse pour les souches non productrices. Les souches de phénotype variables donnaient des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir (Nasr *et al.*, 2012).

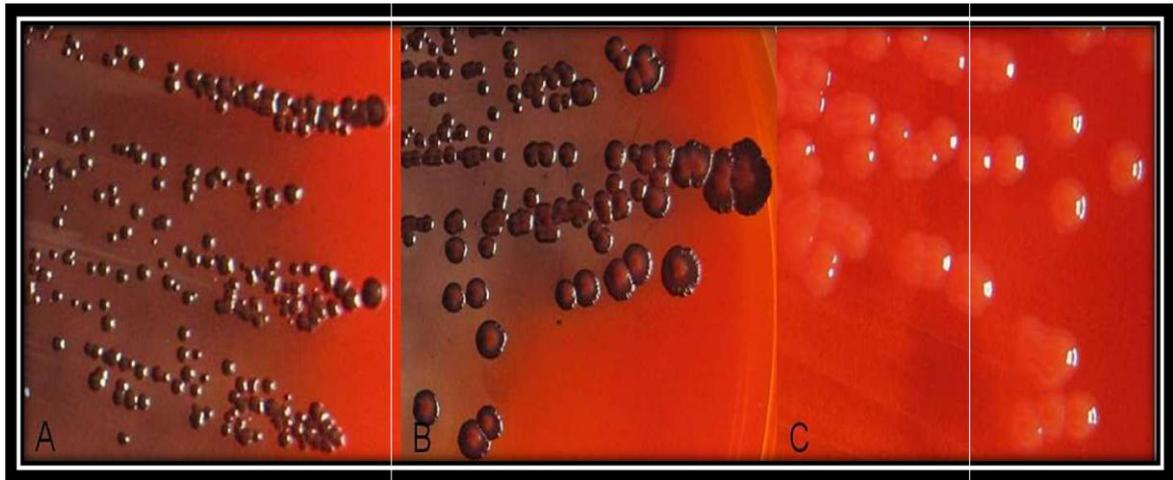


Figure 07 : Culture sur la gélose Rouge Congo (Hou et al., 2012).

- (A) CRA-positive souche de *S.epidermidis* (colonies noires)
- (B) CRA-positive souche de *S.aureus* (colonies noires)
- (C) CRA-négative souche de *P.aeruginosa* (colonies rouge)

8.2. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP) :

Les problèmes de santé publique provoqués par les biofilms sont maintenant clairement définis. Pour prévenir et lutter contre ces biofilms, une meilleure compréhension de leurs mécanismes de formation est nécessaire. de nombreuses méthodes d'étude de la formation et du développement des biofilms ont été utilisées au cours des dernières années : des méthodes d'observation par microscopie (microscope à fluorescence, microscope confocal à balayage laser, microscope électronique à balayage) ou des méthodes de numération de bactéries après détachement des biofilms par sonication, frottement ou vortex des surfaces. Ces techniques permettent d'obtenir des informations détaillées mais sont difficiles et longues à réaliser. C'est pourquoi des modèles d'étude in vitro en microplaques ont été développés. Ces tests ont l'avantage d'être relativement rapides et peu coûteux. ils permettent de réaliser de nombreux tests simultanément, notamment pour tester l'effet de plusieurs facteurs influençant la formation de biofilm, comparer la capacité de formation de biofilm de souches sauvages et de souches mutantes, ou encore tester la sensibilité des bactéries au sein du biofilm aux agents antimicrobiens (Peeters et al., 2008).

- **Technique**

Elle a été décrite en **1985** par le groupe de recherche de **Christensen**, qui a pour but d'évaluer semi quantitativement la formation de biofilm.

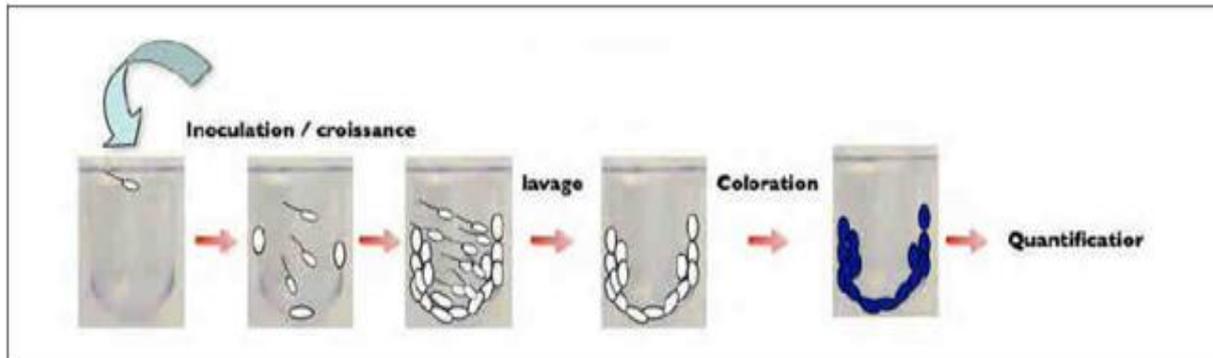


Figure 08 : Principe des techniques de quantification des biofilms en microplaques (Laurent, 2011)

A partir d'une culture de 18 heures dans le milieu BHIB (Bouillon Cœur cerveau), les puits d'une microplaque de 96 puits (polystyrène) sont inoculés avec 10 μ L de suspension diluée de bactéries à laquelle sont ajoutés 150 μ L de BHIB.

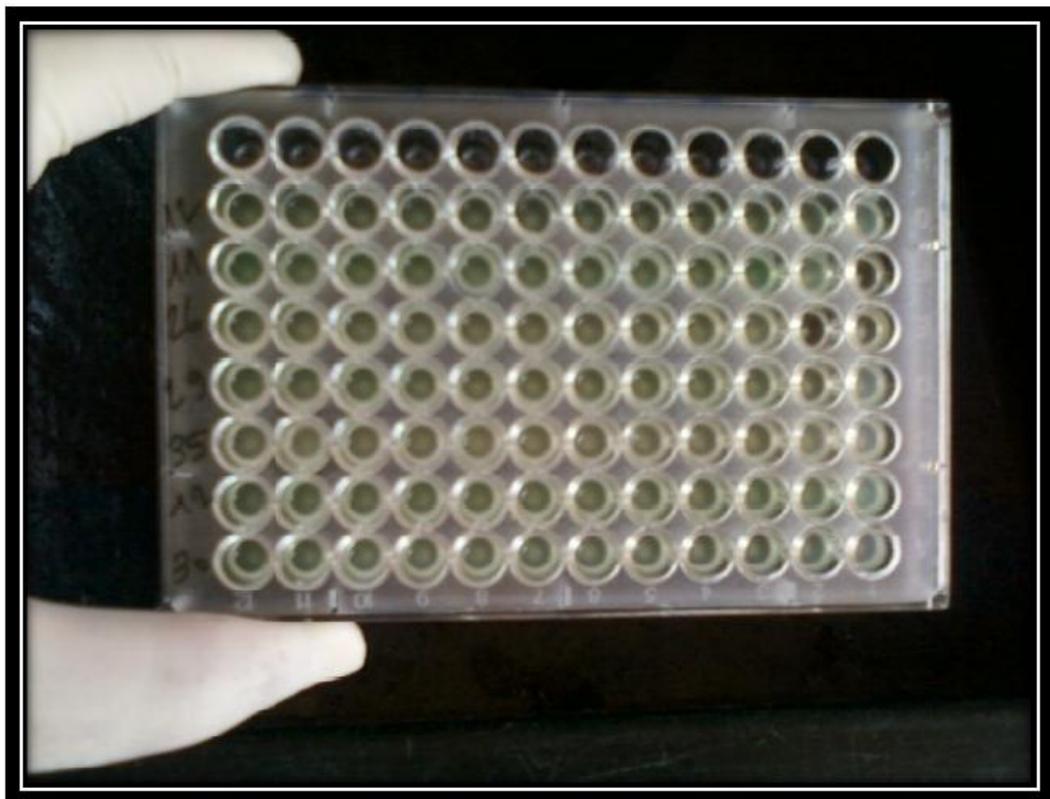


Photo personnelle 01: Technique de formation de biofilm sur microplaque de titration.

Les microplaques sont incubées pendant 24 heures à 37°C. Les puits sont lavés trois fois avec 0,2 mL de l'eau physiologique stérile afin d'éliminer les bactéries libres (planctoniques). Les biofilms formés par l'adhérence des organismes sessiles sont colorés avec du cristal violet (0,1%) (figure 09) pendant 10 min (le cristal violet est une petite molécule qui diffuse à travers les membranes bactériennes et pénètre à l'intérieur des bactéries pour se complexer aux molécules chargées négativement). L'excès de colorant est ensuite rincé par un lavage en profondeur avec de l'eau distillée stérile et les plaques sont laissées à température ambiante pour séchage (**Stepanovic et al., 2000**)

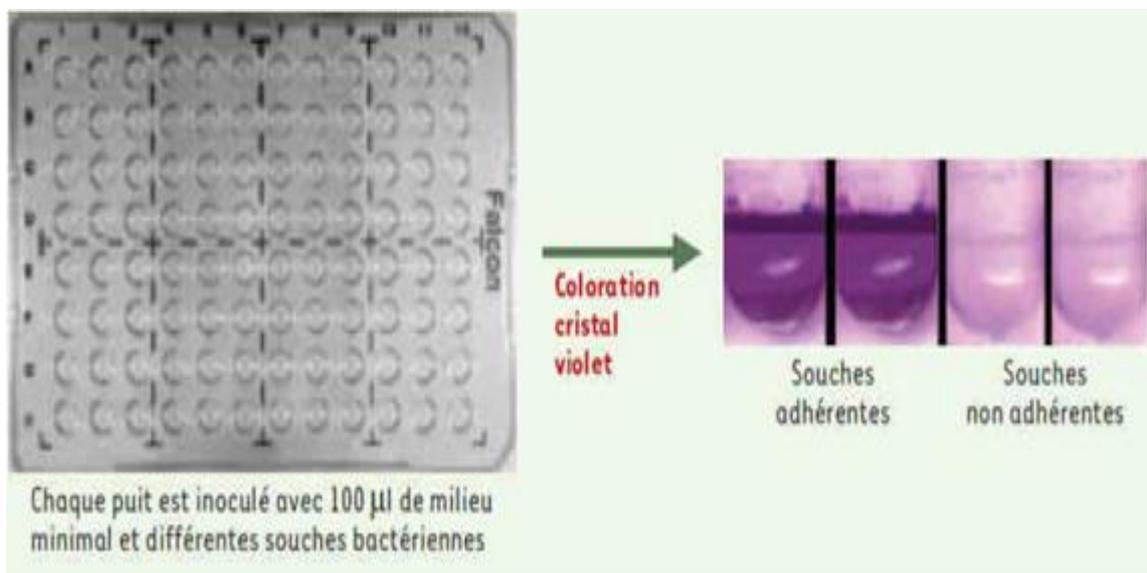


Figure 09 : Principe de la mesure de la biomasse par la méthode de TCP (**Filloux et Vallet, 2003**).

L'excès de colorant est ensuite rincé par un lavage en profondeur avec de l'eau distillée et les plaques sont laissées pour le séchage afin d'évaluer l'importance de la coloration du biofilm en mesurant la densité optique au moyen d'un lecteur ELIZA (photo personnelle 02) à une longueur d'onde 590 nm (**Hola et Ruzicka, 2011**).

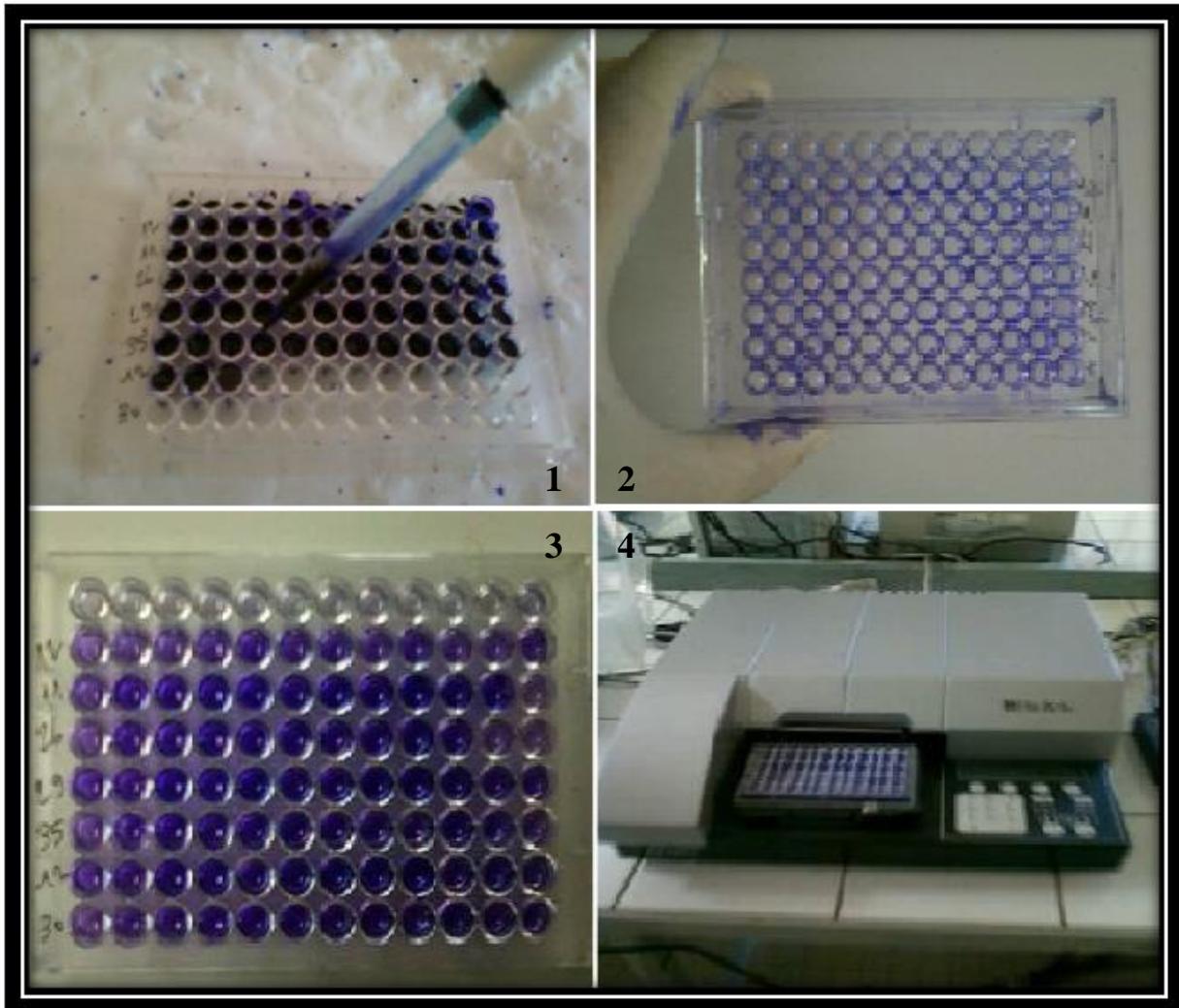


Photo personnelle 02: Détection et lecture de biofilm par méthode TCP.

1 : Coloration par CV.

2 : Rinçage par l'eau physiologique stérile.

3 : Récupération de biofilm par l'éthanol.

4 : Lecture de microplaque par un lecteur ELISA (mesurer la DO).

- **Lecture**

La classification des résultats obtenus présente sur la base du DO témoin (**Hola et Ruzicka, 2011**). Les souches ont été classées comme suit (**Stepanovic et al., 2000**):

$DO \leq DO_t(\text{Témoin})$: 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 (**Christensen et al., 1985**).

Résultats et discussion

1. Prélèvement :

1.1. Fréquence de prélèvements:

Un total de 95 prélèvements positifs provenant de surface 27 ont permis d'isoler *P.aeruginosa* et *S.aureus*.

Ce taux non négligeable pourrait être le reflet d'une contamination de ces supports.

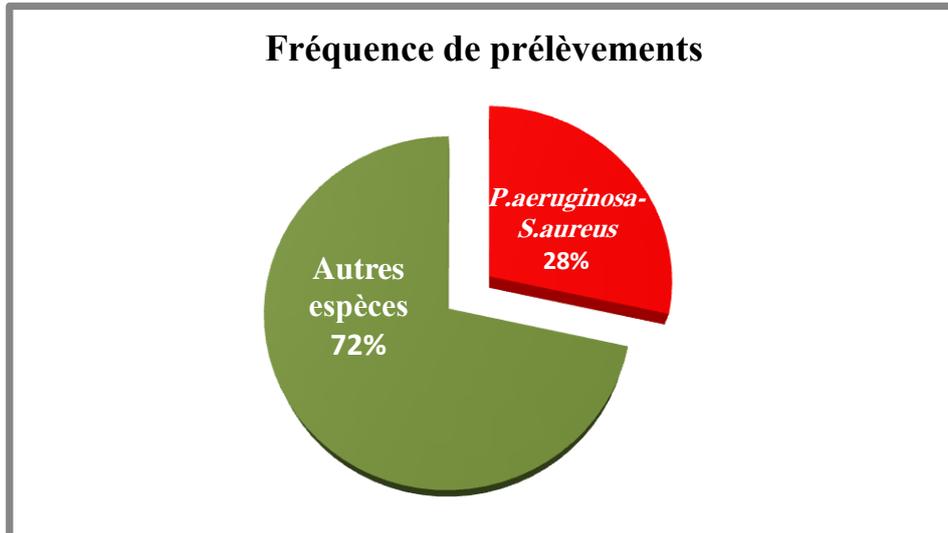


Figure 10: Fréquence de prélèvement positif à *P.aeruginosa* et *S.aureus* .

Bien que 72% des prélèvements ont donné naissance à un trouble visible. Ces souches présentant des caractères différents et n'appartiennent pas aux genres recherchés ce qui nous a incité à abandonner l'identification.

Les 33 souches ayant été isolées à partir de cultures positifs (28%) ont permis d'assigner 12 souches à l'espèce *Staphylococcus aureus* et 21 souches *Pseudomonas aeruginosa*.

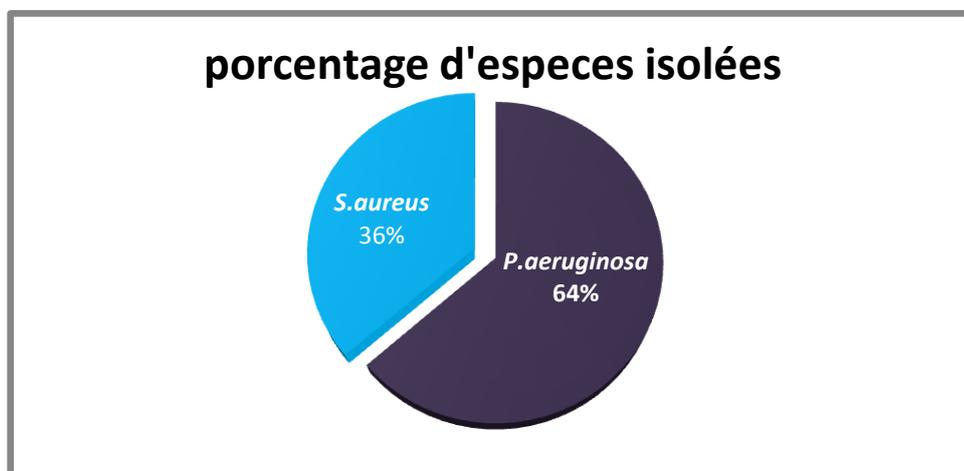


Figure 11 : Pourcentage d'espèces de *P.aeruginosa* et *S. aureus* isolées.

1.2. Répartition des souches selon le site de prélèvement :

Nos prélèvements ont concerné différents sites dans le bloc opératoire en deux services : service des urgences (CHU) et service de chirurgie (EHS).

Plusieurs souches ont été isolées à partir des différents prélèvements de l'EHS, dont leurs répartitions sont mentionnées dans la figure 12.

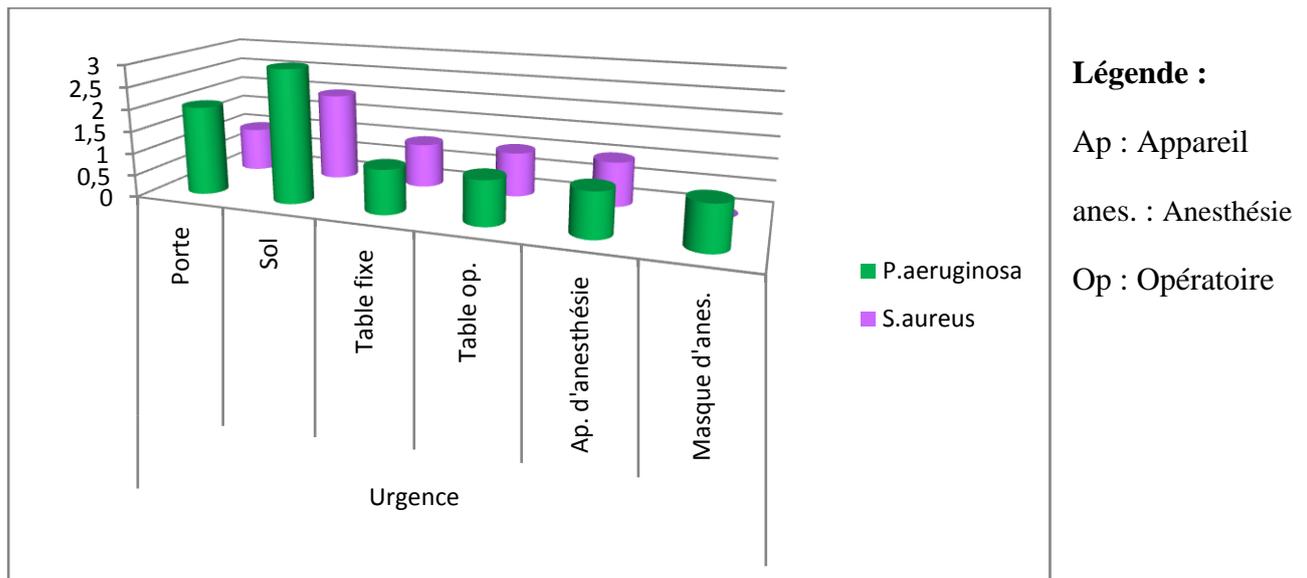


Figure 12: Distribution des souches *P.aeruginosa* et *S.aureus* dans le service d'urgence en fonction de site de prélèvement.

Le sol et la porte sont les plus contaminés et il est à noter qu'un nombre élevé de *Pseudomonas* par rapport au *staphylococcus* dans le sol puisque les *Pseudomonas* sont des bactéries de l'environnement, elles sont rencontrées dans l'eau, le sol de l'environnement hospitalier cela a été déjà signalé par Merah (2011).

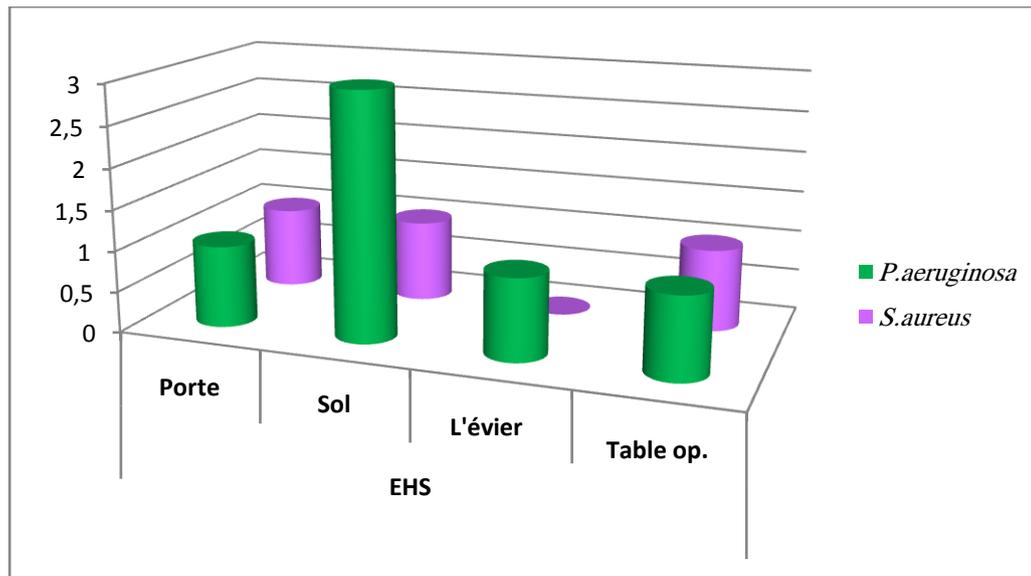


Figure 13: Distribution des souches *P.aeruginosa* et *S.aureus* dans le service EHS en fonction de site de prélèvement.

Dans la présente étude le site montrant le plus fort pourcentage de contamination par *P.aeruginosa* et *S.aureus* est le sol 44% suivie par la porte 33% cela du à plusieurs facteurs comme l'activité humaine qui entraîne un apport de micro-organismes par le patient lui-même, par les soignants et par les visiteurs (Talon *et al*, 1999).

Donlan en 2001 signale que les microorganismes en cause proviennent de la flore cutanée du patient, de la microflore exogène du personnel hospitalier, ou encore de l'environnement contaminé.

Les germes retrouvés sur les surfaces dépendent aussi de la qualité de l'air car les particules en suspension dans l'air vont finir inévitablement par se déposer sur les surfaces et ce d'autant plus rapidement qu'elles sont plus volumineuses, donc les prélèvements des surfaces d'un local vont donc refléter, outre la qualité du bionettoyage, l'efficacité ou les défaillances d'un système de traitement d'air (Echchelh *et al.*, 2014)

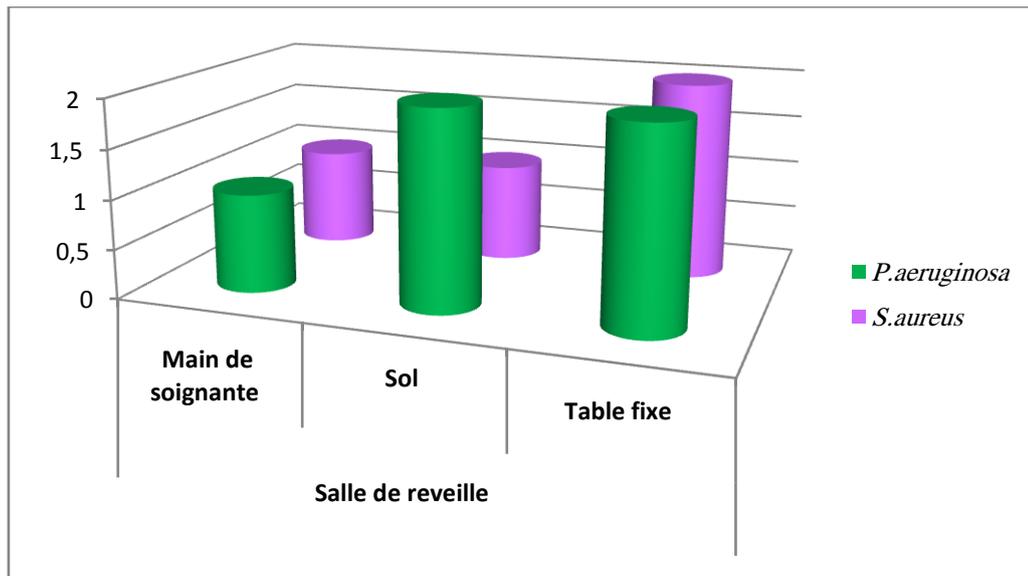


Figure 14: Distribution des souches *P.aeruginosa* et *S.aureus* dans La salle de réveil en fonction de site de prélèvement.

La contamination des surfaces dépend, outre de la qualité du bionettoyage, de nombreux facteurs liés au microorganisme : sa durée de vie sur un support inerte (qui varie en fonction de la matière, de la température, de la dessiccation), de son adhérence à la surface, de sa capacité à produire un biofilm et de sa capacité à résister aux conditions défavorables (sporulation). Par exemple, il a été montré que *Staphylococcus aureus* et *Acinobacter baumannii* sont les espèces parmi les plus résistantes à la dessiccation et peuvent survivre plusieurs semaines sur les surfaces sèches, devant *Pseudomonas aeruginosa* (Wendt, et al., 1998).

2. Identification des souches isolées :

2.1. Etude macroscopique :

Aspect de colonies sur gélose (photo personnelle 03):

- Sur le milieu de Chapman, les colonies présentant l'aspect macroscopique caractéristiques du genre *Staphylococcus* ont été prélevées, le développement bactérien sur le milieu de Chapman ne constitue qu'une indication, d'autres bactéries (enterocoques) peuvent y cultiver. Sur ce milieu, les colonies de *Staphylococcus* sont apparues souvent pigmentées et entourées d'une auréole jaune dans le cas où le mannitol est fermenté, si non les colonies sont de couleur blanche. Les colonies sont arrondies à bords régulier de 1 à 2 mm de diamètre après 48h d'incubation à 37°.



Photo personnelle 03 : Aspect de *S.aureus* sur gélose chapman.

- Sur Mueller-Hinton les colonies poussent en 24 heures et sont plates (tapis), à bord irrégulier et ont eu un aspect irisé métallique avec le temps (photo personnelle 04). Un pigment vert brillant diffusible caractérise cette espèce : il est dû à la production de la pyocyanine (pigment bleu spécifique de *P. aeruginosa*). Une odeur aromatique de type seringa est souvent présente

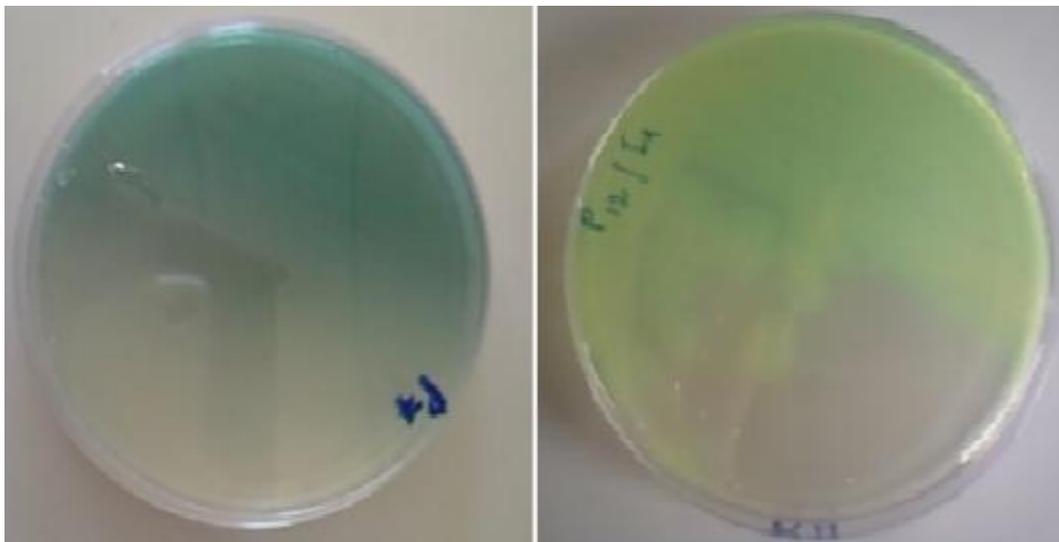


Photo personnelle 04 : Culture de *P. aeruginosa* sur gélose Mueller-Hinton.

Deux morphotypes ont été observés :

Morphotype 1 : Des grandes colonies larges, rugueuses avec un centre plus bombé (colonies en œufs sur le plat) et un bord irrégulier. Très souvent présentent sous forme de petits phages d'autolyse donnant un reflet irisé ou métallique caractéristique.

Morphotype 2 : Petites colonies, mates, légèrement bombées avec un bord circulaire régulier ou bien Bombés, opaques, visqueuses parfois coulantes (photo personnelle 05).

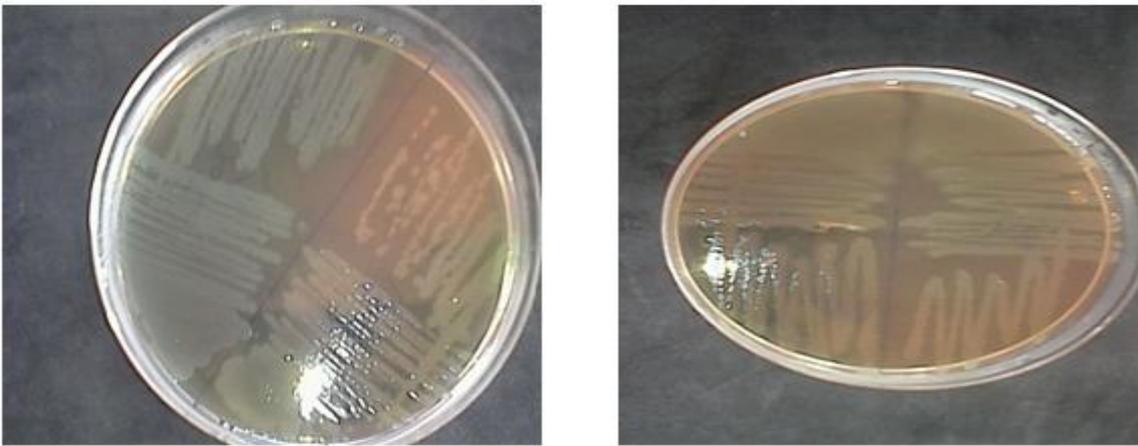


Photo personnelle 05 : Aspect macroscopique des colonies de *Pseudomonas* sur milieu Mac Conkey

2.2. Etude microscopique :

Coloration de gram :

La coloration différentielle pour 33 souches isolées a mis en évidence : des cocci sphériques, en grappe de raisin, en paires, colorés en violet.

Ainsi des fins bacilles à Gram négatif colorés en rose souvent incurvés non sporulés.

3. Identification biochimique :

3.1. Test catalase :

Toutes les bactéries isolées, testées pour la production d'une catalase, ont décomposé l'eau oxygénée en eau et en oxygène qui se dégage. Ce qui se traduit par le dégagement des bulles de gaz. (Photo personnelle).



Photo personnelle 06 : Production de catalase par les souches isolées

3.2. Test oxydase :

Les *Staphylococcus* étaient dépourvues d'oxydase et il n'y a pas eu de coloration, donc elles sont oxydase négative. Par contre le genre *Pseudomonas* s'est révélé oxydase positive (test instantanément positif).



Photo personnelle 07: Mise en évidence de la présence d'oxydase par les souches *P.aeruginosa*(+) et *S. aureus*(-).

3.3. Identification biochimique par le système miniaturisé API :

L'identification bactérienne réalisée par galerie API 20 E nous a permis de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques des souches *Pseudomonas aeruginosa* et de caractériser ainsi deux profils numériques différents : le biotype : 2202000 et le biotype 0312000 (photo personnelle 09).

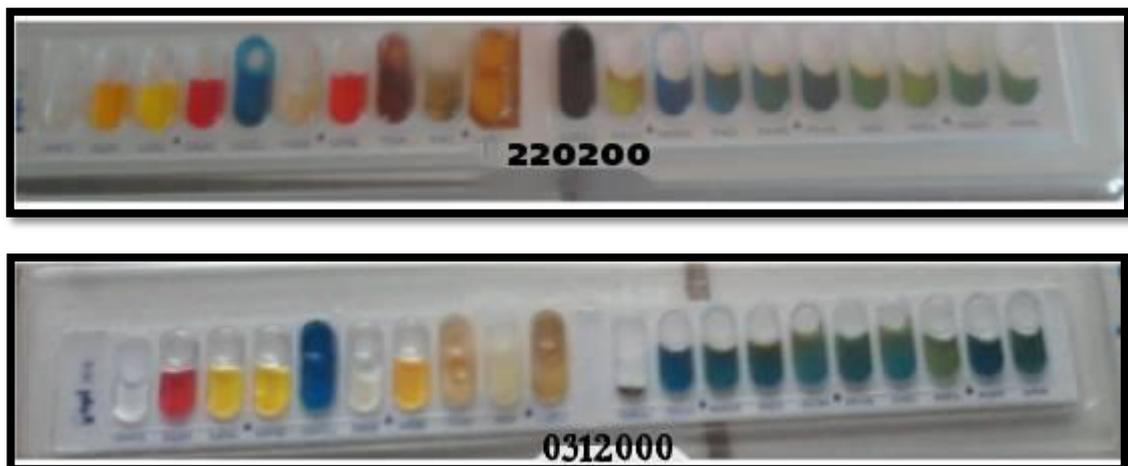


Photo personnelle 08: Identification de *Pseudomonas aeruginosa* par la galerie API 20

Tableau 03 : Tests biochimiques des deux biotypes de *Pseudomonas aeruginosa* .

Tests	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO2	N2	
0312000	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2202000	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Pseudomonas aeruginosa est aujourd’hui clairement reconnu comme un pathogène nosocomial majeur chez les patients immunodéprimés ou affaiblis, ce qui pose un problème de traitement des patients touchés par ces infections (**Mesaros et al ., 2007**).

En Algérie, *Pseudomonas aeruginosa* est le troisième agent le plus incriminé dans les infections associées aux soins (**Benslimani et Meieddine, 2012; Amrouni et al., 2014**).

Une enquête méditerranéenne de prévalence en 2010, montre que cette souche occupe la troisième place juste après *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* dans les infections nosocomiales (**Amazian et al., 2010**).

Pseudomonas aeruginosa est à l’origine de 16 % des cas de pneumonies hospitalières et de 12 % des infections urinaires nosocomiales. elle est responsable d’infections nosocomiales sévères pouvant atteindre 70 % de létalité en cas de pneumopathie nosocomiale (**Berthelot et al ., 2005 ; Adjidé et al ., 2009**).

De même le système API Staph (BIO Mérieux) ® nous a permis de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques des espèces appartenant au genre *staphylococcus* avec dominance d’un seul biotype 6336153. Ce biotype dominant a été également retrouvé dans d’autres travaux au CHU de Tlemcen (**Rébiahi, 2011**) et (**Khadir, 2013**).

L’identification de chaque souche est établie dans le profil numérique proposé par le logiciel apiweb@API 20Staph.



Photo personnelle 09 : Identification de *Staphylococcus aureus* par la galerie API staph.

Tableau 04 : Tests biochimiques du *S.aureus*, biotype 6336153

Tests	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR
6336153	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-

S. aureus se classe en deuxième position dans notre étude, c'est aussi un agent commensal de la peau et des muqueuses de l'homme. Il présente le potentiel de pathogénicité le plus important de toutes les espèces du genre *Staphylococcus*. Ce germe est responsable d'infections aiguës et chroniques dont la plupart sont dues à sa capacité à adhérer à des dispositifs médicaux et à former un biofilm (Liesse Iyamba, 2012).

4. Evaluation de la formation de biofilm :

Plusieurs chercheurs ont étudié les stratégies employées par les micro-organismes pour produire des biofilms, Ils ont montré que les bactéries productrices de biofilm sécrètent certaines substances chimiques qui les protègent contre les désinfectants, les agents antimicrobiens et des systèmes immunitaires de l'hôte (Saitou, 2009).

Des méthodes classiques de la détection de la production de biofilm *in vitro* ont été établies, telles que la méthode quantitative de la microplaque 96puits (Freeman *et al.*, 1989 ;Mathur *et al.*, 2006), et la méthode qualitative du Rouge Congo (Mathur *et al.*, 2006).

4.1. Technique Rouge Congo :

Les 21 souches de *P. aeruginosa* et 12 souches de *S.aureus* isolées ont été testées pour mettre en évidence leur capacité à former le biofilm par deux techniques : méthode de Rouge Congo (RCA) et méthode de plaque de Culture de Tissu (TCP).

Les résultats de rouge Congo sont montrés dans le tableau suivant :

Tableau 05 : Résultats de la production de slime par la méthode RCA

Souches	Nombre de souches testés					
	positif		variable		négatif	
	N ⁰	%	N ⁰	%	N ⁰	%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	9.52%	3	14.28%	16	76%
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	100%	0	0%	0	0%
Totale	33					

La recherche de la production de slime sur milieu rouge Congo a révélé que 15 souches sur 33 isolées de surface sont productrices de slime (tableau 03), soit 100% des souches de *Staphylococcus aureus* et 23% des souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

Les souches productrices de slime avaient un phénotype variable ou positif.

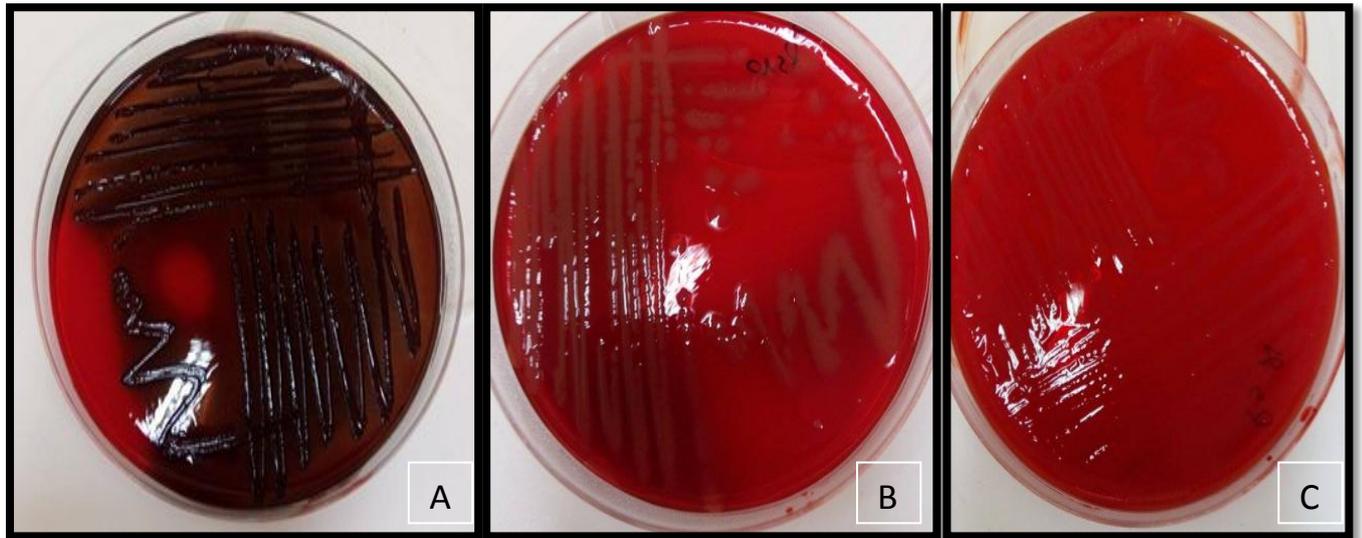


Photo personnelle 10: Production de slime chez les souches isolées sur milieu rouge congo
A : formatrice de slime, B : variable C : non formatrice de slime

Taj *et al.*, (2012) ont montré que le dépistage par la technique de rouge Congo n'est pas recommandé pour l'étude de la formation de biofilm

4.2. Technique de plaque de Culture de Tissu (TCP) :

Le protocole d'essai TCP décrit par Christensen et al,(1985) est le plus largement utilisé et a été considéré comme la norme d'essai pour la détection de la formation de biofilm , dans

Résultats et discussion

notre étude nous avons sélectionné des souches de *S.aureus* et *P.aeruginosa* afin de déterminer leur capacité à former le slime avec l'ajout de 2% saccharose dans le milieu de croissance .

D'après les résultats de **Bellifa et al. (2013)** ; **Kara Terki et al., (2013)** , la technique TCP reste la meilleure technique pour le dépistage de la formation du biofilm *in vitro*.

Elle permet une détermination quantitative pour comparer et examiner l'adhésion de différentes souches (**Racha et al ., 2012**) . Cependant, elle peut être moins précise pour déterminer la capacité des souches à sécréter le slime bactérien (**Castro Melo et al., 2013**).

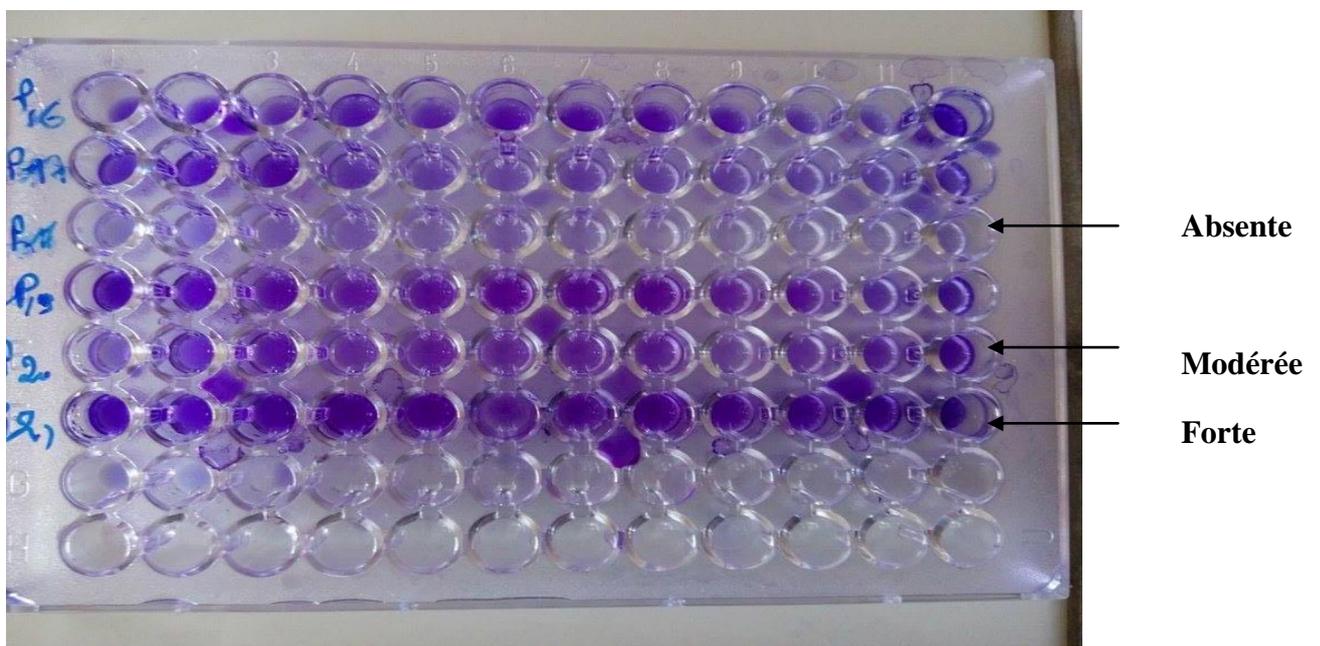


Photo personnelle 11 : Formation de biofilm par *P.aeruginosa* par la technique TCP.

Tableau 06 : Résultats de TCP sans supplément (2% saccharose).

Souches	Nombre de souches testés					
	Forte		Modérée		Absente	
	N ⁰	%	N ⁰	%	N ⁰	%
Pseudomonas aeruginosa	4	19.04%	12	57.14%	5	23.80%
Staphylococcus aureus	0	0%	9	75%	3	25%
Totale	33					

Selon le tableau 7 et la figure 16 il a été remarqué que chez les *Staphylococcus aureus* aucune souche isolé n'a été fortement formatrice, 9 souches sont modérée et 3 souche non formatrice de biofilm.

Un total de 21 souches *Pseudomonas aeruginosa* selon le tableau 7 et la figure 15 ,4 souches sont fortement formatrice de biofilm, 12 modérées et 3 sont non formatrice de biofilm.

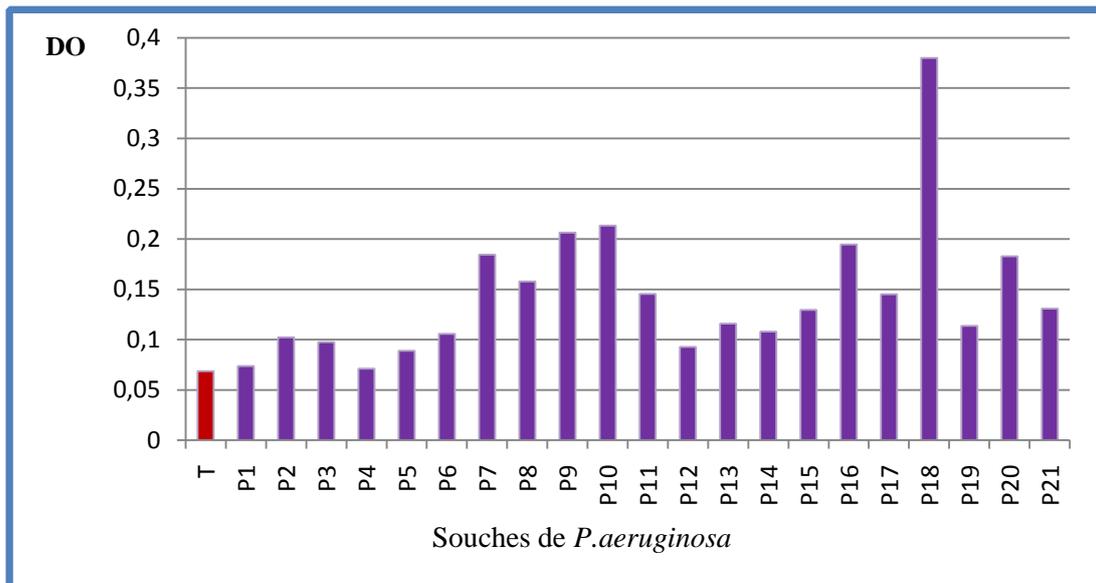


Figure 15: Formation de biofilm par *P.aeruginosa* par TCP (sans supplément)

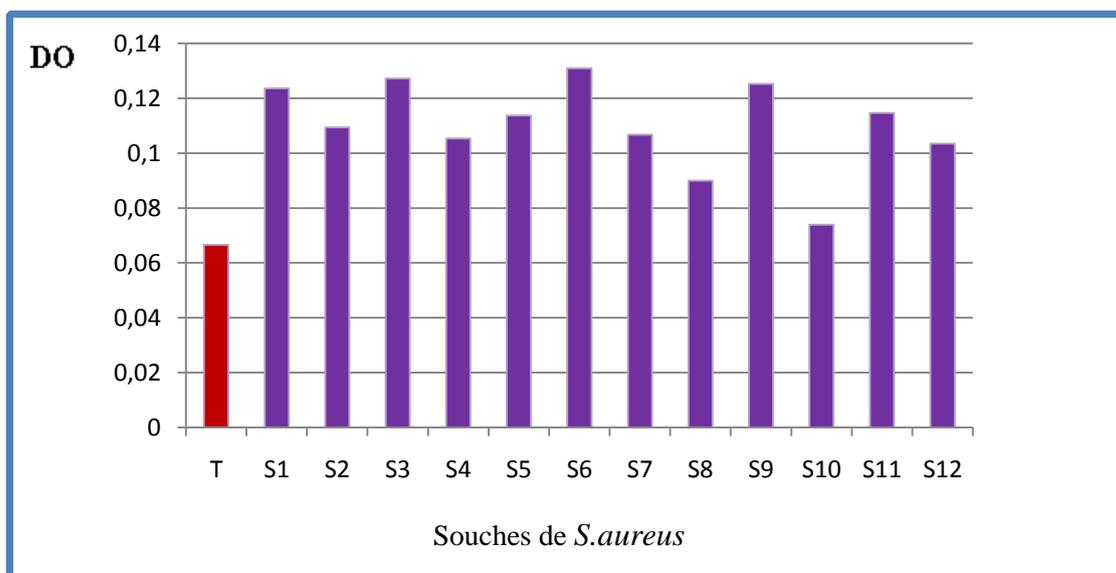


Figure 16 : Formation de biofilm par *S.aureus* par TCP (sans supplément)

2.1. Effet du saccharose sur la formation de biofilm

Suite aux nombreuses études rapportant l'effet de la composition du milieu de croissance sur la production du biofilm, il nous a semblé utile d'étudier la formation de biofilm par la technique TCP décrite précédemment en utilisant le milieu BHIB supplémenté de 2% de saccharose.

Tableau 07 : résultats de TCP avec supplément (2% saccharose)

Souches	Nombre de souches testés					
	Forte		Modérée		Absente	
	N ⁰	%	N ⁰	%	N ⁰	%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	52.38%	8	38.09%	2	9.52%
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	66%	3	25%	1	8.33%
Totale	33					

Selon le tableau 8 et la figure 16 a révélé que chez les *Pseudomonas aeruginosa*.il est à noter qu'après l'ajout de saccharose à 2% le nombre des souches fortement formatrice est élevé elle est de 4 à 11.

Des résultats similaires ont été rapportés par **Mathur et al. (2006)** qui ont démontré que le test TCP a été très satisfaisant en termes de détection de phénotype biofilm-positif.

Les auteurs ont conclu que la méthode TCP est la méthode de sélection la plus sensible et la plus précise montrant une bonne reproductibilité pour la détection de la formation de biofilms chez les staphylocoques.

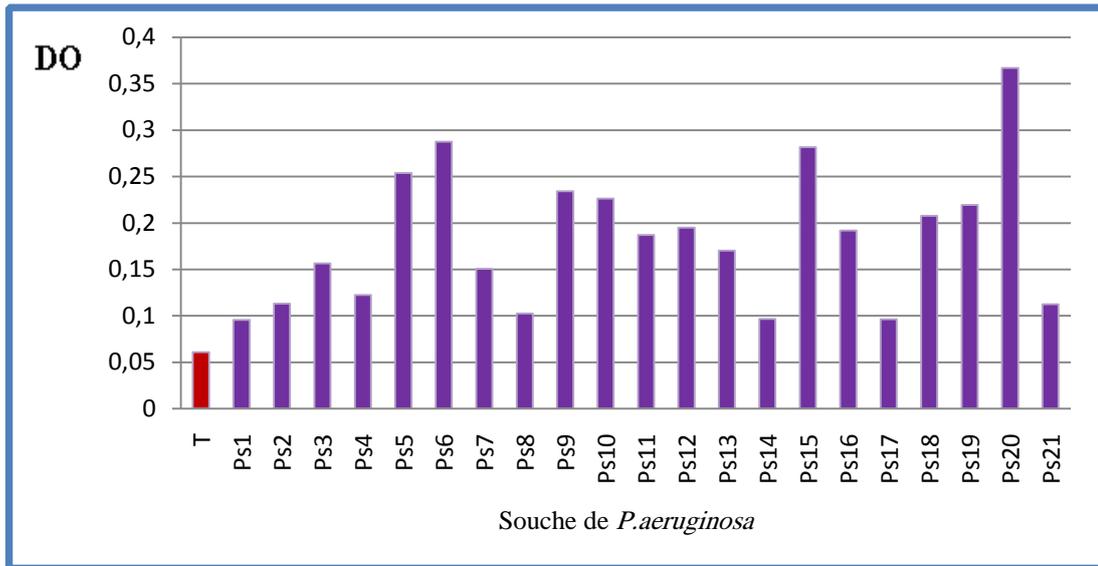


Figure 17 : formation de biofilm par *P.aeruginosa* par TCP (avec supplement).

Les valeurs moyennes de densités optiques (DO) obtenues par un lecteur d'absorbance pour microplaques, ont été converties en histogramme (figure 16). La valeur moyenne des puits de contrôle (Sans biofilm) est égale à 0,08. D'après l'analyse de l'historgramme et par comparaison des différentes valeurs de DO pour chacune des souches étudiées, il s'est avéré que 19 parmi les 33 souches sont fortement adhérentes présentant une DO > à 0.240

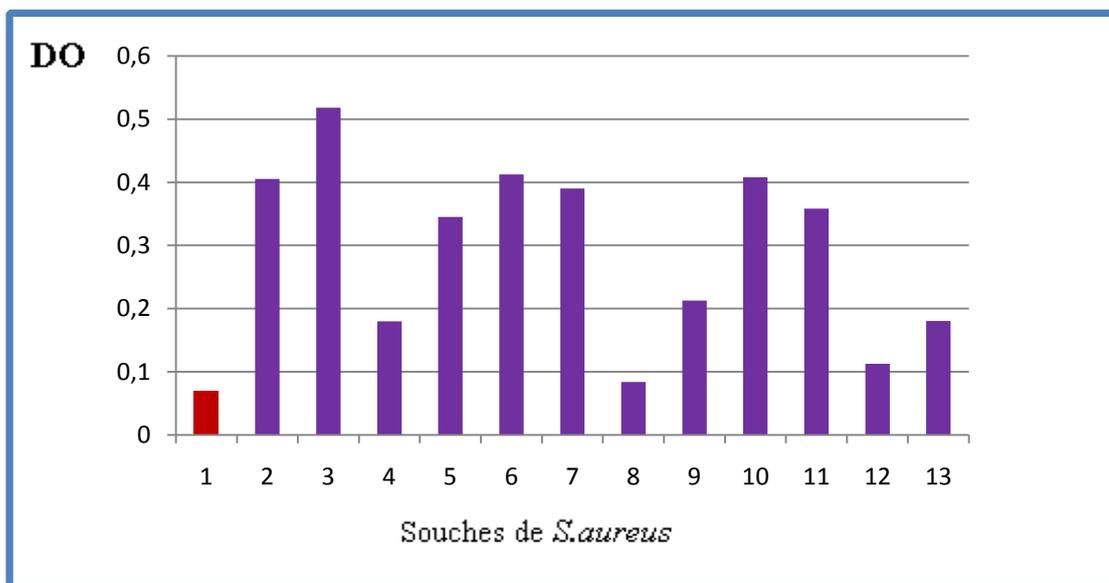


Figure 18: formation de biofilm par *S.aureus* par TCP (avec supplement)

Dans la méthode standard TCP, 25 des 33 isolats sont considérés positifs pour leur phénotype de production de biofilm par le milieu de croissance BHIB, avec l'addition 2% de saccharose, le nombre d'isolats formant le biofilm augmente à 30 (Tableau 06).

Les biofilms sont responsables d'un large éventail d'infections chez l'homme. Plus de 80% des infections bactériennes chroniques sont associées à la présence de biofilms (**Hall-Stoodley et al., 2004**). Ces derniers peuvent se former à la surface ou à l'intérieur des dispositifs médicaux implantés dans l'organisme (sondes urinaires, lentilles de contact, cathéter veineux central ...).

Tableau 08 : Optimisation de la production de slime par la méthode TCP

Formation de biofilm	Nombre d'isolats cliniques	
	Durée d'incubation 24h	
	BHIB	BHIB 2% saccharose
<i>P.aeruginosa</i> productrice de slime	16	19
<i>S.aureus</i> productrice de slime	9	11

Pour évaluer l'impact des conditions environnementales sur la formation de biofilm pour les isolats cliniques, nous avons détecté la formation de biofilm en utilisant le milieu de croissance (BHIB) additionné de 2% de saccharose. Il en résulte une augmentation en nombre de souches capables de former un biofilm par la technique TCP avec 30% (30/33) des souches produisant un biofilm en présence de ce supplément. Ainsi, le taux global de souches formatrices de biofilm a augmenté de 75% à 90% après l'ajout de sucre. Le saccharose semble stimuler plus la formation du biofilm où 19 sont de bonnes productrices et 11 forment modérément le biofilm et cela se traduit par le fait que le saccharose va stresser les cellules et induira les gènes à former le biofilm.

Suite à toutes ces techniques et selon plusieurs auteurs (**Oli et al., (2012), Mathur et al., (2006)**) la méthode de rouge Congo semble être moins efficace pour détecter la formation du biofilm in vitro.

La détection du biofilm par les méthodes TCP semblent plus fiables à celle du rouge Congo (tableau 4).

Nos résultats concordent avec ceux d'**Oli et al., (2012)**, où ils montrent que la technique TCP est la plus fiable pour la détection de la formation de biofilm chez des souches cliniques.

De même **Mathur et al., (2006)** ont récemment découvert que PIA (polysaccharides adhésins intracellulaires) qui influe sur la formation de *Staphylococcus aureus* ne peut pas être détectée par la méthode du rouge Congo.

Conclusion

Conclusion :

Vivant entre le commensalisme et la pathogénicité, les souches pathogènes ont développé des stratégies intéressantes pour transformer l'environnement hospitalier comme une véritable niche écologique.

Les résultats de cette étude sont en faveur d'une contamination fréquente de l'environnement hospitalier.

Notre travail a permis d'isoler 12 souches de *S.aureus* soit 36% et 21 souches de *P.aeruginosa* soit 64% prélevées sur différents sites de service des urgences et d'EHS du CHU de Tlemcen.

Par ordre de fréquence, les *Pseudomonas* représentent encore les germes les plus fréquemment isolés dans les colonisations et infections des surfaces hospitalières suivit des *Staphylococcus aureus* connu pour être les plus pathogènes des staphylocoques.

Les études d'adhésion bactérienne et de formation du biofilm ont été réalisées par les méthodes TCP et rouge Congo montre que 80% des souches isolés de surfaces étaient productrices de biofilm et de slime .

Dans le cadre de lutte contre les infections nosocomiales, ce travail montre l'importance de la prévention qui reste le seul moyen pour limiter le risque d'infection nosocomiale reposant sur l'établissement de recommandations écrites précisant les règles d'hygiène et d'asepsie.

En perspective de ce travail, il serait intéressant d'étudier un biofilm mixte « *P.aeruginosa-S.aureus* », de rechercher par des techniques de biologie moléculaires les gènes responsables de la formation de biofilm. Ce qui nous permette d'aspirer altérer le système de régulation de biofilm 'quorum sensing' pour la lutte contre la formation de ce dernier.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

A

Aouati, H. (2009). Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthécillines: étude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques. Département De Biochimie et De Microbiologie, algérie: thèse N° : 006 / SN / 2009.

Adjidé C.C., Biendob M., Rousseau F., Hamdad-Daoudib F., Thomas D., Laurans G et al., (2009). *Escherichia coli* producteurs de bêta lactamases à spectre étendu : de nouvelles menaces nosocomiales. *Pathologie Biologie*; 54 :510–517.

Amazian, K., Rossello, J., Castella, A., Sekkat, S., Terzaki, S., Dhidah, L. et al. (2010) [Prevalence of nosocomial infections in 27 hospitals in the Mediterranean region]. *East Mediterr Health J* 16: 1070-1078.

Amrouni S., Touati M., Hadeff Y., et Djahoudi A. (2014). Effet de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et de *Thymus ciliatus* sur *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 carbapénémase. *Phytothérapie*, 12(5), 309-313

Annous, B., Fratamico, P. and Smith, J. L. (2009), “Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do”, *Journal of Food Science*, Vol. 74 No. 1, pp. 24–37.

Avril J.L., Dabernat H., Denis F. and Monteil H. (2003). Bactériologie clinique. 3ème édition. ellipses, Paris. 8-28.

B

Balestrino D.(2006). formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae* : facteurs impliqués et rôle du quorum sensing. thèse de doctorat, université d'Auvergne 5P.

Behlou, I. & Gilmore, M. S. (2008). Microbial biofilms in ophthalmology and infectious diseases. *Arch Ophthalmol* 126, 1572-1581.

Bellifa S., Hassaine H., M'hamedi I., Kara Terki I., Lachachi M., Didi W., (2013). Formation of biofilm in microfermentor by *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical devices at the university hospital of Tlemcen. 4th International Workshop on Biotechnology. Tlemcen. Algeria.

Beloin, C., Roux, A. & Svanborg, C. (2005) *Escherichia coli*, biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322, 249-289.

Belhaj Soulami Omar (2010). surcoute de l'infection nosocomiale en réanimation médicale au chu ibn rochd (a propos de 10 cas), université sidi Mohammed ben Abdellah faculté de médecine et de pharmacie, Fès. Thèse N° 091 ; p : 38-39.

Bendinger B., Rijnaarts H. H., Altendorf K., Zehnder A. J. (2003). Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Applied and environmental microbiology*. 59(11): 3973-3977.

Benslimani A., Meieddine C., (2012). État de la résistance aux antibiotiques, d'autres espèces bactériennes et surveillance des bactéries multirésistantes (BMR) : SARM, entérobactéries BLSE, *Acinetobacter sp*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas aeruginosa* résistants à l'imipénème, à la ceftazidime et à la ciprofloxacine. In: Réseaux algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (ed) 13^e rapport d'évaluation, pp. 65–88.

Bergmans,D.C., Bonten,M.J., van Tiel,F.H., Gaillard,C.A., van der Geest,S., Wilting,R.M. et al. (1998) Cross-colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* of patients in an intensive care unit. *Thorax* 53: 1053-1058.

Bernard, L. 2006. Mécanismes physiopathologiques des infections orthopédiques. *Rev. Rhumatol.* 73: 327-331.

Berthelot P., Grattard F., Mallaval F.O., Ros A., Lucht F., Pozzetto B., (2005). Épidémiologie des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathologie Biologie* 53: 341-348.

BIOKAR. (2009).Gélose de Mac Conkey. www.solabia.com

BIO-RAD. (2007) Chapman - mannitol saït agar. www.afnor-validation.org

Boutaleb N. (2007). Étude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse de doctorat. Universités de Bretagne-Sud, France. 174 pages.

C

Castro Melo P., Ferreira L .M., Filho A. N., Zafalon L. F., Godoy Vicente H .I., de Souza V.(2013). Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis.*Brazilian journal of microbiology*.44 (1): 1517-8382.

Ceri H., Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A (1999) The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 1771-1776.

Couture B. (1990). Bactériologie médicale «Etude et méthodes d'identification des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical». Vigot, Paris. 15-32.

Coures - infectieux - Infection nosocomiale. (2009). Soins infirmiers et gestion des risques- l'UE 4.5.S2. <http://www.infirmiers.com> .

Comité éditorial pédagogique de l'Université Médicale Virtuelle Francophone (UVMaF) ; Hygiène hospitalière. (2011). <http://www.uvmf.org>.

Commission Européenne. (2011). Communication de la Commission au Parlement Européen et au Conseil; Plan d'action pour combattre les menaces croissantes de la résistance aux antimicrobiens; Direction générale de la santé et des consommateurs; Bruxelles ; p: 2.

Costerton J.W., Geesey G.G., Cheng K.J.(1978).how bacteria stick *Sci Am.* 238 :86-95.

Chaalal, W. (2013). Occurrence et profil d'antibiorésistance des *Staphylococcus aureus* isolée de produits alimentaires. université d'Es-senia Oran, Algérie.

Characklis WG, Marshall K.C. (1990). Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.

Christensen GD., Simpson WA., Bisno AL., Beachy EH. (1985). Adherence of biofilm producing strains of *Staphylococci epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity* 37: 318-326.

Christophe C. (2013). Comment prévenir la colonisation d'implants par des pathogènes ? - centre national de la recherche scientifique. [www. Chimie 2.0](http://www.Chimie.2.0).

D

Danis,F.,Poly,M.C.,Martin,C.,Bingen,E.& Quentin, R(2007).Bacilles à Gram négatif non fermentaire, Genre Pseudomonas.In Bactériologie Médicale, techniques usuelle, pp.330-343.Edited by E.Masson.

De Chalvet De Rochemonteix A. (2009). Thèse de Doctorat .Les biofilms et la peau. La faculté de médecine de Créteil.

Denis F.Bactériologie médicale (2011) : technique usuelles Elsevier Masson, 2011 :430-524

Denis C. (2013).les infections associés aux soins, Définitions, structuration de la lutte contre les IAS en France

Dominique G, VALENCE B et al. (2013). Études supérieures de stérilisation Hospitalière, document d'information.

Donlan RM (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Disease journal*. 8 (9): 881-890

Donlan RM, Costerton JW. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*.15: 167- 193.

Dumas C. (2007). Catalyse électro-microbienne dans les piles à combustible. Thèse de Doctorat. Institut National polytechnique de Toulouse. 306 pages.

Dunne W.M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?.*Clinical microbiology reviews*. 15(2): 155-166.

E

Euzéby J.P. Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire (2004).

Echchelh Adil , Saouide el ayne Nabila, Chaouch Abedelaziz, Auajjar Nabila, Hamama Samir, Soulaymani Abdelmajid(2014). Rôle de l'environnement hospitalier dans la prevention des infections nosocomiales: surveillance de la flore des surfaces a l'hopital el idrissi de kenitra – MAROC. *European Scientific Journal March 2014 edition vol.10, No.9* ISSN: 1857 – 7881 (Print) e - ISSN 1857- 7431

El Kouir, D. P. (2003). Infections à staphylocoques : aspects cliniques et bactériologiques. *EMC, maladies infectieuses* , [8-007-A-10].

Espinasse,f., Page,B. & Cottard-Bouelle,B.(2010).Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs.Revue Francophone des Laboratoires 426,51-63.

F

Fauchere J.L. and Avril J.L. (2002). Bactériologie générale et médicale. ellipses, Paris. 213-217.

Faure,E.(2002)."Les infections nosocomiales.
"http://www.caducee.net/dossierspecialises/infection/nosocomiales.asp.

Filloux,A. et Vallet, I.(2003).risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs.Med Sci (Paris) 19, 77-83.

Ferron A. (1984). Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine. 12ème édition. CROUAN et ROQUES, Paris. 87-94.

Foster, T. 1996. *Staphylococcus*. In: S. Baron, Editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX). University of Texas Medical Branch at Galveston.

Fuentefria DB, Ferreira AE, Corção G. Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water. Are they genetically related? *J Environ Manage* 2011; 92:250-5.

Fletcher M (1988). Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium- substratum separation distance. *Journal of Bacteriology*. 170: 2027-2030.

Florence E, Bernard P, Brigitte. (2010). Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs; *Revue Francophones des laboratoires*:52-57.

Folkesson, A., Haagensen, J. A. J., Zampaloni, C., Sternberg, C. and Molin, S. (2008). "Biofilm induced tolerance towards antimicrobial peptides", *Public Library of Science*, Vol. 3 No. 4, pp. 1-11

G

Garnier F, Denis F. (2007). Bactériologie médical : Techniques usuelles : Cocci à Gram positif. Masson. Chapitre 29 .251, 254.

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

H

Hafiane,A., and Ravaoarino, M. (2008) [Various typing methods of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients]. *Med Mal Infect* **38**: 238-247.

Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2(2): 95-108.

Hamadi F., Latrache H., El Ghmari A., Ellouali M., Mabrouki M., Kouider N. (2004). Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and electron acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Annals of Microbiology*. 54: 213-225.

Harris, L. G, S. J. Foster et R. G. Richards. (2002). An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *Eur. Cells Mater.* 4: 39-60.

Harris, L. G. et R. G. Richards. (2006). Staphylococci and implants surfaces: a review. *Injury, Int. J. Care Injured* 37: S3-S14.

Henerici A., T., (1932), studies of freshwater bacteria i. a direct microscopic technique, *Journal of bacteriology*, 25.

Henri Leclerc, (2002) .Presse therm climat 2002; BACTERIOLOGIE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA Service de bactériologie. Centre hospitalier de Lille.139: 9-13

Høiby, N., Ciofu, O., Johansen, H. K., Song, Z. J., Moser, C., Jensen, P. and Bjarnsholt, T. (2011),“The clinical impact of bacterial biofilms”, *International Journal of Oral Sciences*, Vol. 3 No. 2, pp. 55-65

Hou W., Sun X., Wang Z. et al., (2012), Investigative Ophthalmology & Visual Science, *The Association for Research in Vision and Ophthalmology.* (53) : 9.5624.5631

Hola V. et Ruzicka F., (2011), The Formation of Poly-Microbial Biofilm on Urinary Catheters, *Urinary Tract Infections*, 153- 172.

I

IFSI CROIX ROUGE. (2006). Prévention des Infections Nosocomiales : rôle des Infirmiers(es).

Irie Y. et Parsek M., (2008). Quorum sensing and microbial biofilm, *Curr Top Microbiol Immunol*, 322: 67-84.

J

Jain, A., Marsili, E. and Bhosle, N. B. (2011), “The Biofilm Returns: Microbial Life at the Interface”, *Microbes and Microbial Technology*, Springer, New York, pp. 59-85

Jacobsen, S.M., Stickler, D.J., Mobley, M.L. & Shitliff, M.E. (2008). Complicated Catheter-associated urinary tract infectious due to *E. coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev* 21, 26-59.

Japoni A, Farshad S, Albozi A. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: Burn infection, Treatment and Antibacterial Resistance. *IRCMJ*;11:244-53.

Jean C. (2002). Les infections liées aux soins médicaux ; *Adsp* n° 38, p : 23.

Jefferson KK., (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.*, **236**, 163-173.

Joshi, P., Wadhvani, T., Bahaley, P. and Kothari, V. (2010), “Microbial Chit-Chat: Quorum Sensing”, *The IUP Journal of Life Sciences*. Vol. 4 No. 1, pp. 59-72

K

Kara Terki I., Hassaine H., Bellifa S., M’hamedi I., Lachachi M. (2011). Infection urinaire nosocomiale : Etude prospective dans une unité de réanimation médicale à l’ouest Algérien. *Revue de Microbiologie Industrielle Sanitaire et Environnementale* .6(1) : 118-130

Kurlenda, J. et M. Grinholc. (2012). Alternative therapies in *Staphylococcus aureus* diseases. *Acta Biochim. Pol.* **59**:171-184.

Khadir A.M. (2013). Effet inhibiteur de certains extraits de plantes aromatiques sur des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline SARM isolées du CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat: Université Abou Bekr Blekaid Tlemcen option microbiologie.123P.

Kloos W.E. and Veron M. (1990). Bactériologie Médicale «*Staphylococcus* et *Micrococcus*» J.Fleurette 2ème édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 773-794.

L

Laurent, F.(2011). Biofilm bactérien. Université de Médecine de Lyon. http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/seminaires_desc/2011-mai/desc_mai2011-biofilm-laurent.pdf

Lasheras A, Monnin D. (2008). Micro-organismes et voies de transmission.

Lewis k. (2010). *Ann Rev Microbiol*, 64 :357 .

Liesse Iyamba J M. (2012). Etude de l’interaction des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* avec une surface abiotique. Thèse de doctorat : Université libre de Bruxelles, Faculté de Pharmacie, Ecole Doctorale en Sciences Pharmaceutiques. 226p.

Lilet C.; J Bourdon ; B Toma ; N Marchal et C. Balbastre (1983) ; Bactériologie médicale et vétérinaire- systématique bactérienne ; Edition DOIN. PP 150-190.

Lister,P.D., Wolter,D.J., and Hanson,N.D. (2009) Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* **22**: 582-610.

M

Margot P, Chantal G. (2009). Les infections nosocomiales - Agir ensemble pour des milieux cliniques sains et sécuritaires, La gestion des risques 1re partie ; p : 1-19.

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

Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay DJ., Fatma T., Rattan A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 24: 25-29

Méité S. Boni-Cissé C. Monemo P. Mlan Tanoa Ap. Faye-Ketté H. Dosso H. (2010). Surveillance microbiologique des surfaces au niveau d'un établissement hospitalier de niveau tertiaire : exemple du chu de Yopougon, abidjan, cote d'ivoire. *J. sci. pharm. biol.*, Vol.11, n°1 - 2010, pp. 73-81.

Merah Mostefa (2011). Contribution a l'Etude qualitative de Quelques Groupes de Bacteries Isolees du Bloc Operatoire de l'Etablissement Public Mohamed Boudiaf de Ouargla : Profil et Sensibilite aux Antibiotiques. *Annales de la Faculté des Sciences et Sciences de l'Ingénieur* Vol. 1 N° 4/2009.

Menzinger S, Schneider A, Tschopp C. (2008). Immersion en communauté Infections nosocomiales.

Mesaros N., Nordmann P., Plésiat P., Roussel-Delvallez M., Van Eldere J., Glupczynski Y., ... Van Bambeke, F. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: résistance et options thérapeutiques à l'aube du deuxième millénaire. *Antibiotiques*, 9(3), 189-198.

Minchella, A., Molinari, L., Alonso, S., Bouziges, N., Sotto, A., and Lavigne, J.P. (2010) [Evolution of antimicrobial resistance against *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital between 2002 and 2006]. *Pathol Biol (Paris)* **58**: 1-6.

Ministère de la santé et des solidarités. (2006). Guide de prévention des infections liées aux soins en chirurgie dentaire et en stomatologie, DGS, France ; p : 72.

Ministère du travail, de l'emploi et de la santé .(2010). Infections Nosocomiales : Direction générale de l'offre de soins- Bureau qualité et sécurité des soins ; p : 3.

Mittal R., Aggarwal S., Sharma S., et al., (2009), Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Infection and Public Health*, **2**: 101—111.

Monnet T. (2011). Les infections nosocomiales : L'importance d'un suivi épidémiologique et de l'identification rapide des bactéries en causes, thèse de doctorat a la faculté de pharmacie de Grenoble ; dumas 2012. P : 15-16.

Motaouakkil S, Aalloula O. (2011). Infections nosocomiales : L'affaire de tous, 2em Edit .<http://www.Doctinews.com> .

N

Nasr SA., AbuShady H M., Hussein HS. (2012). Biofilm formation and presence of *ica* AD gene in clinical isolates of staphylococci. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 1110-8630.

Nobbs, A. H., Lamount, R. J. and Jenkinson, H. (2009), "Streptococcus adherence and colonization", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 73 No. 3, pp. 407-505

O

OIE. (2014).liste oie des agents antimicrobiens importants en médecine vétérinaire.

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

Otto, M. 2012. MRSA virulence and spread. *Cell. Microbiol.* **14**: 1513-1521.

P

Peeters.E., Nelis, H. J. & Coenye, T. (2008).Compaaison of multiple méthodes for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* **72,157-165.**

Prescott, L. M. (2009). *MICROBIOLOGIE (2eme éd).* FRANCE: De Boeck.

R

Raisin-a national program early warning investigation and surveillance of healthcare associated infection in France. Descenlos JC RAISIN working group eurosurveil 2009:14(46) pil: 19408).

Racha A. N., Abu Shady H.M., Hussein H.S. (2012).Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. *Egyptian Journal of Medica. Human and Genetic* .13: 269–274.

Ramiro P. (2006). Dispositifs Médicaux Concepts et réalités de terrain, guide juridique et pratique. walraeve-bresson@sante.gouv.

Reboux S, Lessire M, Kocalénios C et al. (2002). Réseau Inter-hospitalier de Prévention des Infections Nosocomiales ; RIPIN, CHU Grenoble.

Rebiahi S .A. (2011).Caractérisation de souches de *Staphylococcus aureus* et étude de leurs antibiorésistance au niveau du centre hospitalo universitaire de Tlemcen. Thèse de doctorat : Université de Tlemcen, Option Microbiologie.168P.

Rossello J, Amazian K, Castella A et al. (2010). Prévalence des infections nosocomiales dans 27 hôpitaux de la région méditerranéenne, Eastern Mediterranean Health Journal. Rev de Santé de la Méditerranée orientale, EMHJ • Vol. 16 No.10 ; p : 1074.

S

Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B.S., Vabic-Vlahovic M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 40: 175–179.

Spormann AM. (2008). Physiology of microbes in biofilms stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*.5208- 5218

Swissmedic. (2005). Bonnes pratiques de retraitement des dispositifs médicaux stériles .www.swissmedic.ch/md.asp.

T

Talaro, Kathleen, Park (2008), *Foundation in Microbiology: Basic Principles*, McGraw-Hill, New York

Talon,D., Capellier,G., Boillot,A., and Michel-Briand,Y. (1995) Use of pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiologic tool during an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* lung infections in an intensive care unit. *Intensive Care Med* **21**: 996-1002.

Tenke,P.Kovacs,B.,Jackel,M.& Nagy,E.(2006).The role of biofilm infection in urology. *World J Urol* **24**,13-20.

Touati A., Achour W., Abbassi et al., (2007), Détection des gènes ica et de la production de slime parmi des souches de *Staphylococcus epidermidis* isolées d'infections liées aux cathéters chez des patients neutropéniques, *Pathologie Biologie*,

55 : 277–282

Trautner B., W., Darouiche R., O., (2009), Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection, *Am J Infect Control*, **32** (3), 177–183.

Trautner,B.W.& Darouiche,R.O.(2004a).catheter-associated infection.pathogenesis affects prevention.Arch Intern Med 164-842-850.

V

Vallet I., Olson J. W., Lory S., Lazdunski A. &Filloux A., (2001), The chaperone usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gen clusters (cup) and their involvement in biofilm formation, *Processing of the National Academy of Science of USA*, **98** (12), 6911–6916.

Vande P et al. (2006). Recommandations en matière de stérilisation, conseil supérieur d'hygiène p : 65.

Vincenot, F., M. Saleh et G. Prévost. 2008. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Rev. Fr. Labo.* **407**: 61-69.

Vincent A, Saint GenisLaval,Laprugne-Garcia E, Saint Genis Laval.Infections Associées Aux Soins définition, Fréquence et facteurs de risque.Octobre 2008 ; CCLIN Sud-Est.1-5.

Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J. and Ivanova, E. P. (2009), “Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation”, *Molecules*, Vol. 14 No. 7, pp. 2535-2554.

W

Wendt C, Wiesenthal B, Dietz E, Ruden H. (1998). Survival of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococci on dry surfaces. *J ClinMicrobiol*; 36:3734-6.

Y

Yannick D.N., Skander T., Mario Jacques H. (2014). Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can. J. Veterinary. Res.* **78**:110-116.

Z

Ziebuhr W., Lobner I., Krimmer V., Hacker J. (2001). Methods to detect and analyse phenotypic variation in biofilm-forming. *Methods in Enzymology.* 336: 195-203.

Annex

Annexe 01 : Milieux de culture

1. Milieu de Chapman :

Composition:

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

Extrait de viande (bovin ou porcin).....	1g
Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin).....	10g
Chlorure de sodium.....	75g
Mannitol.....	10g
Agar.....	15g
Rouge de phénol.....	0,025g

pH=7,6

Préparation : 111g par litre d'eau distillée. stérilisation à l'autoclave : 15 minutes à 120°C.

2. Gélose nutritive pour la conservation

Composition :

Peptone.....	10.0g
Extrait de viande.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Agar.....	10.0g

pH=7.3

Préparation : prêt à l'emploi en petits tubes fins.

5. Bouillon coeur-cervelle (BHIB) :

Composition :

Infusion de cervelle de veau.....	12.5g
Infusion de coeur de boeuf.....	5.0g
Peptone.....	10.0g
Glucose.....	2.0g
Chlorure de sodium.....	2.0g
Phosphatase di sodique.....	5g

pH= 7.4

Préparation : 37g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C, 20min.

Annexe 02 : Réactifs de la coloration de Gram

Violet de gentiane:

Phénol.....	2.0 g
Violet de gentiane.....	1.0 g
Éthanol à 90°.....	10 ml
Eau distillée.....	100 ml

Lugol:

Iodure de potassium.....	2.0 g
Iode métalloïde.....	1.0 g
Eau distillée	300 ml

Alcool (éthanol)

Fuschine de ziehl:

Fuchine basique.....	1.0g
Phénol.....	5.0 g
Éthanol à 90°.....	10 ml
Eau distillée	100 ml

ملخص :

الشريط الحيوي هو مجموعة من الكائنات الحية الدقيقة التي تتمسك بالسطح . قد يتشكل هذا الشريط على الأنسجة الحية مثلما يتشكل أيضاً على المساحات الصلبة ، و الغرض من هذه الدراسة هو اختبار قدرة الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* و العنقوديات *Staphylococcus aureus* المعزولة من المساحات الإستشفائية ، المستشفى الجامعي – تلمسان – على تشكيل شريط حيوي (البيوفيلم) بواسطة طريقتين مختلفتين . هذه الدراسة سمحت لنا بعزل 12 *Staphylococcus aureus* ما يعادل 36% من مجموع الكائنات المعزولة و 21 *Pseudomonas aeruginosa* ما يعادل 64% . إن أغلبية البكتيريا المعزولة لها قدرة عالية لإنتاج الشريط الحيوي .

الكلمات المفتاحية : *Staphylococcus aureus* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، شريط حيوي ، مساحات إستشفائية ، عدوى المستشفى .

Résumé :

Un biofilm est une communauté de micro-organismes qui s'adhèrent à la surface. Ce biofilm peut se former sur des tissus vivants comme il se forme sur des surfaces inertes. Le but de cette étude est de tester la capacité de *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* isolées à partir des surfaces hospitalières du CHU Tlemcen à former un biofilm par deux méthodes. Méthode de Plaque de Culture de Tissus (TCP) et la méthode de Rouge Congo Agar (RCA). Notre étude nous a permis d'isoler un nombre de 12 souches de *Staphylococcus aureus* soit 36% et 21 souches *Pseudomonas aeruginosa* soit 64%. La majorité des souches collectées sont fortement productrices de biofilm.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* , biofilm, surfaces hospitalières, infection nosocomiale.

Abstract :

A biofilm is a community of microorganisms that adhere to the surface. This biofilm can form on living tissue as it forms on abiotics surfaces. The purpose of this study is to test the ability of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* isolated from abiotic surface of Tlemcen University Hospital- to form a biofilm by two methods. Method of Tissue Culture Plate (TCP) and the method of Red Congo Agar (RCA). Our study allows us to isolate a number of 12 strains of *Staphylococcus aureus* 36% and 21 *Pseudomonas aeruginosa* 64%. The majority of the collected strains are strong producers of biofilm.

Keywords : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, biofilm, abiotic surface, nosocomial infection.