

République Algérienne Democratique Et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université «SAAD DAHLAB » BLIDA
Faculté des Sciences Agro -Vétérinaires et Biologiques
Département de Biologie
Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme Master
en Biologie
Option : Microbiologie-Bactériologie

Thème :

**Etude *in vitro* de l'activité bactéricide,
sporocide et fongicide de quatre
antiseptiques cutanés vis-a-vis des souches
de collection.**

Présenté par :

Khadija TAHAR -DJEBBAR

Date de soutenance: 23/ 12/2013.

Devant le jury composé de :

A. Bessad	Maitre de conférences	MCB USDB	Président
F. M^{ed} Mahmoud	Maitre assistante	MAA USDB	Examinatrice
N. Boukhatem	Maitre assistant	MAA USDB	Examineur
N. Ait Saadi	Maitre assistante	MAA USDB	Promotrice
S. Kezzal	Pharmacien Chef Laboratoire	IPA	Invité

Promotion 2012-2013

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier Dieu le tout puissant, pour m'avoir donné la force ; la patience et la santé durant toutes ces années d'étude.

*J'ai la chance d'effectuer ce travail minutieux sous la direction de **M^{me} Ait Saadi.N** maître Assistante « A » à l'USDB (Département de biologie), qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance de m'avoir accordé sa confiance et guidé dans mon travail tout au long de cette étude, ses compétences, ses précieux conseils, sa disponibilité et sa gentillesse à mon égard ont contribué au bon déroulement de ce travail.*

*J'exprime mes respectueux remerciements à **M^r Bessad** maître de conférence « B » à l'USDB pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de soutenance, et soyez assuré de tout mon respect.*

*Je tiens à exprimer mes reconnaissances à **M^{me}M^{ed} Mahmoud. F** maitresses assistantes « A », aussi bien à **M^r Boukhathem** maître assistante « A » pour avoir accepté d'examiner ce travail ; veillerez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mes sincères remerciements.*

*A mes responsables du laboratoire de contrôle de qualité à l'institut Pasteur d'Alger : **M^r Nouas .M** qui m'a donné l'opportunité de continuer ce master ; **M^r Kezzal .S** pour son aide et son encouragement; **M^{me} Touabti .N** pour sa gentillesse et sa spontanéité ; **M^r Menouari .M.N** mon premier chef de service qui m'a orienté et conseillé dans mes débuts à l'Institut Pasteur, et **M^{me} Benguergourra. ,** notre nouvelle chef département, pour ses encouragements, sa compréhension, souhaitant une bonne continuité et un bon courage dans son travail. Je tiens à vous remercier et je suis reconnaissante pour la confiance que m'avez accordés, votre gentillesse, disponibilité et encouragements.*

*J'adresse aussi mes remerciements, mes reconnaissances les plus sincères à **M^{me} Eddeikra.A** et **Eddeikra.N** pour leurs sympathies, conseils et leurs aides précieuses, merci infiniment.*

Mes sentiments de reconnaissance s'adressent également à M^r Hamaidi .M.S responsable d'option master microbiologie –bactériologie (USDB).

Mes sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également à toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail. En particulier, à M^r Zarfa .A, le responsable de centre de calcul de département de la biologie.

Mes vifs remerciements vont à tous les enseignants du master I et II du Département de Biologie de l'Université de l'USDB et à mes collègues et mes amis pour les moments sympathiques que nous avons passé ensemble.

Dédicaces

*Je tiens à remercier **le Dieu** tout puissant de m'avoir donné le courage, la volonté et la patience pour continuer et de mener à bien faire ce mémoire du Master.*

*C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde, **ma mère**, qui m'a donné la vie et qui m'a toujours aimé et comblé par ses bénédictions ; à la mémoire de **mon père**, que dieu le tout clément.*

Je dédie aussi cette modeste réalisation :

*A mes chères sœurs et frère : **Amina ; Djaouida & Bachir**, pour leurs encouragements et tous les moments passés ensemble.*

*A mon mari **Mohamed** ; Je te remercie infiniment pour ton soutien et encouragement*

*A mes enfants **Mounia ; Riadh et Meriem**.*

*A tous mes collègues de l'Institut Pasteur d'Algérie et en particulier mes collègues du laboratoire de contrôle de qualité Ancien et Nouveau : **M.Seghoani ; A.Boukhachabia ; L. Issiakhem ; A.Aneche ; C.Chenafi M et A.Daoud ; M.Allouache ; S.Nazef ; M.Hamlat ; L.Azizi ; A.Belahwane ; A.Mokrani ; A. Zaiïdi ; N.Seghoani et sans oublier : Sid Ahmed ,Ali, Mustapha, Fouzia, Yamina, Souad, nesrine, Amina, Radia, Sid Ali, Zineb, Chahnez, Houda, Mahmoud et Louiza.***

*A toutes personnes qui me reconnaissent en particulier mes amies : **S. Djeghboub ; N.Cherif, Samira, Assia AA** qui m'ont beaucoup aidé ; **M.Tlidjani ; K.Tayebi .K et M.Lehllali** et à tous les Meriem que je connais. Je leur dédie ce modeste travail en signe de ma profonde tendresse et ma sincère amitié.*

*Et en fin à toute la promotion de Master Microbiologie –Bactériologie de l'année universitaire : **2012-2013**.*

Khadija

Liste des tableaux

Tableau I : Distinction entre l'antisepsie et la désinfection selon le comité européen de Normalisation.....	4.
Tableau II : Composition de la flore résidente.....	Annexe 1
Tableau II : Propriété des principales familles d'antiseptiques.....	7, 8, 9
Tableau III : Spectre d'activité des principales familles d'antiseptiques.....	10
Tableau IV : Résistance plasmidique des antiseptiques et des désinfectants.....	Annexe 2
Tableau V : Origine et conditions de repiquage des souches de référence.....	25
Tableau VI : Normes Afnor et EN applicables aux antiseptiques et désinfectants miscibles à l'eau.....	Annexe 3
Tableau VII: Antiseptiques testés, principes actifs, formules chimique, dilutions, indication thérapeutique.....	27, 28
Tableau VIII : Résultats d'étude des différentes caractéristiques des souches de références Confirmants leurs identités.....	Annexe 10
Tableau IX : Résultats du non contamination des antiseptiques étudiés.....	50
Tableau X : Résultats Essai préliminaire du polyvidone iodé (Septidine ®)	52
Tableau XI : Concentration minimales bactéricides, sporocides et fongicides en mg\ L du Polyvidone iodée 10% (Septidine®).....	53
Tableau XII : Résultats Essai préliminaire du digluconate de chlorhexidine.....	55
Tableau XIII : Concentration minimales bactéricides, sporocides et fongicide du digluconate De chlorhexidine 0,5%.....	57
Tableau XIV : Résultats Essai préliminaire d'Alcool chirurgical 90°.....	60
Tableau XV : Concentrations minimales bactéricides, sporocides, fongicides en mgL d'Alcool chirurgical 90°.....	62
Tableau XVI : Résultats Essai préliminaire d'Eau oxygénée 10V.....	64
Tableau XVII : Concentrations minimales bactéricides, sporocides et fongicides d'Eau Oxygénée 10V.....	66

Liste des figures

Figure 01 : Mode et Mécanismes d'action des antiseptiques et désinfectants.....	7
Figure 02 : Sources de contamination en milieu hospitalier : La peau.....	14.
Figure 03 : Source de contamination en milieu hospitalier : la tenue vestimentaire.....	14
Figure 04 : Source de contamination en milieu hospitalier : Le système pileux, a – La barbe ; b – Les cheveux.....	15
Figure 05 : source de contamination en milieu hospitalier : L'environnement.....	15
Figure 06 : Représentation schématique des enveloppes des bactéries à Gram positifs et des bactéries à Gram négatifs.....	17
Figure 07 : Identification biochimique des souches testées par les galeries API®	Annexe 9.
Figure 08 : Présentation des quatre antiseptiques retenus pour l'étude : Polyvidone iodée (Halogène iodée), Digluconate de chlorhexidine (Biguanide), Alcool Chirurgical 90°(Alcool) et L'Eau oxygénée 10V(Oxydant).(Original).....	26
Figure 9 : Présentation de la gamme des dilutions des quatre antiseptiques testés préparée Pour les essais proprement dit.	29
Figure 10 : Préparation de l'inoculum bactérien de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , et <i>Staphylococcus aureus</i>	32
Figure 11 : Schéma d'essai préliminaire pour une souche bactérienne et une seule dilution du Produit a testé	34
Figure 12 : Schéma d'essai proprement dit pour une souche bactérienne et une dilution du Produit a testé	36
Figure 13 : Préparation de l'inoculum de spores de <i>Bacillus subtilis</i>	38
Figure 14 : Schéma d'essai préliminaire d'activité sporocide.....	40
Figure 15 : Schéma d'essai proprement dit d'activité sporocide.....	42
Figure 16 : Préparation de l'inoculum de la levure de <i>Candida albicans</i>	44
Figure 17 : Schéma d'essai préliminaire d'activité fongicide.....	45
Figure18 : Schéma d'essai proprement dit d'activité fongicide.....	47
Figure 19 : Concentrations minimales bactéricides, sporocides et fongicides en mg/l du Polyvidone iodée 10%.....	54
Figure 20 : Concentrations minimales bactéricides, sporocides et fongicides en mg/l du	

Digluconate de chlorhexidine.....	59
Figure 21 : Concentrations minimales bactéricides, sporocides et fongicides en mg/l d'Alcool Chirurgical 90°	63
Figure22 : Concentrations minimales bactéricides, sporocides et fongicides en mg/l d'Eau Oxygénée 10V.....	67
Figure 23 : Schéma représentatif du mode d'action du polyvidone iodée dans la cellule Microbienne.....	71
Figure 24 : Schéma représentatif du mode d'action du di gluconate chlorhexidine sur la Membrane de la cellule microbienne.....	74

Résumé

Les antiseptiques jouent un rôle principal dans la prévention et la lutte contre les infections. La bonne gestion de ces produits permet de limiter l'utilisation des antibiotiques et donc limiter l'émergence de souches microbiennes résistantes qui constitue un véritable problème de santé publique.

Notre travail consiste à une étude *in vitro* de l'activité bactéricide, sporocide et fongicide de quatre antiseptiques cutanés : Polyvidone iodée PVPI, Digluconate de Chlorhexidine, Alcool chirurgical 90° et Eau oxygénée 10V. Nous avons basé sur des normes Européennes (Afnor et CEN) : NF T72-150 / NFEN1040 (bactéricidie : *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S.aureus*), NF T 72-230/ NF EN14347 (sporocidie : spores de *Bacillus.subtilis*) et NF T 72-200/ NFEN 1275 (fongicidie : *Candida.albicans*), édition 1989 / révisé en 1997, 2005 et 2006.

L'établissement de ces procédures, nous a permis d'une part une mise au point des différents techniques et une appréciation de la standardisation des méthodes pour l'évaluation d'autres antiseptiques, et d'autre part l'étude de l'activité antimicrobienne des quatre antiseptiques cutanés, nous a permis d'étudier facilement le comportement des souches testées en terme de sensibilité et de résistance et déterminer les concentrations minimales germicides, et cela nous a conduit à conclure que la polyvidone iodée est le meilleur antiseptique antimicrobien, suivie de digluconate de chlorhexidine, d'Alcool chirurgical 90° et l'Eau oxygénée 10V.

Mots clés : Antiseptique, Activité antimicrobienne, concentration minimale, Résistance

Summary

The disinfectants play a part principal in the prevention and the fight against the infections. The good management of these products makes it possible to limit the use of antibiotics and thus to limit the emergence of resistant microbial stocks which constitutes true public health problems.

Our work consists has an in vitro study of the bactericidal activity, sporocide and fungicide of four cutaneous disinfectants: Polyvidone iodéePVPI, Chlorhexidine, surgical Alcohol 90°et the Hydrogen peroxide 10V, One was based on European standards (Afnor and CEN) : NF T72-150/ NFEN1040 (bactéricidie), NF T726230/NF EN14347 (sporocidie) and NF T72-200 NFEN 1275 (Fongicidie), édition 1989/ revised in 1997, 2005 and 2006.

The establishment of these procedures, has allows to us on the one hand a settling of different the techniques and an appreciation from the standardization of the methods for the evaluation of another disinfectants, and on the other hand the study of the antimicrobial activity of four cutaneous disinfectants, has enables to us to easily study the behavior of the stocks tested in term of sensitivity and resistance and to determiny the microbicide minimal concentration , that has us conduit has to conclude that the iodized polyvidone is the best antimicrobial disinfectant, followed chlorhexidine, of surgical alcohol 90° and hydrogen peroxide 10V.

Key words: Disinfectant, antimicrobial Activity, Minimal concentration, Resistant.

ملخص

المطهرات تلعب دورا رئيسيا في منع ومكافحة العدوى. الإدارة السليمة لهذه المنتجات يمكن أن تحد من استخدام المضادات الحيوية، وبالتالي الحد من ظهور السلالات المقاومة، وهي مشكلة حقيقية للصحة العامة

مهمتنا هي دراسة في المختبر للنشاط القاتل للبكتيريا ، والفطريات لأربع مطهرات للجلد بوفيدون اليود (PVPI)والكلور هيكسيدين، والكحول 90 ° الجراحية وبيروكسيد الهيدروجين V10، وكان يقوم على المعايير الأوروبية (NFEN1040 ، NF EN14347 وNFEN (1275) ، التي نشرت عام 1997، المعدل في 2005 و 2006)

إنشاء هذه الإجراءات يسمح لنا أولا بتطوير تقنيات مختلفة وتقدير توحيد أساليب لتقييم المطهرات الأخرى، وثانيا دراسة النشاط القاتل للمكروبات لأربع مطهرات الجلد مضاد للميكروبات، ويسمح لنا بدراسة سلوك السلالات بسهولة من حيث الحساسية والمقاومة ، وكان قد أدى بنا إلى استنتاج أن بوفيدون اليود هو أفضل مطهر مضاد للميكروبات، تليها الكلور هيكسيدين،الكحول الجراحي90 درجة وبيروكسيد الهيدروجين V 10.

الكلمات المفتاحية : مطهر، النشاط المضاد للجراثيم ، التركيز الأدنى القاتل .

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFNOR : Association Française de Normalisation.

AMM : Autorisation de Mise au Marché

API : Appareil et procédés d'identification

ATCC : American Type Culture Collection

CAAP : Contact Avis Pharmacologique et Pharmaceutique

CEN : Comité européenne de normalisation

CCLIN : Centre de Coordination de Lutte contre les Infection Nosocomiales

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMF : Concentration Minimale Fongicide

CMS : Concentration Minimale Sporocide

D O : Densité optique

IPA : Institut Pasteur d'Algérie

LPS : Lipopolysaccharide

MSRH : Ministère de la santé et de la réforme hospitalière

NF EN : Norme française European Norm

PCA : Plate Count Agar

PH : Potentiel d'hydrogène

PVP-I : Polyvidone iodée

TSA : Tryptocase Soja Agar

SAB : Sabouraud

SFHH : Société Française d'hygiène d'hospitalier

Glossaire

Antifongique : Substance active contre les champignons ou levures parasites de l'homme ou des animaux (*Glossaire biologique., 2012*). Et selon **Russel et al**, Le mot antifongique, qualifie un produit ou un procédé dont on ne précise pas si son activité est fongicide ou fongistatique (*Russel et al., 2004*).

Bactéricide : Produit ou procédé ayant la propriété de tuer les bactéries dans des conditions définies (*Norme Afnor et EN, NF EN 1040., 2006*).

Bactériostatique : c'est un produit ou un procédé ayant la propriété d'inhibé momentanément des bactéries dans des conditions définies (*Norme Afnor, et NF 1040., 2006*).

Bio film : Est une communauté plus ou moins complexe, de microorganismes (bactéries, champignons, algues ou protozoaires), adhérent entre eux et à une surface, caractérisé par un comportement coopérative et marqué par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice (*Costerton et al., 1994*).

Fongicide : C'est un produit ou un procédé ayant la propriété de tuer les champignons, y compris leurs spores dans des conditions à préciser (*Norme Afnor et EN, NF EN 1275., 2006*).

Fongistatique : Produit ou procédé ayant la propriété d'inhiber momentanément le développement des champignons dans des conditions définies (*Norme Afnor et EN, NF EN 1275., 2006*).

Intertrigo : atteinte inflammatoire des plis cutanés (aisselle, aine, espaces entre les doigts ou les orteils, nombril) (*Larousse médical., 2011*).

Sporostatique : Produit ou procédé ayant la propriété d'inhiber momentanément le développement des spores dans des conditions définies (*Norme Afnor et EN, NF EN 14347., 2005*).

Sporocide : Produit ou un procédé ayant la propriété de tuer les spores bactériennes dans des conditions définies (*Norme Afnor et EN, NF EN 14347.,14347*).

Virostatique : Produit ou procédé ayant la propriété d'inhiber momentanément le développement des virus dans des conditions définies (*Rihn et al ., 2001*).

Virucide : Produit ou un procédé ayant la propriété de tuer les virus dans des conditions définies (*Rihn et al ., 2001*).

Rémanence : La rémanence désignera la persistance de l'effet antimicrobien de l'antiseptique sur la peau ou de la persistance de l'effet antimicrobien du désinfectant sur une surface ou sur la peau (*Masson., 2009*).

Hydrophyle : Se dit des molécules ou substances ayant une affinité pour l'eau (*Dictionnaire Scientifique., 2012*).

Hydrophobe : Se dit des molécules ou substances ayant une répulsion pour l'eau (exemple : les lipides) (*Dictionnaire Scientifique., 2012*).

Gingivite : c'est une inflammation de la gencive, associée ou non à des phénomènes dégénératifs, nécrotiques ou prolifératifs et causé par la plaque bactérienne (*Larousse médical., 2011*)

Parodontie : branche de l'odontologie consacré à l'étude du parodonte, ensemble des tissus de soutien de la dent (*Larousse médical ., 2011*)

Morbidité : Terme désignant le caractère de ce qui est propre à une maladie.

En épidémiologie, c'est le nombre de malade dans une population et dans un temps donné (*Larousse médical., 2011*).

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	---

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1.Généralité sur les antiseptiques.....	3
I.2.Mode et mécanisme d'action des antiseptiques sur les bactéries et les champignons.....	6.
I.3.Principaux groupes d'antiseptiques et leurs caractéristiques.....	7
I.4.Classification des antiseptiques selon le spectre d'activité.....	11
I.5.Microbiologie de la peau et les antiseptiques.....	12
I.5.1.Ecologie microbienne de la peau : flore cutanée et ses caractéristiques.....	12
I.6.Sources de contamination en milieu hospitalier.....	13
I.7.Sensibilité microbienne aux antiseptiques aux antiseptiques : Notion de résistance et de tolérance.....	17
I.8.Conséquences pratiques de la résistance bactérienne.....	20
I.9. Etude de l'activité antimicrobienne des antiseptiques.....	20
I.10.Principe de détermination d'une activité antimicrobienne.....	21
I.11.Critères d'étude d'activité antimicrobienne <i>in Vitro</i>	21
I.12.Méthodes de mesure de l'activité antimicrobienne.....	23

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1.Matériel.....	24
II.1.1.Matériel biologique.....	24
II.1.2.Matériel non biologique.....	26.
II.1.2.2.Les antiseptiques tests.....	26
II.1.2.3.Neutralisants.....	29
II.2.Méthodes.....	30
II.2.1.Vérifications de l'identité des souches microbiennes et fongiques retenus pour l'étude.....	30.

II.2.2.Vérification du non contaminations des solutions d'antiseptiques testés.....	30
II.2.3.Méthodes d'étude <i>inVitro</i> d'activité microbicide des antiseptiques testés.....	31
II.2.3.1.Détermination de l'activité bactéricide des antiseptiques testés.....	31
II.2.3.2.Détermination de l'activité sporocide des antiseptiques testés.....	37
II.2.3.3.Détermination de l'activité fongicide des antiseptiques testés.....	43

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1.Résultats.....	50
III.1.1.Résultats de la vérification de l'identité des souches de références.....	Annexe 10
III.1.2.Résultats du non contamination des antiseptiques testés.....	50
III.1.3.Résultats de l'étude d'activités antimicrobiennes <i>inVitro</i> des antiseptiques testés...51	
III.1.3.1.polyvinylpyrrolidone iodée (Polyvidone iodée).....	51
III.1.3.2.Digluconate de chlorhexidine.....	55
III.1.3.3. Alcool Ethylique 90°.....	59
III-1-3-4-Eau oxygénée 10V.....	63
III.2.Discussion.....	68
III.2.1.Remarques relatives aux méthodes.....	68
III.2.1.1. Viabilité des essais préliminaires.....	68
III.2.1.2.Viabilité des Résultats des essais proprement dit.....	68
III.2.1.3.Avantages de la méthode.....	69
III.2.1.4.Limites de la méthode.....	69
III.2.2. Autre méthodes.....	70
III.2.3.Analyse des résultats d'activité des antiseptiques étudiés <i>in Vitro</i>	70
III.2.3.1. Comparaison des résultats.....	70
III.2.3.2. Analyse des résultats du Polyvidone Iodée PVP-I.....	71
III.2.3.3. Analyse des résultats du Digluconate de chlorhexidine.....	72
III.2.3.4. Analyse des résultats d'Alcool Ethylique	75

III.2.3.5. Analyse des résultats d'Eau Oxygénée.....	76
III.2.4.Essai de Classification.....	77
Conclusion.....	81
Références bibliographiques.....	83
Annexe.....	91

Introduction

La lutte contre les maladies infectieuses transmissibles a été depuis le temps une préoccupation majeure de tous ceux qui étaient en charge de la santé. Ce combat s'appuie sur des méthodes curatives telle que la vaccination et l'antibiothérapie (chimiothérapie) et aussi sur des méthodes préventives telle que l'antisepsie et la désinfection **(Dieng., 1998)**.

Cependant, dans ce domaine et en Algérie, le ministère de la santé et la réforme hospitalière MSRH, informe en Mai 2012, que les enquêtes réalisées au niveau des structures de la santé sur les infections nosocomiales donnent un taux de prévalence national variant entre 12 et 15% **(MSRH., 2012)**.

Mais selon les professionnels de la santé, précisent que ce taux dépasse largement les 30%, cela en raison de la non disponibilité des statistiques fiables sur la question de l'hygiène hospitalière **(NOSOCLEAN., 2012)**.

De ce fait, et devant l'incidence croissante des infections nosocomiales qui constituent un véritable problème de santé publique, et le développement de souches microbiennes résistantes aux antibiotiques, ont entraîné, entre autre, un regain d'intérêt pour l'antiseptique et la désinfection **(Amazianet al., 2010)**

Cependant, l'emploi fréquent d'antiseptiques est le maillon primordial de la chaîne d'hygiène à l'hôpital car c'est la contamination manuportée qui représente la première cause de surinfection hospitalière **(Druilles et al. , 1986, Atif et al., 2006)**.

Donc d'une façon générale, à l'hôpital, dans l'industrie ou dans la vie quotidienne, la lutte contre les foyers microbiens impose la connaissance de l'efficacité réelle des Antiseptiques et désinfectants **(Allion ., 2004)**.

Mais la difficulté que l'on rencontre actuellement se situe dans l'évaluation de l'activité des agents antimicrobiens attestée par la multiplicité des méthodes proposées dans ce but: Méthode d'étude *in vitro* et méthode d'étude *in vivo* **(Essayagh et al., 2010)**.

Dans ce domaine, et dans le cadre de ces prestations, le laboratoire de contrôle de qualité à l'Institut Pasteur d'Algérie, veut s'assurer en mettant un œuvre des techniques pour déterminer l'activité bactéricide, sporocide et fongicide des antiseptiques et désinfectants.

Nous avons utilisé une technique *in vitro*, suivant la méthodologie des normes Européennes (AFNOR et le Comité Européen de Normalisation CEN), dont le principe de la technique est la dilution – neutralisation.

Le but de notre travail a trois objectifs :

- 1- Etude *in vitro* de l'activité bactéricide, sporocide , fongicide et détermination des concentrations minimales germicides de quatre antiseptiques cutanés reconnus pour leur efficacité *in vivo* sur des souches référenciées de collection ;
- 2- Etude du comportement des souches microbiennes du point de vue sensibilité et résistance vis-à vis des produits testés ;
- 3- Standardisée les différentes méthodes mises en œuvres au niveau de l'unité de microbiologie du laboratoire de contrôle de qualité de l'Institut Pasteur d'Algérie, concernant l'activité antimicrobienne (germicide) des antiseptiques et désinfectants.

Nous espérons que ce fascicule vous guidera dans la pratique quotidienne. Une démarche qualité dans le choix et l'utilisation des produits antiseptiques améliore la sécurité des soins, en participant à la lutte contre les infections transmissibles.

I.1. Généralités sur les Antiseptiques

I.1.1. Asepsie :

Ensemble des mesures propres à empêcher tout apport exogène de micro-organismes ou de Virus (**Afnor NF T72-101,1989**).

I.1.2. Antiseptie

Selon **Afnor**, l'antiseptie est une opération au résultat momentané permettant au niveau des tissus vivants, dans la limite de leur tolérance, d'éliminer ou de tuer tous les micro-organismes et / ou d'inactiver les virus, en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux micro-organismes et / ou Virus présents au moment de l'opération (**Placet et al,2001**).

L'antiseptie fait appel à l'usage des antiseptiques, qui doivent répondre à des critères d'activité mais aussi d'innocuité. Les antiseptiques sont utilisés :

- Dans un but curatif lors des infections de la peau ou des muqueuses ;
- Dans la prévention des infections hospitalières (**Marck., 2010**).
- Selon l'objectif souhaité, l'antiseptie prophylactique utilisera des produits et des méthodes très différentes (**Kaestli et al., 2007**).

L'antiseptique idéal doit répondre aux qualités suivantes :

- Effet bactéricide
- Large spectre d'activité ;
- Non –sensibilité aux substances interférentes
- Rémanence
- Faible toxicité et bonne tolérance dans les conditions habituelles d'emploi (**Marck., 2010**).

I.1.3. Désinfection :

Selon **Afnor**, la désinfection est définie comme une opération, au résultat momentané permettant d'éliminer ou de tuer les micro-organismes et /ou les Virus indésirables portés par des milieux inertes contaminés, en fonction des objectifs

fixés. Le résultat de cette opération est limitée au micro-organisme présents au moment de l'opération (Placet *et al.*, 2001).

Selon le Comité Européen de Normalisation C E N, le terme Antiseptie devrait être réservé au cas où l'opération est destinée au traitement d'une infection constituée (Billast *et al.*, 2000).

Le terme désinfection désignant une opération visant à prévenir une infection. On parle ainsi de la désinfection de la peau saine, de désinfection des mains, mais d'antiseptie de la plaie (Placet *et al.*, 2001)(Tableau I).

Tableau I : Distinction entre l'antiseptie et la désinfection selon le comité Européen de Normalisation CEN.

Opérations	Désinfection	Antiseptie
Objectifs	Eliminer et / ou détruire tous les micro-organismes et virus	
Durée de l'effet obtenu après application	Momentanée	
Action au niveau de l'infection	Prévention pour la peau saine	traitement pour la peau lésée

(Placet *et al.*, 2001).

I.1.4. Stérilisation :

La stérilisation est l'opération qui a pour but de tuer les micro-organismes contenus dans une préparation. Le matériel traité est dit stérile lorsque le résultat est acquis, c'est-à-dire lorsque aucun micro-organismes n'est revivifiable ou n'est capable de se développer. Le résultat devrait être permanent ce qui requiert un emballage imperméable à tout recontamination avec une tolérance de non – stérilité de 10^{-6} (un objet non rigoureusement stérile sur un million). Les difficultés d'éviter la recontamination conduisent à définir une date de péremption (Russel., 2004).

Les agents utilisés pour assurer la stérilisation sont des :

- Agents physiques : La chaleur (sèche ou humide), les radiations... ;
- Agents chimiques : les aldéhydes, oxyde d'éthylène, glutaraldéhyde, acide péracétique.....(Abbara., 2004).

L'antisepsie et la désinfection, ainsi que la stérilisation sont des composantes de l'asepsie dont l'objectif est en s'appuyant sur un ensemble de procédures médicales et chirurgicales rigoureuses afin d'éviter la pénétration des microbes dans l'organisme (**Thiam., 2000**).

I .1.5. Définitions complémentaires

a) Antiseptique

Un Antiseptique est un produit ou procédé utilisé pour l'antisepsie dans des conditions définies. Si le produit ou le procédé est sélectif, ceci doit être précisé exemple : Antiseptique à action fongicide, si cette action est limitée aux champignons (**Placet et al., 2001**).

Un Antiseptique est un produit chimique ayant des propriétés antimicrobiennes et toxicologiques adéquates pour un usage sur les tissus vivants(**Gautier et al., 2013**).

Du point de vue réglementaire un antiseptique avec autorisation de Mise sur le marché (A.M.M) est un médicament possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales (**Billastet et al., 2000**).

b) Désinfectant

C'est un produit ou un procédé utilisé pour la désinfection ou la décontamination dans des conditions définies. Si le produit est sélectif, ceci doit être précisé. Exemple : Désinfectant à action bactéricide, si cette action est limitée aux bactéries.(**Afnor et EN., 1998, Placet et al., 2001**).

Un désinfectant est un produit chimique antimicrobien, utilisé sur des supports inerte exclusivement (sols, matériels) et ne doit ni dégrader le matériel par un pouvoir corrosif excessif, ni présenter un risque de toxicité pour le personnel et les malades lors de son utilisation (**Gautier et al., 2013**).

I.2. Mode et mécanismes d'action des antiseptiques Sur les bactéries et les champignons

I .2.1. Mode d'action :

Les antiseptiques sont capables d'inhiber la croissance des micro-organismes (action bactériostatique, fongistatique, virostatique) ou d'avoir une action létale (bactéricide, virucide, sporocide, fongicide)(Allion., 2004).

Certains antiseptiques présentent ces deux modes d'action en fonction des doses utilisées et des germes rencontrés, généralement plus la concentration est élevée, plus l'effet est de type létal, sauf exception : l'Éthanol à 70° est plus actif qu'à 96°(Kaestli *et al.*, 2007).

L'idéal pour répondre aux objectifs de l'antisepsie est d'avoir un effet létal en un temps très bref (Billast *et al.*., 2000).

I .2.2 Mécanisme d'action :

Selon leur nature et la concentration, les antiseptiques ont un ou plusieurs sites d'action sur les micro-organismes (Figure 1). Quelque soit l'entité microbienne considérée et la molécule d'antiseptique utilisée, on sait aujourd'hui que l'action des antimicrobiens peut se caractériser par les trois phases suivantes (Allion,2004) :

- Adsorption d'antiseptique à la surface de l'enveloppe microbienne, phénomène de nature physico-chimique dépendant notamment de la concentration et du mouvement brownien des micro-organismes,
- Pénétration de l'agent antimicrobien dans la cellule. La solubilité, l'ionisation et l'encombrement stérique des molécules antibactériennes sont des facteurs clés de cette phase,
- Action proprement dite du principe actif. Elle peut avoir lieu au niveau de différentes cibles cellulaires possibles, telle que la membrane cytoplasmique dont l'altération de structure provoque une désorganisation du métabolisme, une fuite de substances, la dégénérescence de la cellule et finalement sa mort ; ou encore le cytoplasme et plus précisément les protéines cytoplasmiques, les acides nucléiques, ou les ribosomes (Russelet *et al.*, 2004).

Ainsi pour être actif, l'agent antimicrobien doit pouvoir s'adsorber sur l'enveloppe microbienne et la traverser. Ces phénomènes sont donc fortement dépendants d'une part de la

composition de la paroi des micro-organismes et d'autre part de la structure de la molécule d'antiseptique (Maillard, 2002).

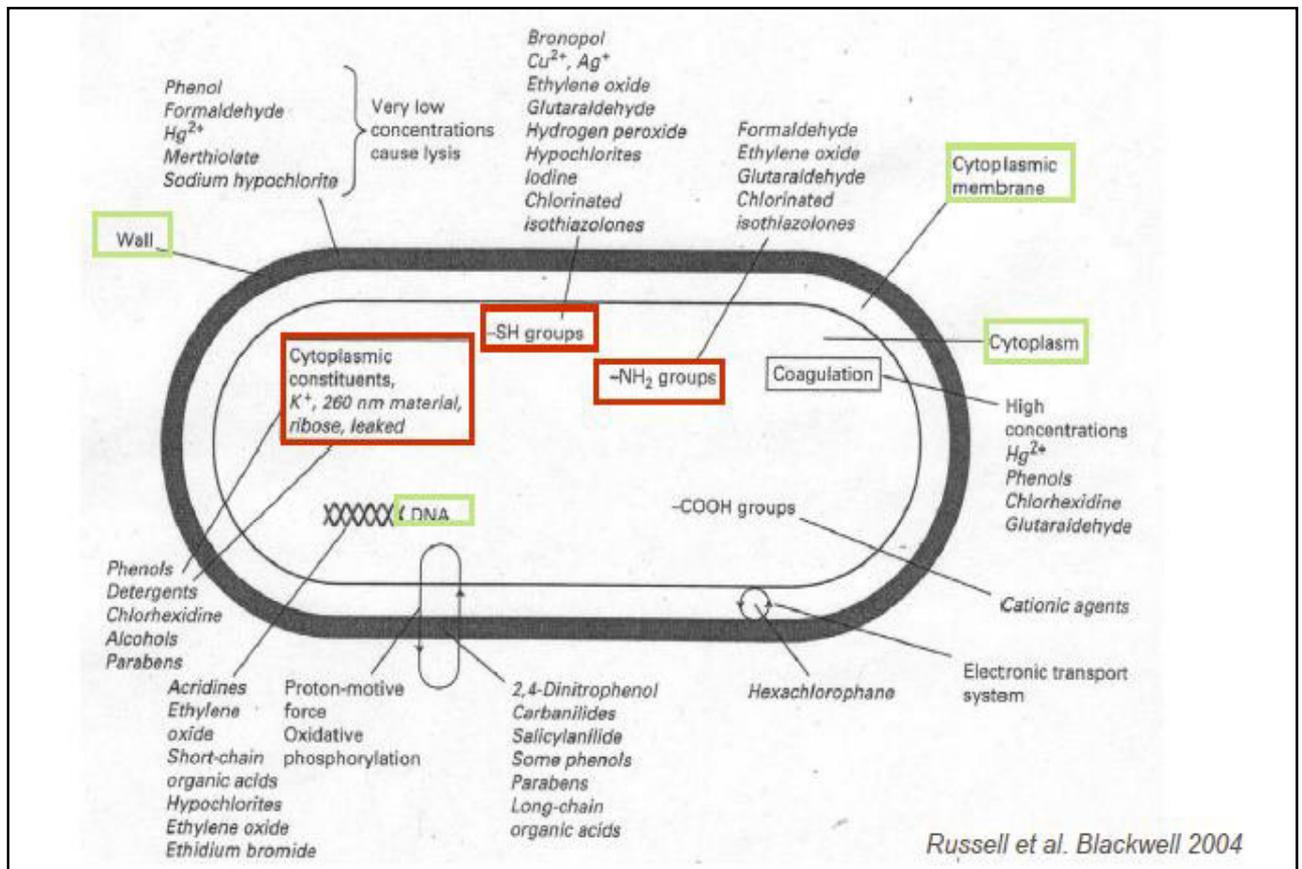


Figure 01 : Mode et mécanisme d'action des antiseptiques et désinfectants (D'après Russel et al., 2004).

I.3. Principaux groupes d'antiseptiques et leurs caractéristiques :

Les propriétés des différentes familles d'antiseptiques, ainsi que leurs spectres d'activité sont présentées successivement dans les tableaux II et III :

Tableau II : Propriétés des principales familles d'antiseptiques.

Famille d'antiseptique	Mécanisme d'action et autre caractéristique	Indication	Exemple
Alcools	- Dénaturation des protéines cytoplasmiques et membranaires par leur	-antiseptie de la peau saine pour actes peu invasifs (sites d'injection, prélèvements	-Ethanol Isopropanol

	<p>coagulation</p> <p>Inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines</p> <p>-Diminution de l'activité par matières biologique</p> <p>-Délai d'action : 2 minutes <i>in vivo</i> (si peau humide)</p>	<p>sanguin)</p> <p>- désinfection hygiénique ou chirurgicale des mains préalablement savonnées (produits hydro-alcooliques)</p>	
Halogènes chlorés	<p>- Destruction de protéines par pouvoir oxydant</p> <p>-Délai d'action : 1 minute</p> <p>- Inactivation avec d'autres antiseptiques</p>	<p>Antiseptie de la peau, des muqueuses et des plaies</p>	<p>Solution de Dakin stabilisé</p>
Halogènes iodés	<p>- Destruction de protéines enzymatique et membranaires par pouvoir oxydants</p> <p>- Instable à la chaleur, à la lumière et à PH alcalin</p> <p>- Inactivé par thiosulfate de sodium</p> <p>- Délai d'action : 5 minute <i>in vitro</i>, 1 minute <i>in vivo</i></p>	<p>- antiseptie de la peau, des muqueuses saines ou lésées</p> <p>- douche préopératoire</p> <p>- déterision du champ opératoire</p>	<p>- Polyvidone iodée PVP-I (solution aqueuse, solution alcoolique)</p> <p>-Alcool iodé</p>
Oxydants	<p>-Production de radicaux libres qui interagissent avec les lipides, protéines et ADN</p> <p>-Action mécanique de nettoyage grâce à effervescence</p> <p>- Inactivation par les</p>	<p>Nettoyage à visée antiseptique de la peau érodée et des petites plaies</p>	<p>Peroxyde d'hydrogène (Eau oxygénée 10V)</p>

	matières biologiques		
Biguanides	<p>-Liaisons aux acides gras et aux groupes phosphates de la membrane cellulaire → fuite des constituants cellulaires</p> <p>-Rapidité d'action : 2-5 minutes</p> <p>-Inactivation par les matières biologiques et les savons.</p>	Nettoyage et antiseptie de la peau saine, des plaies superficielles et peu étendues	Di gluconate de Chlorhexidine
Ammoniums quaternaires	<p>-Déstabilisation de la paroi par liaison aux groupes phosphates et aux acides gras</p> <p>-Dénaturation des protéines</p> <p>-Rapidité d'action : 2-5 min</p> <p>- Inactivation par les matières biologiques et les oxydants</p>	<p>-Traitement d'appoint des affections primitivement bactériennes ou susceptible de se surinfecter.</p> <p>- Ne pas utiliser sur les muqueuses.</p>	Benzalkonium
Diamidine	<p>Présente des propriétés tensio-actives</p> <p>-Délai d'action : 5 min <i>in vitro</i></p>	- Traitement d'appoint des affections dermatologiques	Hexamidine
Carbanilide	<p>Toxicité si dilution avec eau chaude</p> <p>Incompatibilité avec les dérivés cationiques</p>	Détersion de la peau et de la muqueuse vaginale	-Dérivé trichloré (septivon®) triclocarban

Colorant	-propriétés insuffisantes pour le milieu médical - action desséchante	Traitement d'appoint de l'érythème fessier des nourrissons, candidosique, dermatose suintante, bulleuses vésiculeuses	-Eosine - violet de gentiane - solution de Milian (vert de méthyle-cristal violet)
-----------------	--	---	--

(Fleurette, 1998 ; Kaestli *et al.* , 2007, Masson , 2009 ; Gautieret *al.*, 2013).

Tableau III: Spectre d'activité des principales familles d'antiseptiques.

Famille d'antiseptique		Spectre d'activité des principales familles d'antiseptiques							
		Gram positifs	Gram négatifs	Mycobactéries	Levures	Moisissures	Virus nus	Virus Enveloppés	Spores
Halogènes	Chlorés (Dakin)	+	+	+	+	+	+	+	+
	iodés (betadine, alcool Iode)	+	+	+	+	+	+	+	+
Alcools (éthanol à 70°, Alcool isopropylique à 60°)		+	+	+	+/-	+/-	+/-	+	-
Biguanides (chlorhexidine)		+	+	+/-	+	+/-	+/-	+	-
Tensio-actifs Ammonium quaternaires		+	+/-	-	+	+	+/-	+	-

(chlorure de benzalkonium)								
oxydants (eau oxygénée 10v)	+	+	-	+	+	+/-	+	+
Diamidine (hexamidine)	+/-	-	-	-	-	-	-	-
Carbanilide	-	-	-	-	-	-	-	-
Colorants	-	-	-	-	-	-	-	-

(Fleurette, 1998 ; Kaestli *et al.* , 2007 ; Masson, 2009 ; Gautieret *al.*, 2013).

+ : produits

+/- : produits inconstamment actifs

- : produits inactifs

I.4. Classification des antiseptiques selon le spectre d'activité

Selon le spectre d'activité, les antiseptiques se répartissent en cinq catégories comprenant les antiseptiques majeurs, intermédiaires, mineurs, produits considérés à tort comme antiseptiques et d'autres sont des antiseptiques à déconseiller (Placet *et al.*, 2001, Badrikian *et al.*, 2006).

I 4.1. Les antiseptiques majeurs : ont un spectre d'activité très large :

- Halogènes : dérivés iodés, dérivé chlorés
- Biguanides :
- Alcools

I 4.2. Les antiseptiques intermédiaires : ont un spectre d'activité étroit :

- Ammoniums quaternaire

I 4.3. Les antiseptiques mineurs : sont des inhibiteurs de croissance, caractérisés par un spectre d'activité étroit :

- Diamidines
- Carbanilides

- Acides : acide borique, acide salicylique
- Dérivés métalliques : nitrate d'argent, sulfate de cuivre et zinc

I 4.4. Les produits considérés à tort comme antiseptique :

- Colorants : Eosine aqueuse, violet de gentiane

4.4.5. Les antiseptiques à déconseiller (toxicité et effet indésirables importants) :

- Dérivés mercuriels : (le mercurochrome®)

I 5. La Microbiologie de la peau et les antiseptiques

I 5.1. Ecologie microbienne de la peau : la flore cutanée et ses caractéristiques

De nombreuses bactéries sont normalement présentes sur la peau et les muqueuses des sujets sains. Elles constituent les flores commensales résidentes. Celles –ci participent activement au maintien de la santé, en prévenant par son équilibre la prolifération de bactéries commensales potentiellement dangereuses et en empêchant la colonisation par des bactéries pathogènes (Abbara., 2004).

La flore cutanée est constituée, outre la flore résidente, d'une flore transitoire, de contamination récente (Masson., 2009).

La flore cutanée est variable en qualité et en quantité (10^2 à 10^6 germe/ cm^2) selon la topographie. Les mains portent souvent une flore transitoire abondante d'où leur rôle dans la transmission croisée (Abbara., 2004).

D'une façon générale, les antiseptiques ont une actions limités sur la flore résidente, mais rapide et efficace sur la flore transitoire (Carrelet *et al.*, 2001)

I.5.1.1. La flore résidente :

La flore résidente ou commensale est la flore normale non pathogène. Elle est constitué de bactéries qui vivent et se multiplient sur la peau (Masson ., 2009)(Tableau II, annexe 1)

La flore résidente comprend des bactéries :

- Aérobie : surtout les germes gram positifs, staphylocoques à coagulase négatives, corynébactéries, microcoques ;
- Anaérobies : essentiellement propionibacteriumacnée.

Ces bactéries sont habituellement peu pathogènes chez l'homme Sain, car elles jouent un rôle de barrière en s'opposant à l'implantation d'autres espèces potentiellement pathogènes.

Elles sont à l'origine d'infection lorsqu'elles sont introduites dans l'organisme lors de procédures invasives, telles qu'une intervention chirurgicale, une ponction, un cathétérisme....(Abbara., 2004).

Cette flore est difficile à éliminer et se reconstitue rapidement (4 à 6 heures), à partir de la flore de voisinage et des bactéries survivantes. Le port de gants chirurgicaux accélère le processus. Elle est seulement réduite malgré l'action mécanique du lavage et l'action bactéricide des antiseptiques (Masson., 2009).

I 5.1.2. La flore transitoire

La flore transitoire est plus polymorphe, composée de micro-organismes ayant contaminés récemment la peau potentiellement pathogènes et provenant du tube digestif, de l'environnement, de matériel contaminé ou encore du contact avec des individus colonisés ou infectés (Carrelet *et al.*, 2001)

Ces micro-organismes font un bref séjour sur la peau car ils sont incapables de se multiplier en surface et ne peuvent pas survivre très longtemps au niveau de la peau saine à cause de l'effet protecteur de la flore résidente et de l'environnement (froid, sécheresse...) qui est peu favorable pour leur croissance (Masson., 2009).

La flore transitoire se compose essentiellement des :

- Entérobactéries ;
- *Pseudomonas spp* provenant de l'environnement ;
- klebsielles ;
- Streptocoques du groupe A ;
- *Staphylococcus spp* ;
- *Candida albicans*, chez les sujets immunodéprimés ou diabétiques ;
- Spores de *Bacillus spp* et *Clostridium spp*, provenant de l'environnement.(Abbara., 2004).

Cette flore est totalement éliminée par un lavage simple ou hygiénique avec un savon antiseptique (Carrelet *et al.* 2001 ; Masson., 2009).

I .6.Les sources de contamination en milieu hospitalier

Les sources de contamination en milieu hospitalier sont variées, on peut citer les plus importants (Fonzo-christet *al.*, 2005 ; Agostinho *et al.*, 2011).

- **La peau** : les mains, en particulier sous les ongles, les bagues et entre les doigts ;

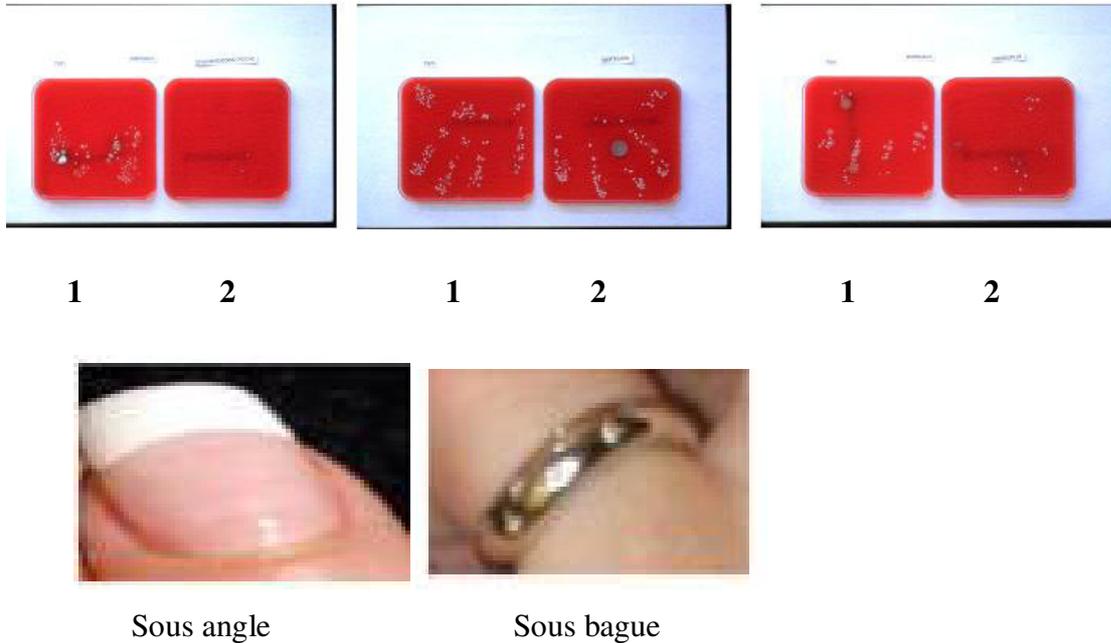


Figure 02: Empreinte des mains avant et après désinfection (Argostinho, 2011).

1 : Avant désinfection 2 : Après désinfection

- **La tenue vestimentaire** : blouses de travail, chaussures....etc.



Figure 03: flore prélevée au niveau des blouses de travail (propre et sale) (Argostinho, 2011).

- Le système pileux : cheveux, barbes



Figure 04 – a : La flore prélevée au niveau de la barbe (Argostinho, 2011).

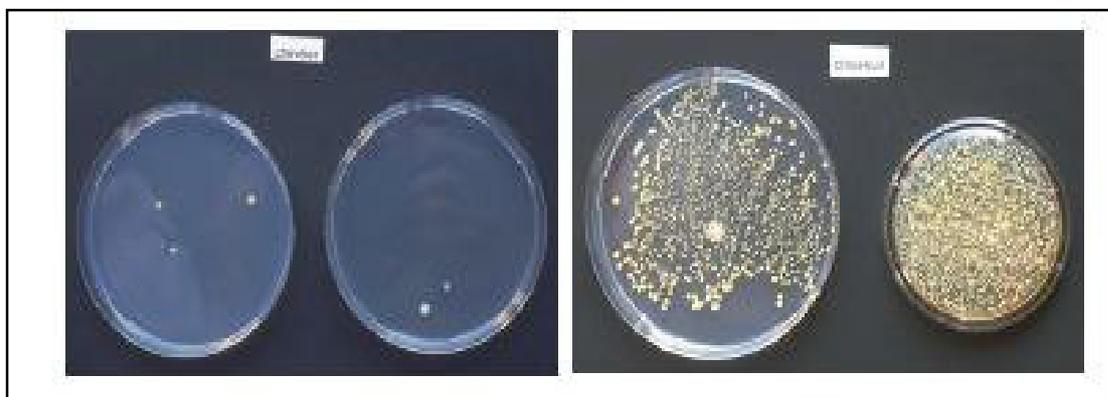


Figure 04 -b : La contamination du système pileux : la contamination du cheveu varie d'un individu à un autre (Argostinho,2011).

- L'environnement : surface planes ou horizontales, poignées lavabos, sol).

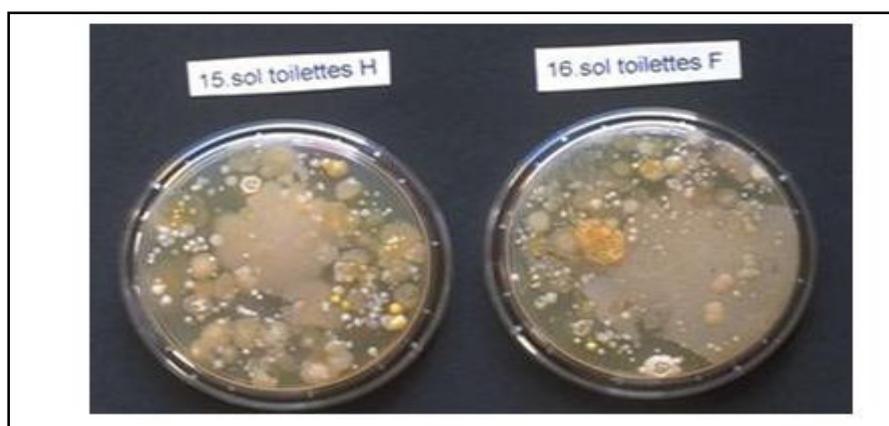


Figure 05: La flore du sol de toilettes homme et femme (Argostinho, 2011).

I .7. Sensibilité Microbienne aux Antiseptiques : Notion de résistance et de tolérance

Deux types de résistance aux antiseptiques (antimicrobiens) peuvent alors être distingués : La résistance intrinsèque et la résistance acquise (**Allion., 2004**).

I 7.1. Résistance intrinsèque

La résistance intrinsèque ou naturelle est une caractéristique innée et stable des cellules appartenant à une espèce microbienne ou à un groupe d'espèces vis-à-vis d'un antimicrobien (**Sheldon., 2005**), elle permet de définir le spectre d'activité théorique (**Placet et al., 2001**).

La résistance intrinsèque est prévisible, ainsi que la structure et la composition de la surface des micro-organismes jouent un rôle important dans leur résistance naturelle (**Maillard., 2004**).

I .7.1.1. Résistance intrinsèque bactérienne :

L'élément majeur de la résistance est la paroi de la cellule bactérienne, cet élément est présent chez presque toutes les bactéries, à qui elle donne la forme et confère une protection mécanique (**Mc Donnell et al., 1999**).

On distingue ainsi deux grands groupes de bactéries selon la structure de leur paroi : les bactéries Gram négatives et les bactéries Gram positives (**Figure07**)

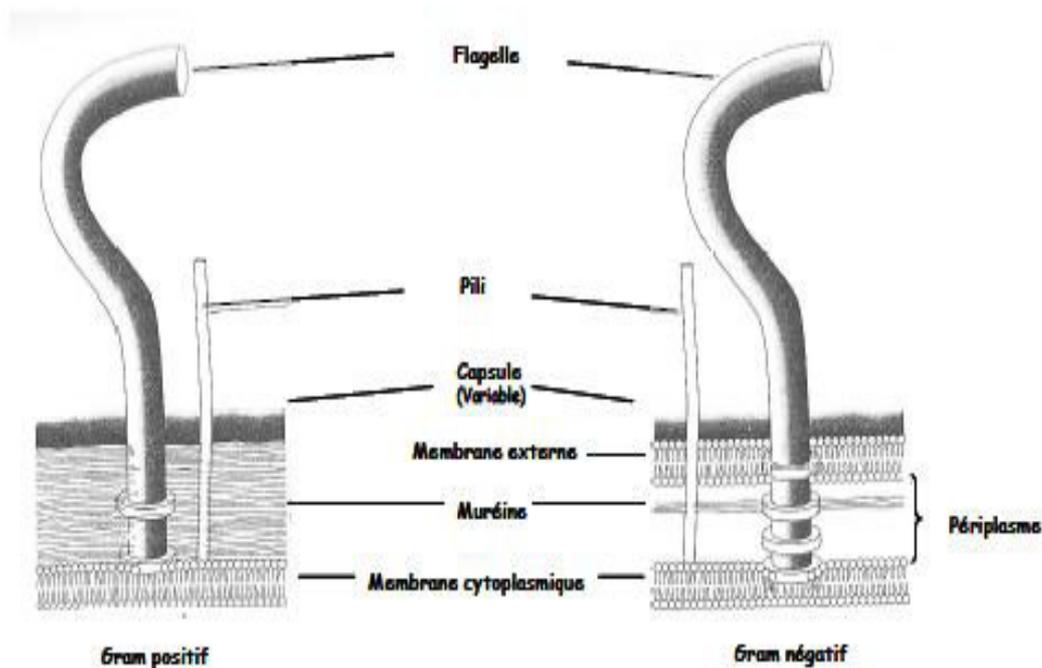


Figure 06 : Représentation schématique des enveloppes des bactéries à Gram négatif et à GramPositif (D'aprèsNeidhardt *et al.*, 1994).

La majorité des antiseptiques exercent leur action essentiellement au niveau de la membrane cytoplasmique et doivent donc traverser la paroi. Cependant les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes que les bactéries à Gram positifs (Allion., 2004).

Chez les bactéries à Gram positifs, la membrane cytoplasmique est presque directement en contact avec le produit, car il se fixe sur la couche de peptidoglycane revêtue d'acides teichoïques et de lipides à laquelle la membrane cytoplasmique est intimement liée (Neidhart.,1994).

Chez les bactéries à Gram négatifs, au contraire la membrane cytoplasmique n'est pas liée au peptidoglycane et c'est surtout l'enveloppe externe qui constitue un écran important. Sa structure est assez différente de celle de la membrane cytoplasmique ; elle contient en particulier moins de phospholipides, plus de protéines et lipopolysaccharide LPS(Joly., 1995). La fixation des molécules d'antiseptiques et leur passage à travers l'enveloppe sont fonction de la structure et de la polarité de la molécule d'une part et d'autre part de la composition de l'enveloppe (Hancock., 1998).

En effet les molécules hydrophobes interagissent avec les LPS et les lipides, tan disque les molécules hydrophiles dépendent également des porines qui leurs sont indispensables pour traverser la membrane (**Joly., 1995**).

D'une manière générale, la présence d'une enveloppe externe (bactéries à gram négatif), d'une couche de cires (mycobactéries) ou de tuniques sporales (spores bactériennes) augmente généralement la résistance aux antiseptiques (**Reverdy., 1995 ; Allion., 2004**).

Il est à noté que la résistance naturelle des bactéries aux antiseptique peut également être due à la présence de systèmes enzymatiques telle que ; la **catalase** ou la **super oxyde dusmatase** chez *E. coli* permettant de détruire l'agent oxydant avant que la dégradation bactérienne n'ait eu lieu, on participant aux mécanismes de réparation cellulaire(**Russel., 1997**).D'autre systèmes enzymatiques comme pompes d'efflux, permettent le « rejet » des agents antiseptiques hors de la cellule (**Poole., 2002 ;Allion., 2004**).

La formation de Bio films est également un mécanisme de résistance intrinsèque, ou une communauté de bactéries adhérent entre elles et sur une surface, enveloppées dans une matrice adhésive et protectrice (**Darouiche., 2001 ;Donlanet al.,2002, Allion.,2004**).

Exemple : bio film retrouve sur les dispositifs médicaux (**Kaestli et al.,2007**).

Parmi les bactéries, les bacilles à Gram négatifs opportunistes dont *Pseudomonas* (*P.aeruginosa, P.cepacia....*), (**Drenkard., 2003**), les Proteus indole positifs, Providencia, et les mycobactéries sont impliqués dans ces phénomènes (**Joly., 1995**).

I.7.1.2. Résistanceintrinsèque des virus

Au contraire des bactéries , les virus enveloppés (exemple : HIV) sont plus sensibles que les virus nus (exemple : poliovirus) , car l'enveloppe externe riche en lipides est facilement désorganisée par les antiseptiques ou autre agent antimicrobien , ce qui provoque l'inactivation du virus (**Kaestli et al.,2007**).

I.7.2. Resistance acquise

La résistance acquise est une perte de l'efficacité de l'agent anti-infectieux sur une souche sélectionné d'une espèce microbienne. Il s'agit d'une modification génétique brutale et imprévisible survenant chez un ou plusieurs souches de l'espèce (**Allion., 2004**)

Cette résistance peut être due à une :

- Mutation d'un gène : résistance acquise chromosomique ;

- soit porté par un plasmide : résistance acquise plasmidique (**kaestli et al., 2007**)

I.7.2.1. Résistance acquise chromosomique

Il s'agit d'une mutation stable et héréditaire d'un gène du chromosome, et le produit du gène muté est ainsi lui-même est modifié. Généralement, la résistance est acquise lorsque la mutation concerne un ou plusieurs gène structuraux de la cellule, codant soit pour un élément cible de l'antimicrobien, soit pour un élément de fixation et / ou de pénétration de l'antiseptique (**Allion, 2004 ; Sheldon, 2005**).

De nombreuses études (**Thomas et al., 2000 ; Lundén et al., 2003**), ont montré que la croissance d'une souche sensible avec des concentrations sublétales d'un antiseptique pouvait entraîner l'acquisition d'une résistance à cet antimicrobien. Cette diminution de sensibilité s'accompagne généralement d'une évolution de l'enveloppe bactérienne et plus particulièrement la composition lipidique membranaire des bactéries à Gram négatifs (**Langsrund et al., 2003 ; Tabata et al., 2003**) et des bactéries à Gram positifs (**To et al., 2002**).

Ces variations de composition de la paroi cellulaire (teneur en acides gras, lipides, protéines) peuvent ainsi engendrer une évolution des propriétés physico-chimiques de surface des micro-organismes (hydrophobie, charge de surface) entraînant donc une modification des interactions entre cellules microbiennes et agent antimicrobien (**Loughlin et al., 2002**).

Cependant, cette résistance peut être réversible, il s'agit alors d'un phénomène adaptatif gouverné par des gènes chromosomiques (**Jones et al., 1989 ; Allion., 2004**).

Les bactéries pouvant acquérir une résistance par ces procédés sont les bacilles à Gram négatifs opportunistes telle que *Klebsiella.pneumoniae*, *Pseudomonas.aeruginosa*, *Providencia*, et plus rarement des *Staphylocoques* (**Mac donnellet al., 1999**).

I.7.2.2. Résistance acquise plasmidique (ou extra chromosomique)

Les micro-organismes ayant acquis une résistance extra chromosomique hébergent des plasmides R (facteur de résistance) véhiculant des gènes dont le produit confère la résistance à un ou plusieurs antimicrobiens. Des plasmides induisant une augmentation de résistance à certains agents antiseptiques (ammonium quaternaire, Chlorhexidine) ont également pu être mis en évidence chez des souches responsables d'infections nosocomiales (**Mc Donnell et al., 1999 ; Allion., 2004**).

La grande majorité des résistances plasmidiques sont mises en évidence chez des souches de *S. aureus*, d'entérobactérie et de *Pseudomonas aeruginosa* responsable d'infection nosocomiale (**tableau III ; McDonnell et al ; Annexe 3**). Chez ces bactéries, les gènes de résistance peuvent être associés sur un même plasmide à des gènes de résistance aux antibiotiques. Il ya dans ce cas un risque de sélection croisée de souches résistantes soit par l'utilisation de l'un des antiseptiques, soit par celle des antibiotiques vis-à-vis des quels sont résistants(**Poole, 2002**).

Ainsi chez des souches de *S. aureus* résistante à la méticilline (MRSA), les gènes *qac A*, *qac B*, *qacC* et *qac D* porté par un plasmide PSK ont été mis en évidence. Ils codent pour la résistance aux ammoniums quaternaires ainsi que pour la Chlorhexidine. Le produit de ces gènes est une protéine provoquant l'efflux de l'agent antimicrobien (**McDonnell ., 1999**).

I .8. Les conséquences pratiques de la résistance microbienne

Les germes résistants sont sélectionnés lors de l'utilisation des antiseptiques quand les concentrations actives sont trop faibles pour les inhiber ou les tuer dans les conditions d'utilisation selon la société française d'hygiène hospitalière SFH2 (**Bendayan et al., 2007**)

Pour éviter une telle situation, il faut tenir compte de deux éléments :

- du spectre d'activité théorique ;
- des conditions d'utilisation (concentration et temps d'application des produits) indiqué par le fabricant ;

Pour cela, il est préférable d'utiliser des antiseptiques ou association d'antiseptiques à spectre large dont l'activité a été évaluée (**Kaestli et al., 2007**).

I 9. Etude de l'activité antimicrobienne des antiseptiques

I .9.1. Etude *in vivo* :

Il est difficile d'étudier l'efficacité des antiseptiques *in vivo* de façon sensible et reproductible (**Kaestli et al., 2007**). Dans ce cas, cette dernière est considérablement restreint par :

- la protection mécanique des bactéries par la couche cornée de l'épiderme ;
- les interférences avec les produits biologiques (exsudat,pus,électrolytes,...) ;

- Le temps de contact limité ;
- Le PH du milieu ;
- la sensibilité des souches rencontrées, différente de celle des souches de collection (Badrikian et al., 2006).

I .9.2. Etude *in vitro*

Le pouvoir germicide d'un agent antimicrobien est généralement étudié à partir d'essais réalisés *in vitro*. La réalisation de ces tests est complexe, car plusieurs paramètres doivent être définis ; choix des germes, préparation des suspensions microbiennes, élimination ou neutralisation de l'antiseptique (Thiam., 2000).

I .10. Principe de détermination d'une activité antimicrobienne :

❖ Exigence fondamentale :

- Il est indispensable de s'assurer de la mort des micro-organismes présent au moment de l'application. C'est donc une activité germicide qui est exigée. Cela revient à éliminer toute activité bactériostatique, fongistatique, Sporostatique résiduelle des antiseptiques (Dieng., 1998 ; Masson., 2009).

Pour cela nous disposons actuellement deux techniques :

- la neutralisation (= inactivation) de l'activité antimicrobienne ;
- la filtration sur membrane (Masson., 2009).

Dans l'état actuelle de nos connaissances, ces deux procédés destinés à éliminer les effets bactériostatiques des produits antiseptiques et désinfectants sont comparables, l'expérimentateur choisi donc la méthodologie qui lui convient le mieux (Billast *et al.*, 2000).

I .11. Critères de l'étude d'activité antimicrobienne *in vitro*

I.11.1. Choix des souches

La nécessité de limiter le nombre d'essai à un petit nombre de souches tout en conservant un large éventail de micro-organismes et en retenant ceux qui sont fréquemment reconnus comme responsables de problèmes microbiologiques a conduit à sélectionner certaines souche

comme : *Pseudomonas aeruginosa* , *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Entérocooccus faecalis* pour l'activité bactéricide (**Druilles et al., 1986**) , *Candida albicans* et *Aspergillus niger* (**Hiomet al., 1992**) pour l'activité fongicide , *Bacillus subtilis* et *Clostridium sporogenes* pour l'activité sporocide (**Gormanet al., 1987 ; Russel., 1990**) .

I.11.2. Choix des milieux de culture

Les milieux sont choisis selon les souches utilisées et l'activité antimicrobienne recherchée (**Dieng., 1998**).

I.11.3. Détermination des concentration minimales bactéricides CMB, sporocide CMS et fongicide CMF

Selon les normes Afnor, la concentration minimale du produit est la plus faible concentration du produit engendrant 5 réduction décimale (10^5) d'une population microbienne de 10^8 ufc / ml en 5 minute. Cet abaissement de la flore (10^5 ufc/ml en 5 min) correspond à une réduction de 99.999 % de la population microbienne. Ce pourcentage de destruction représente le seuil d'activité du produit (**Allion., 2004**).

I.11.4. Temps de contact :

De nombreuses techniques dans les quelle les temps de contact proposés varient de 1 minute à 120 minutes (**Billastet al., 2000**) .

I.11.5. Conditions physico-chimiques des essais

- **La température**

La température de $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ a été retenue comme température des laboratoires.

Tous les traités relatent la grande influence de la température sur l'activité des antimicrobiens, il est donc indispensable d'utiliser un bain-marie thermostat pour obtenir la température avant de procéder à l'essai (**Berdeud et al., 2002**).

- **Le PH**

Le PH des essai résulte des propriétés physico-chimiques des antiseptiques, il est noté à la fin des opérations (**Berdeud et al., 2002**).

I.12.Méthode de mesure de l'activité antimicrobienne

Différentes méthodes ont ainsi été développées et certaines d'entre elles sont aujourd'hui standardisées selon les normes Afnor et le comité Européen de Normalisation CEN (Allion., 2004).

- Méthode du coefficient phénol(Druilleset *al.* , 1986) .
- Méthode dite de porte germe (Druilleset *al.*, 1986) .
- Méthode de mesure par unensemenceur à sites multiple (Fleurette *et al.*, 1971) .
- Méthode de filtration sur membrane (Cruzel *et al.*, 1973 ; Lambinet *al.*, 1997).
- Méthode de dénombrement :
 - méthode de dilution-neutralisation (Druilles *et al.*, 1986 ; Essayagh *et al.*, 2010).
 - méthodes des empreintes (Gormamet *al.*, 1987).
 - méthode de l'écouvillonnage (Druilles *et al.*, 1986).
 - épreuve de rinçage (Druilles *et al.*, 1986) .

Nous avons choisis de ne présenter que celle susceptible de nous intéresser pour la suite de notre étude.

I.12.1. Méthode de dénombrement après dilution et neutralisation du produit à testée

Cette méthode dérive de la très classique méthode de dilution (ou méthode de suspension) utilisé pour la détermination de l'activité des substances antimicrobiennes. Elle est maintenant couramment utilisée pour la mise en œuvre des neutralisants pour supprimer les effets bactériostatiques, sporostatiques et fongistatiques des antiseptiques (Masson., 2009)

L'efficacité de ces neutralisant doit être appréciée au cours d'un essai préliminaire : ce n'est qu'après ce test que l'on peut passer à l'essai proprement dit et déterminer la concentration minimale bactéricide, sporocide et fongicide (Norme Afnor., 1989 ; Norme NF EN., 1997 ; Norme NF EN., 2005 ; NF EN.,Norme 2006).

La réalisation de cette méthode s'effectue en quatre phases :

- a-** mise en contact du produit à tester avec un inoculum microbien ;
- b-** annulation de l'activité du produit à l'issue du temps de contact par neutralisation du produit ;
- c-** mise en culture, en milieu approprié des germes survivants après la neutralisation ;
- d-** une appréciation de la réduction logarithmique de la population microbienne testée pour déterminer la concentration minimale germicide (**Billastet al, 2000**).

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de contrôle de qualité à l'institut Pasteur d'Algérie IPA, pour une durée de six mois, il porte une étude *in vitro* de l'activité bactéricide, fongicide et sporocide de quatre antiseptiques cutanés (la Polyvidone iodée 10%, Digluconate de chlorhexidine 0,5%, l'Alcool chirurgical 90°, et l'Eau oxygénée 10V), produits largement utilisés en milieu hospitalier et connus pour leur efficacité *in vivo*.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

L'ensemble des techniques a été réalisé avec 5 souches microbiennes de collection qui ont été choisies parmi des espèces représentatives des groupes pathogènes pour l'homme et fréquemment rencontrées dans le domaine médical et dans l'industrie agro-alimentaire, à **savoir** :

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Escherichia coli ATCC 25922

Candida albicans ATCC 10231

Bacillus subtilis ATCC 6633

Les cinq souches de référence, ainsi que leur origine, le milieu gélosé d'entretien, l'intervalle de temps entre deux repiquages successifs, la température d'incubation et leur utilité pour notre étude sont représentés dans le **tableau V**

Tableau V : origine et conditions de repiquage des souches de référence

Souche de référence	Origine	Milieu gélosé (entretien)	Intervalle de temps entre 2 repiquages	Température d'incubation	Utilité pour l'étude
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC278853	Collection institut pasteur	TSA	18 à 24h	37°C	Activité bactéricide
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	Collection institut Pasteur (Paris)	TSA	18 à 24h	37°C	Activité bactéricide
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	Collection institut Pasteur (Paris)	TSA	18 à 24h	37°C	Activité bactéricide
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	collection institut Pasteur (Paris)	sabouraud	24 à 48 h	30°C	Activité fongicide
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	collection institut pasteur (paris)	TSA	3 jours	37°C	Activité Sporocide

(AFNOR et EN., 2005, 2006)

Les Cinq souches microbiennes servant à déterminer l'activité bactéricide, fongicide, et sporocide, des produits utilisés comme antiseptiques et désinfectants selon l'association française et le Comité Européen de Normalisationsont représentées dans le **tableau VI (Annexe 3)**.

II.1.2. matériels non biologique :

II.1.2.1. Appareillage, consommables, milieux de culture, réactifs et colorants

L'ensemble du matériels non biologique dont l'appareillage, du consommable, les milieux de culture, réactifs et colorants sont développées dans **Annexe 4 et 5**.

II.1.2.2. Antiseptiques Tests

II.1.2.2.1. Présentation des antiseptiques Tests

Les quatre (04) antiseptiques retenus pour cette étude sont des produits les plus couramment vendus en officine et les plus utilisés à l'hôpital : la polyvidone iodée 10% (Septidine®), ledigluconate de chlorhexidine 0,5% (Eudril®) , l'Alcool chirurgical 90° et l'Eau oxygénée 10V.

Dans cet ensemble les principales familles sont présents : les halogènes Iodés, Biguanides, les Alcools et les Oxydants (**Figure 08**).



Figure 08 : Présentation des quatre antiseptiques testés de gauche à droite ; Alcool chirurgical 90°, Eau oxygénée 10V, Septidine® 10% (PVP-I), Eudril® 0,5%(Digluconate de Chlorhexidine .

II.1.2.2.2. Caractéristiques et propriétés des antiseptiques Tests

Dans le **tableau VII**, sont indiqués pour chacun des antiseptiques testés le principe actif, la teneur, la formule chimique, l'origine, les principales indications thérapeutiques préconisées par le fabricant et les dilutions essayées.

Toutes les dilutions que nous avons réalisées avec l'utilisation de l'eau distillée stérile préparées extemporanément, sont représentées dans la **figure 9**. Les délais de péremption des différents produits, ainsi que les conditions de stockage (conservation à l'abri de la lumière et à la température ambiante) sont respectés.

Tableau VII : Antiseptiques testés, principe actif, formule chimique, dilutions, indications thérapeutiques et origine.

Nom de la spécialité ou de la préparation	Principe(s) actif(s) % m/v	Formule chimique	Dilutions essayées	Principales indication thérapeutiques préconisées	Origine
Septidine®	Polyvidone iodée 10%	$(C_6H_9NO)_n(I_2)_m$	0,4%(4000mg/l) 0,2%(2000mg/l) 0,1%(1000mg/l) 0,005%(500mg/l) 0,025%(250mg/l)	Nettoyage + antisepsie de la peau et de la muqueuse saines ou lésés, préparation du champ opératoire	Produit local
Eudril® Chlorhexidine	Di gluconate de chlorhexidine 0.5%	$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$	0,5%(5000mg/l) 0,2%(2000mg/l) 0,1%(1000mg/l) 0,05%(500mg/l) 0,02%(200mg/l)	Traitement des affections dermatologiques bactériologiques ; Nettoyage et antisepsie de la peau saine, celle du champ opératoire, des plaies et brûlure et les soins bucco dentaire.	Produit importé
Alcool	Alcool	CH_3-CH_2-OH	90°	Antisepsie de la	Produit

chirurgical à 90°	éthylrique 90°		70° 60° 50° 40° 30°	peau saine, des sites d'injection et des prélèvements sanguins	local
Eau oxygénée 10 v	Peroxyde d'hydrogène 3%	H2O2	10V (30000mg/l) 8V (24000mg/l) 6V (18000mg/l) 4V (12000mg/l) 2V (6000mg/l)	Antiseptie, irrigation des plaies superficielles, hémostatique, soins bucco-dentaire	Produit local

Remarque

- Les dilutions d'alcool chirurgical 90° ont été préparées à l'aide du table de Gay-Lussac (Marchal et al., 1982) (Annexe 6)



Polyvidone iodée



Digluconate de chlorhexidine



Eau oxygénée



Alcool chirurgical

Figure 9: Présentation de la gamme des dilutions des différents antiseptiques testés

Préparée pour le test proprement dit.

II .1.2.3.Neutralisants :

Une liste nom limitative de neutralisant de l'activité antimicrobienne est donnée par l'association Française et le comité européen de normalisation, cela dépend de la nature du produit testé (Afnor et EN, 1997) (Annexe 7)

Pour notre étude, la neutralisation à été faite par :

- le thiosulfate de sodium (0,5%) pour la Polyvidone iodée (Septidine®) ;

- Le jaune d'œuf frais à 10 % pour la Digluconate de chlorhexidine ;
- Tween 80 à 4% + jaune d'œuf frais à 2 % pour l'Alcool Chirurgical ;
- Tween 80 à 3 % + jaune d'œuf frais à 5 % pour l'Eau oxygénée 10V.

La préparation se déroule dans des conditions aseptiques, le neutralisant doit être stérile.

Le choix est confirmé par les résultats de l'essai préliminaire, on validant ce neutralisant.

II.2.Méthodes

II.2.1. vérification de l'identité des souches bactériennes et Fongiques retenus pour l'étude

Les souches doivent être utilisées après revivification, il s'agit de trois repiquages successifs sur milieu gélosé solide TSA (Tryptocase Soja Agar) pour les bactéries, et sur milieu Sabouraud (Sab) pour les levures et les champignons, sachant que la température et le délai d'incubation sont bien établis, dont l'objectif est l'obtention des cultures jeunes et pures.

Après avoir vérifié la pureté des souches, nous avons confirmé leur identité, en se basant sur certains facteurs clés utilisés en taxonomie :

-la morphologie macroscopique : morphologie des colonies (la taille, la surface, le contour, la couleur, la consistance, l'odeur, présence ou absence de pigments) ;

- la morphologie microscopique : morphologie des cellules (forme des cellules, type de Gram, mobilité, présence ou absence de spores) ;

- l'identification biochimique : Nous avons utilisés les galeries biochimique API (*api*^r 20 NE, *api*^r 20 E *api*^r staph et *api*^r aux)(Annexe 9)

II.2.2.Vérification du non contamination (pureté) des antiseptiques étudiés

Nous avons effectué un test de pureté sur les antiseptiques étudiés avant l'étude de leur activité antimicrobienne, selon la **Pharmacopée Européenne 6^e édition., 2008 (Annexe 8)** Nous avons procédé de la manière suivante :

- 1- Nous avons réalisé un dénombrement des germes aérobies viables totaux : Pour cela, nous avons utilisé la gélose Trypticase Soja Agar TSA pour les bactéries, avec une incubation de cinq jours à 37°C, et la gélose Sabouraud pour les levures et les moisissures, incubé à 25°C pendant aussi cinq (5) jours.
- 2- Nous avons recherché les Entérobactéries et certaines bactéries à gram négatif sur la gélose glucosé biliée au cristal violet et rouge neutre (VRBG) après incubation à 37°C pendant 48 h.
- 3- Nous avons vérifié l'absence de *Pseudomonas aeruginosa* sur la gélose Cétrimide, pendant 72h à 37°C et l'absence de *Staphylococcus aureus* sur la gélose Chapman à 37°C pendant 48 h.

II.2.3. Méthode d'étude *in vitro* de l'activité antimicrobienne des antiseptiques testés

II.2.3.1. Méthode d'étude *in vitro* de l'activité bactéricide des antiseptiques testés

II.2.3.1.1. Méthode de dilution-neutralisation

II.2.3.1.1.1.Principe

Cette méthode de suspension est utilisée pour la détermination de l'activité bactéricide, elle est couramment appliquée pour la mise en œuvre des neutralisants pour supprimer les effets bactériostatiques des antiseptiques (**Norme Afnor NF T 72-150., édition 1989**), et la norme Européenne (**Norme NF EN 1040, édition 1997 et 2006**).

Cette méthode comporte deux essais :

- 1- Essai préliminaire : au cours de ce dernier, nous devons apprécier et valider l'efficacité du neutralisant choisi pour l'antiseptique testé.
- 2- Essai proprement dit : au cours de cet essai nous avons suivi les étapes suivantes :
 - Mise en contact l'antiseptique à tester à différentes concentrations avec un inoculum bactérien de départ de $1 \text{ à } 3 \times 10^8$ cellules/ml ;

- Annulation de l'activité d'antiseptique par le neutralisant choisis, après un temps de contact fixé à 5 minutes et une température de 21c° ;
- Mise en culture, en milieu approprié et en profondeur (ou en surfusion) les germes survivants après la neutralisation du produit antiseptique ;
- Une appréciation de la réduction logarithmique ($5\log_{10}$), et détermination de la concentration minimale bactéricide CMB de l'antiseptique testé.

II.2.3.1.1.2. Mode opératoire :**a. Préparation de l'inoculum bactérien de *P. aeruginosa*, *E. coli* et *S. aureus***

Nous avons prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur sur milieu gélosé TSA des colonies de la culture, en respectant l'intégrité de la gélose. Puis nous avons procédé à la dispersion du prélèvement sur la paroi humide d'un tube stérile contenant 10 ml du milieu liquide TSE. Ensuite nous avons obtenu une suspension homogène après agitation aux vortex (pendant 3 à 5 secondes).

Cette suspension est ajusté au spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 620nm, de façon à obtenir une valeur de densité optique (DO) comprise entre 0, 2 et 0,3 pour *Ps. aeruginosa* et *E. coli* et entre 0,3 et 0,45 pour *S. aureus*.

La suspension ajustée doit contenir entre 1.10^8 et 3×10^8 UFC/ ml. Elle ne peut être conservée qu'a entre 15 et 22°C pendant deux heures maximum (**Figure 10**)



Figure 10 : Préparation de l'inoculum bactérien

b- Essais préliminaires de l'activité bactéricide

Notre but est de valider le neutralisant le mieux adapté pour annuler l'activité bactéricide du produit

La suspension bactérienne ainsi obtenue est diluée de façon à ce qu'elle contienne de $2,10^3$ à $6,10^3$ Cellule/ml cette dernière constitue la suspension d'essai, puis une dernière dilution de 1/20 est réalisée et un dénombrement sur gélosé PCA est effectué après un ensemencement en profondeur de 1ml de cette dilution et une incubation de deux jours à 37°C , pour déterminer N = dénombrement de contrôle qui doit être entre 100 et 300 colonies).

Pour chaque type de souche bactérienne, nous avons mis en contact à la température du laboratoire (environ 21°C) le produit essayé à sa plus forte concentration et le neutralisant convenable. Nous

avons ajouté la suspension bactérienne titrant de $2 \text{ à } 6.10^3 \text{ Cellule/ml}$, puis laissé en contact 5 mn avant d'ensemencer en profondeur de 1ml du mélange avec la gélose PCA, une incubation à 37°C pendant deux jours a été réalisé, puis nous avons dénombré les bactéries survivantes pour déterminer n' (dénombrement essai en présence du produit à sa concentration maximale).

Un témoin à été réalisé dans les mêmes conditions en plaçant la suspension bactérienne ($2 \text{ à } 6.10^3 \text{ Cellule /ml}$) dans un mélange : eau distillée + neutralisant, puis nous avons réalisé un dénombrement sur la gélose PCA pour déterminer N' (dénombrement témoin et qui est proche de N).

Nous avons ensuite vérifié que n' (nombre de colonies dans l'essai) est supérieur ou égal à $1/2 N'$ (nombre de colonies dans le témoin) [$n' \geq 0.5N'$], cela veut dire qu'on doit retenir pour chacune des souches le neutralisant qui permettrait d'obtenir comparativement au témoin au moins 50% des bactéries survivantes. Si cette condition n'est pas remplie, le neutralisant n'est pas validé et l'essai doit être rejeté. A ce moment là, un autre neutralisant doit être testé (**Figure 11**)

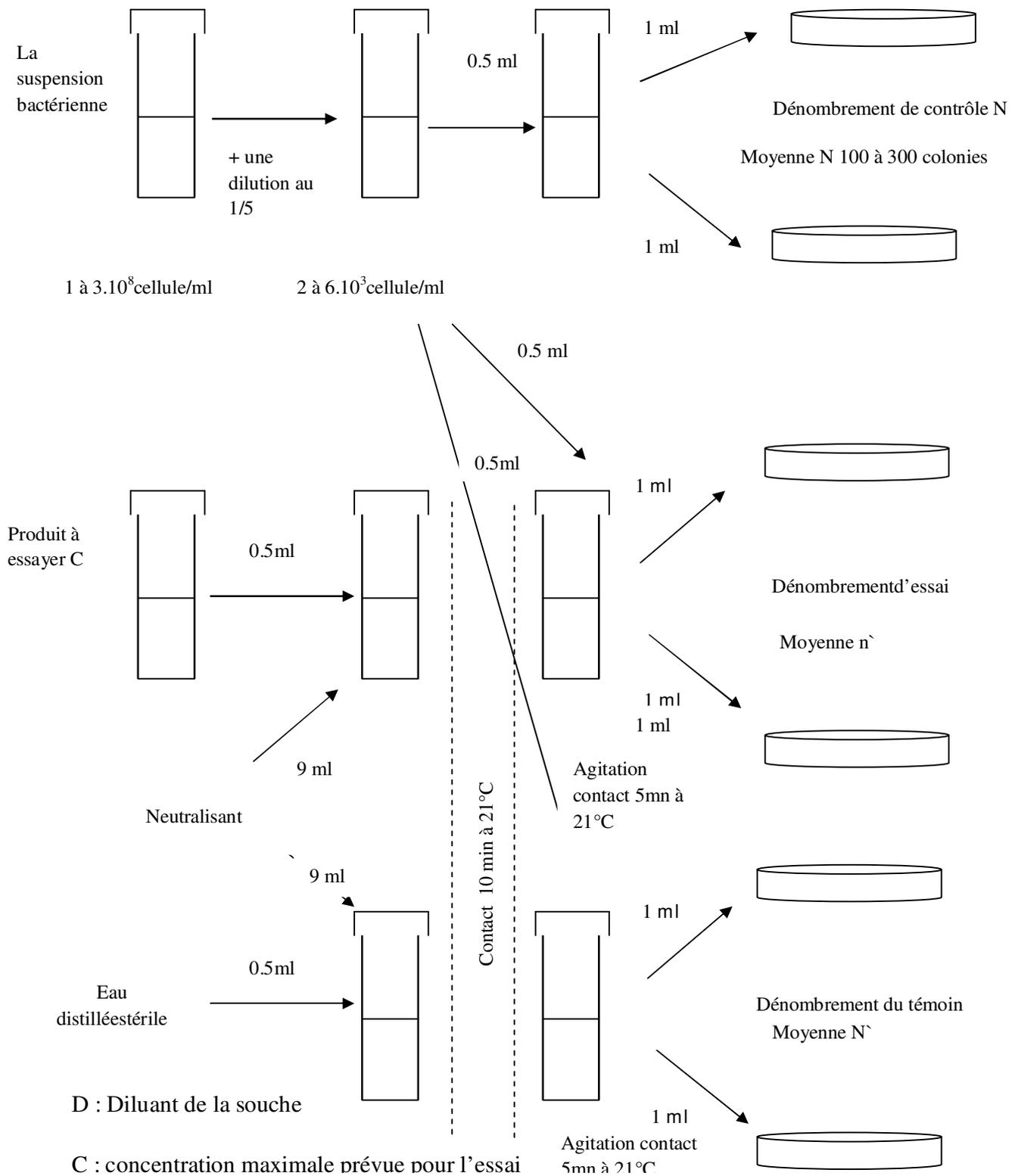


Figure 11: Essai préliminaire pour une souche bactérienne et une seule concentration du produit a testé

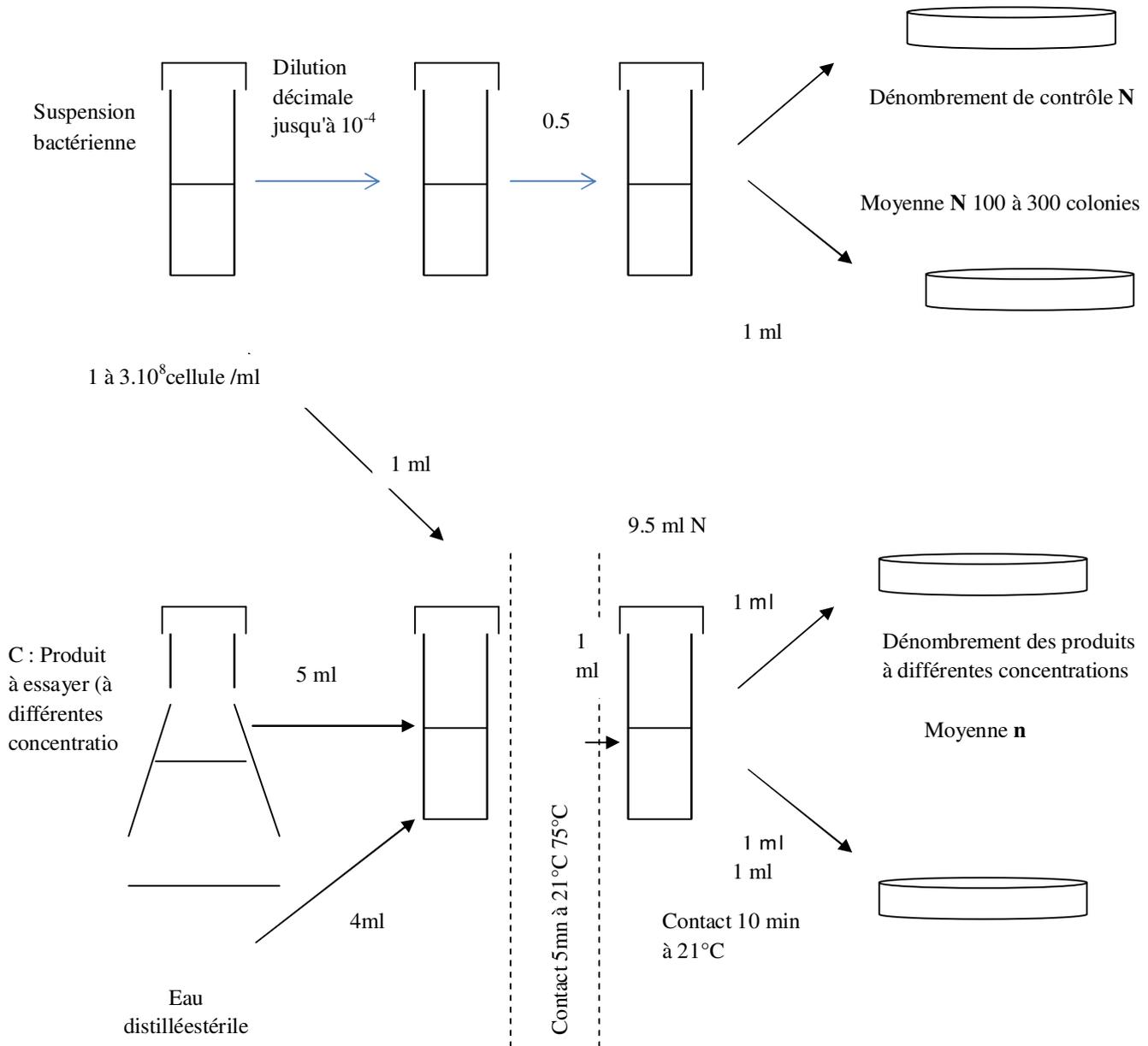
c- Essai proprement dit de l'activité bactéricide

Dans les mêmes conditions que pour l'essai préliminaire nous avons utilisé la même suspension bactérienne titrant de 1×10^8 à 3×10^8 cellule/ml dans l'essai proprement dit.

Selon le degré ou la concentration présumée d'activité du produit soumis à l'essai, nous avons préparés une gamme de dilution pour chaque antiseptique testé en utilisant 5 ou 6 concentrations différentes dans l'eau distillée stérile.

Pour chaque dilution du produit à testé, et pour chacune des souches, les cellules bactériennes (1 à $3 \cdot 10^8$ Cellule /ml) sont mises en contact avec le produit à 21°C , et au bout de 5 minutes exactement de contact, une fraction de ce mélange est transféré dans le neutralisant. Après 10 mn de contact (avec le neutralisant), des dénombrements sont réalisés sur l'agelose PCA, pour déterminer **n** (figure 12).

Nous avons ensuite vérifié que **n** (nombre de colonies dans l'essai du produit à différentes concentrations) est inférieur ou égale $\mathbf{1/10 \times N'}$ (nombre de colonies dans les témoins, $\left[n \leq \frac{N'}{10} \right]$, ceci correspond à une réduction de 10^5 fois du nombre de cellules bactériennes selon la norme Afnor NF T 72-150, édition 1989 et la norme Afnor CEN NF-EN 1040, édition 2006), ce qui nous a permis de rechercher pour chacune des souches la concentration minimale bactéricide (CMB) pour laquelle ($n \leq N' / 10$)



D :Dilution

N : neutralisant

C : concentration du produit après dilution.

Figure 12 : Essai proprement dit pour une souche bactérienne et dilution du produit à testé

Cet essai est effectué avec une suspension bactérienne parfaitement définie (1 à 3×10^8 Cellule/ml), pour être reproductible et pour permettre d'apprécier l'activité bactéricide selon les critères retenus.

Pour rechercher la réduction de 10^5 fois du nombre de cellules viables, l'antiseptique a été mis en présence de 10^7 cellules/ml. Si en 5 minutes l'effet bactéricide est produit, il restera 10^2 cellules viable/ml.

Nous avons ensuite procédé à un transfère dans le neutralisant entraînant une dilution de 1/10 et le dénombrement des survivants (**n**) a fait apparaître 10 à 30 colonies (en fonctions du titre précis de la suspension d'origine qui doit être de 1 à 3×10^8 cellules/ml)

Remarque :

Ce rappel est important car tout essai réalisé avec un inoculum moins riche ne peut permettre d'apprécier l'activité bactéricide recherchée car même l'absence totale de survivants correspondant à une réduction de 10^4 ou 10^3 fois du Nombre de cellules viables au lieu de 10^5 requis. Cela veut dire que la concentration bactérienne de départ doit être parfaitement définit.

II.2.3.2. Méthode d'étude in vitro de l'activité sporocide des antiseptiques testés**II.2.3.2.1. Méthode de dilution- neutralisation**

II.2.3.2.1.1. Principe : voir principe de l'activité bactéricide.

Nous avons appliqué la méthode de dilution-neutralisation selon la norme française NF T 72-230, édition 1989 et selon la norme européenne NF EN 14347, édition 1997 et 2005.

II.3.2.1.2 Mode Opérateur**a. Préparation de l'inoculum (spores de *Bacillus subtilis*)**

Cette préparation se déroule en 5 jours au minimum et 10 jours au maximum.

Au 1^{er} jour : nous avonsensemencé dans un bouillon spécial pour les bacillus la souche de *Bacillus subtilis*, puis nous avons incubé à 30°C pendant 24 heures.

Au 2^{ème} jour : nous avons transférés 2 à 3 ml du bouillon de *Bacillus*, dans des boîtes Pétri contenant 15 ml de gélose pour préparer les spores. Ces boîtes doivent subir diverses inclinaisons de façon à ce que l'inoculum vienne en contact avec la totalité de la surface gélosé. Nous avons éliminé l'excès du bouillon et incubé ces boîtes à 30°C pendant 3 jours.

Après 3 jours d'incubation, nous avons observé l'état de notre culture au microscope pour voir la sporulation qui par la coloration de gram nous montre la présence ou non de spores. Cette sporulation peut durer 8 à 10 jours. A la présence de spores nous avons prélevés la totalité des colonies, on les met dans des flacons spéciaux pour la centrifugation contenant 40 ml de l'eau distillée stérile. Puis nous avons effectués une centrifugation à 3000 tours/min pendant 10 min, après ce temps nous avons éliminé le surnageant. Le culot ainsi obtenu est de nouveau mis en suspension avec de l'eau distillée stérile dans un tube à vis et chauffés à 80°C pendant 20 min pour éliminer toute les formes végétatives (**Figure 13**).

Outre l'essai, cette suspension peut être gardée à 4°C au réfrigérateur. Mais toutefois avant la manipulation il faudra la chauffer à 80C° pendant 20 min.

Cette suspension est ajustée au spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 620 nm, de façon à obtenir une valeur de densité optique égale à 1.

Cette absorbance correspondant à une concentration de 2.10^8 spores/ml, qui est comprise entre 1 à 3.10^8 spores/ml.



Figure 13: Préparation de l'inoculum des spores

b. Essai préliminaire de l'activité sporocide

Le but de cet essai est de valider le neutralisant choisis pour l'annuler l'activité sporocide du produit testé.

Dans cette partie, la suspension mère de spores a été diluée (dilution $1/10^{\text{ème}}$ et une dilution au $1/5$) de façon à obtenir une concentration de $2 \text{ à } 6.10^3$ spores/ml dans des tubes contenant 9 ml d'eau distillé, et un dénombrement a été réalisé après une dernière dilution au $1/20^{\text{ème}}$ pour déterminer **N**.

Dans un second temps, nous avons mis en contact le produit a essayé et le neutralisant choisi pendant 10 min à 20°C , puis nous avons ajoutés la suspension de spore à sa concentration de $2 \text{ à } 6.10^3$ spores/ml, pendant 1 heure à 20°C (ou 5 min à 75°C), et un dénombrement a été réalisé après une incubation de 72 h à 30°C , et nous avons déterminé **n** (nombre de colonies dans l'essai).

Un témoin été réalisé dans les même conditions, en plaçant la suspension de spores dans un mélange : eau distillé + neutralisant, ce qui nous a permet de déterminer **N'** (nombre de colonies dans le témoin **(Figure 14)**).

Nous avons ensuite vérifiés que **$n \geq 0.5 N'$ et $N' \approx N$** . Si cette condition n'est pas remplie, l'essai devrait être rejeté et le neutralisant doit être changé.

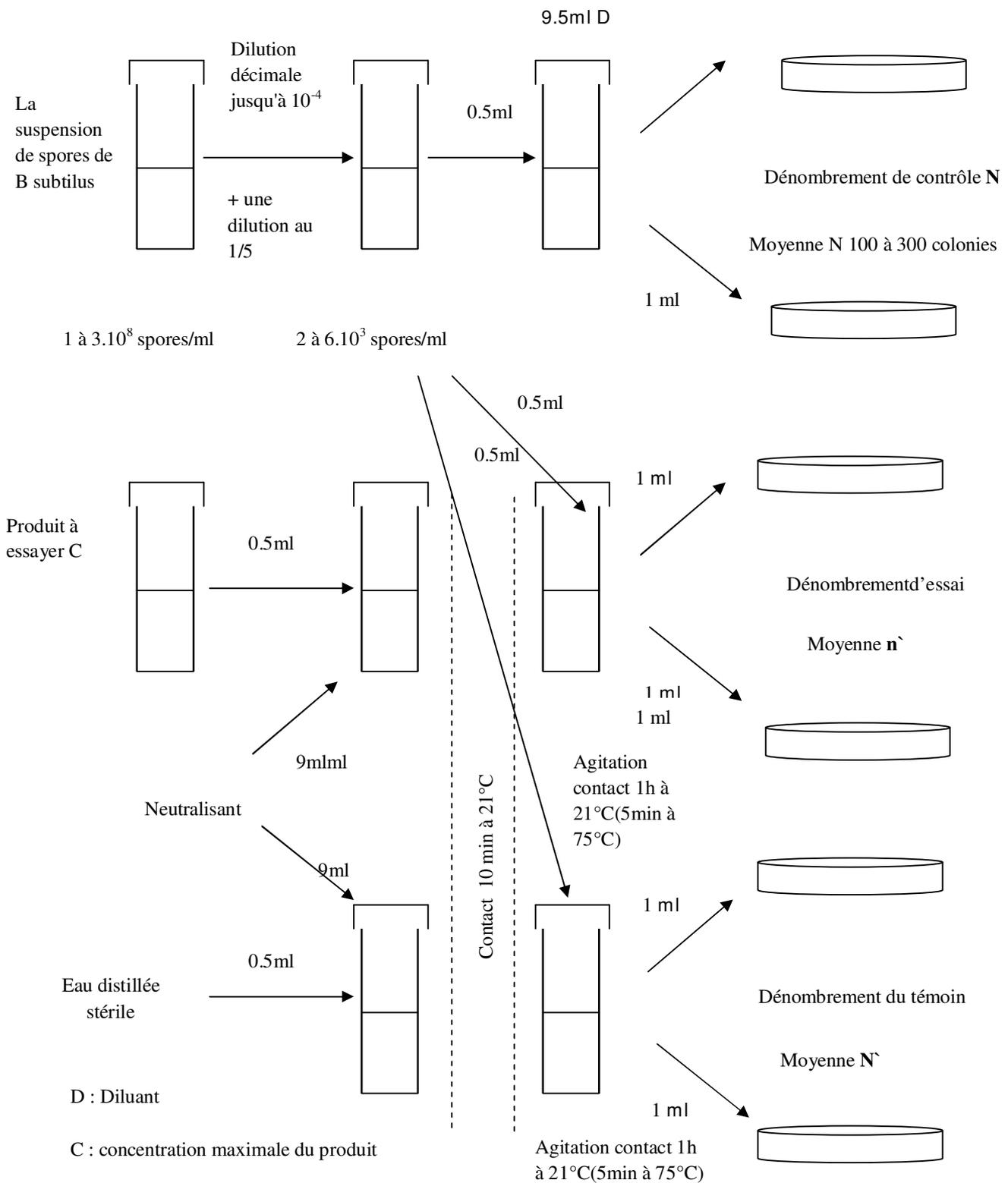


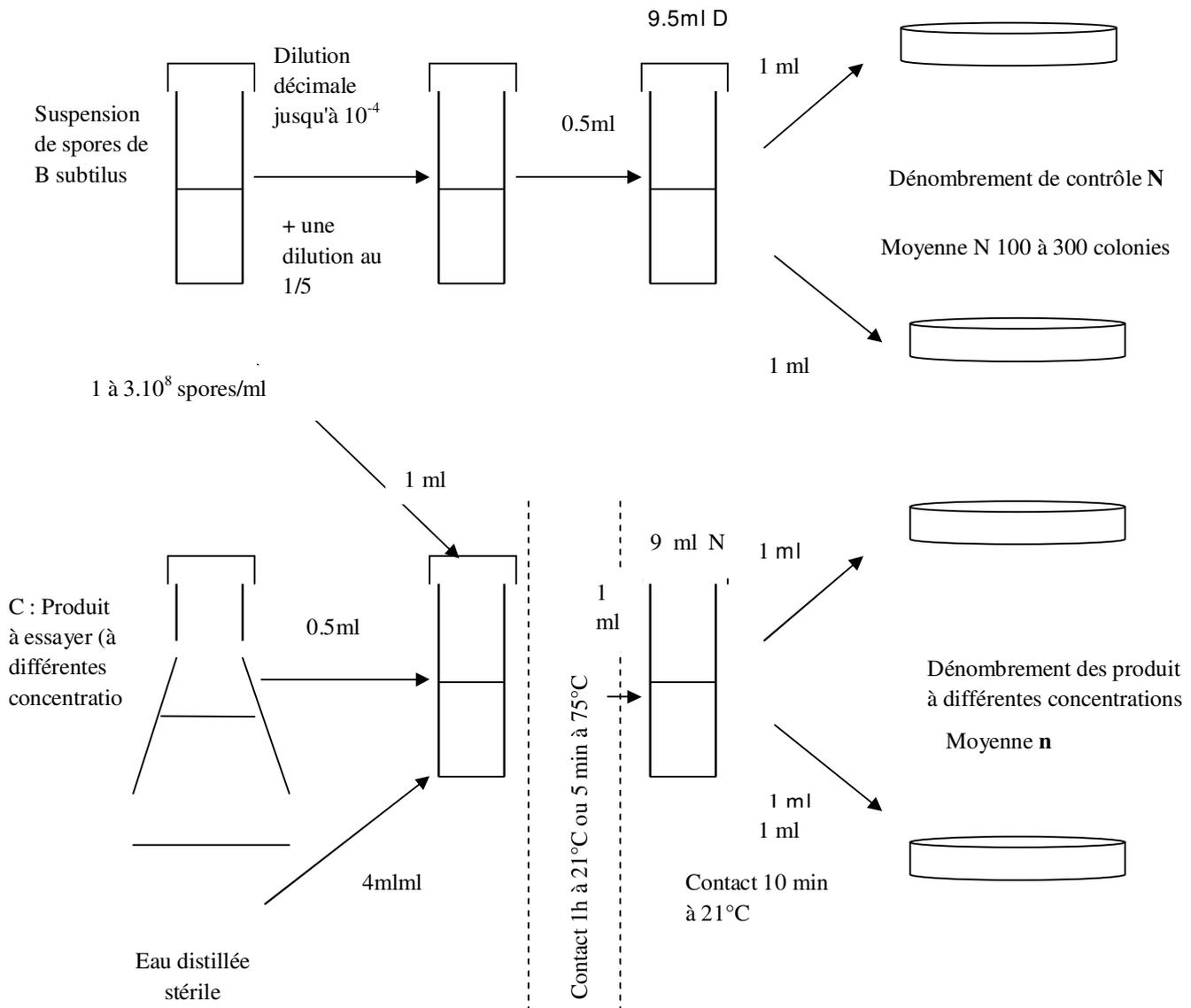
Figure 14 : Essai préliminaire de l'activité sporicide

c. Essai proprement dit de l'activité sporocide

Selon le degré ou la concentration présumée d'activité du produit soumis à l'essai, nous avons préparé une gamme de dilution pour chaque produit testé.

Et pour chaque dilution du produit à testé, nous avons ajouté la même suspension de spores (1 à 3.10^8 spores/ml) préparé lors de l'essai préliminaire, et qui ont été mises en contact pendant 1h à 20°C (souche+produit), tout en agitant au vortex toute les 10 minutes. A la fin du contact nous avons transféré 1 ml de ce mélange dans des tubes contenant 9 ml de neutralisant adéquat pour chaque produit. Après 10 min de contact à 20°C , nous avonsensemencé 1ml des du mélange Produit- souche – neutralisant en surfusion avec la gélose de dénombrement de spores. Après une incubation de 72h à 30°C , et nous avons réalisé un dénombrement pour chaque dilution du produit pour déterminer **n** (nombre de colonies dans l'essai du produit à différentes concentrations)(**Figure 15**).

Ensuite nous avons vérifiés que $n \leq 1/10.N'$, qui correspond à une réduction de 10^5 fois du nombre de spores, selon Afnor NF T 72- 230, édition 1989 et NF EN 14347, édition 1997 et 2005. Si cette condition est remplie, la concentration minimale sporocide CMS pour chaque produit testé vis-à-vis de la souche de *Bacillus subtilis* est déterminée.



D : Diluant de la souche

N : neutralisant

C : Concentration du produit après dilution

Figure 15 : Essai proprement dit de l'activité sporocide

II.2.3.3. Méthode d'étude in vitro de l'activité fongicide des antiseptiques testés

II.2.3.3.1.Méthode de dilution et neutralisation

II.2.3.3.1.1Principe : Voir le principe de l'activité bactéricide

Nous avons appliqué la méthode de dilution- neutralisation selon la norme française NF T72-150, édition 1989, et selon la norme européenne NF EN 1275, édition 1997 et 2006.

II.2.3.3.1.2. Mode opératoire

a. Préparation de l'inoculum

L'inoculum a été préparé à partir de la souche *Candida albicans* ATCC 10231 ensemencé sur milieu Sabouraud.

Nous avons prélevé 2 à 3 colonies de cette souche, en respectant l'intégrité de la surface de la gélose de notre culture. Puis dans un tube à essai contenant 10 ml d'eau physiologique, nous avons dispersé le prélèvement sur la partie non immergé du tube. Après agitation au vortex (3 seconds) nous avons obtenu une suspension très homogène. Cette suspension doit contenir 1.10^7 Cellule/ml à 3.10^7 Cellule/ml, pour cela on a utilisé la cellule de mallassez, pour dénombrer et estimer le nombre de cellules (levures) /ml. Après préparation de la cellule et observation au microscope optique au grossissement ($40 \times 10 = 400$), nous avons précisé un champ microscopique et puis nous avons compté les cellules de levures dans ce champ. Le compte est fiable si le nombre de levures comptées dans 0.01 mm^3 est compris entre 20 et 100(**Figure 16**).

La suspension ajustée est conservée à 20°C, elle doit être utilisée dans les deux heures qui suivent la préparation.



Figure 16: Préparation de l'inoculum fongique

b. Essais préliminaire de l'activité fongicide

Notre but est de valider le neutralisant choisis pour chaque produit testé.

La suspension mère de levures déjà préparé à $5 \cdot 10^7$ Cellule/ml a été diluée plusieurs dilutions décimales jusqu'à 10^{-4} qui correspond à une concentration de 1 à $5 \cdot 10^3$ Cellule/ml, cette suspension a été mise en contact avec le produit a testé à sa plus forte concentration et son neutralisant convenable pendant 15 minutes à 20°C pour déterminer n^{\wedge} (nombre de colonies qui correspond aux nombres de bactéries survivantes) après le dénombrement sur la gélose de dénombrement de levures. Dans les mêmes conditions, nous avons réalisés un témoin pour chaque produit, en plaçant la suspension de levures dans un mélange : eau distillée + neutralisant pour déterminer N^{\wedge} (nombre de colonies dans le témoin).

La suspension d'essai de 1 à $5 \cdot 10^3$ Cellule/ml a été encore une fois diluée de $1/20^{\text{ème}}$, et un dénombrement été effectué sur la gélose de dénombrement de levure, après une incubation de 72 heures à 30°c , ou nous avons déterminés N (dénombrement de la suspension de levures, titrant entre 50 et 150 UFC/ml) (**Figure 17**)

Nous avons ensuite vérifiés que N^{\wedge} est proche de N ($N^{\wedge} \approx N$) et $n^{\wedge} \geq 0.5N^{\wedge}$.

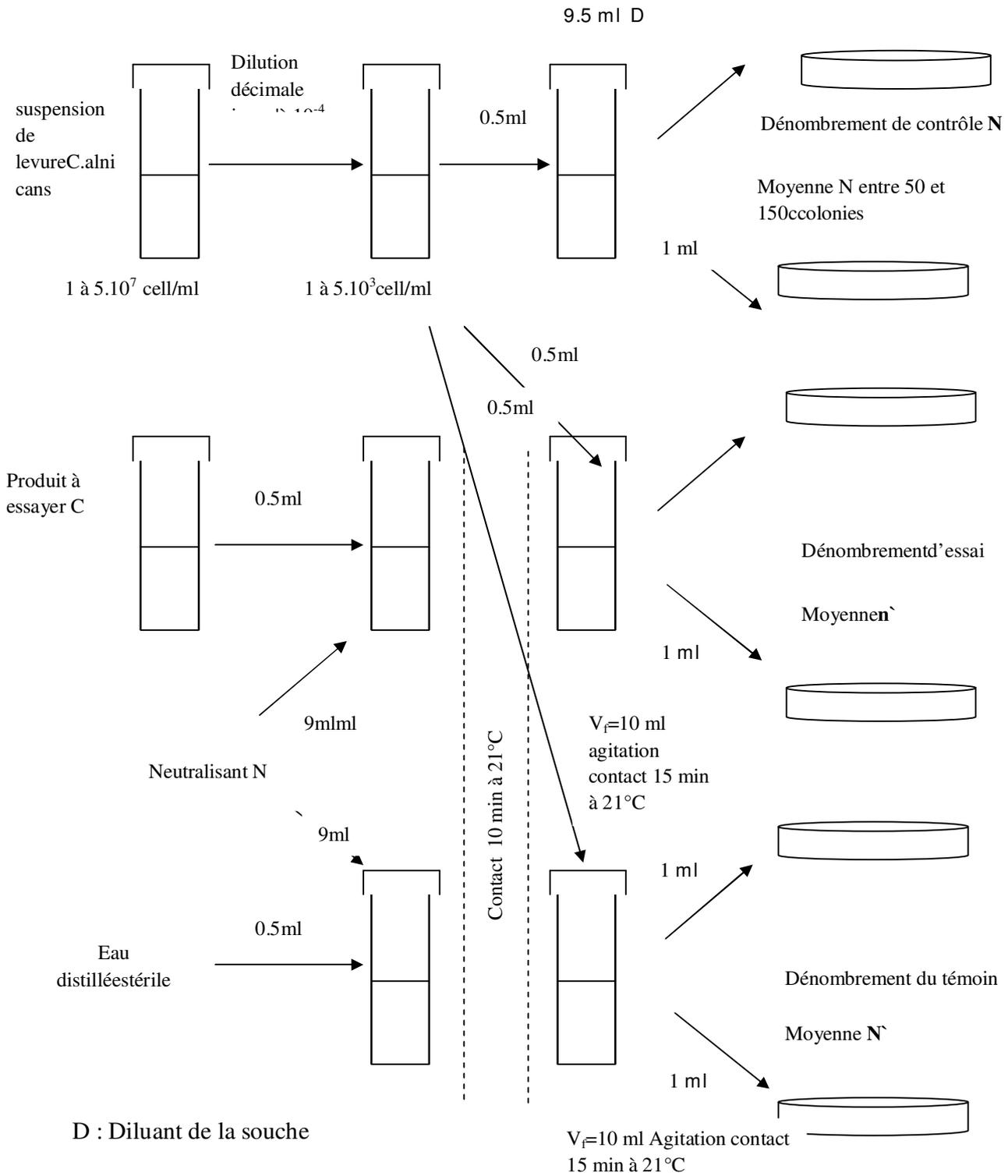


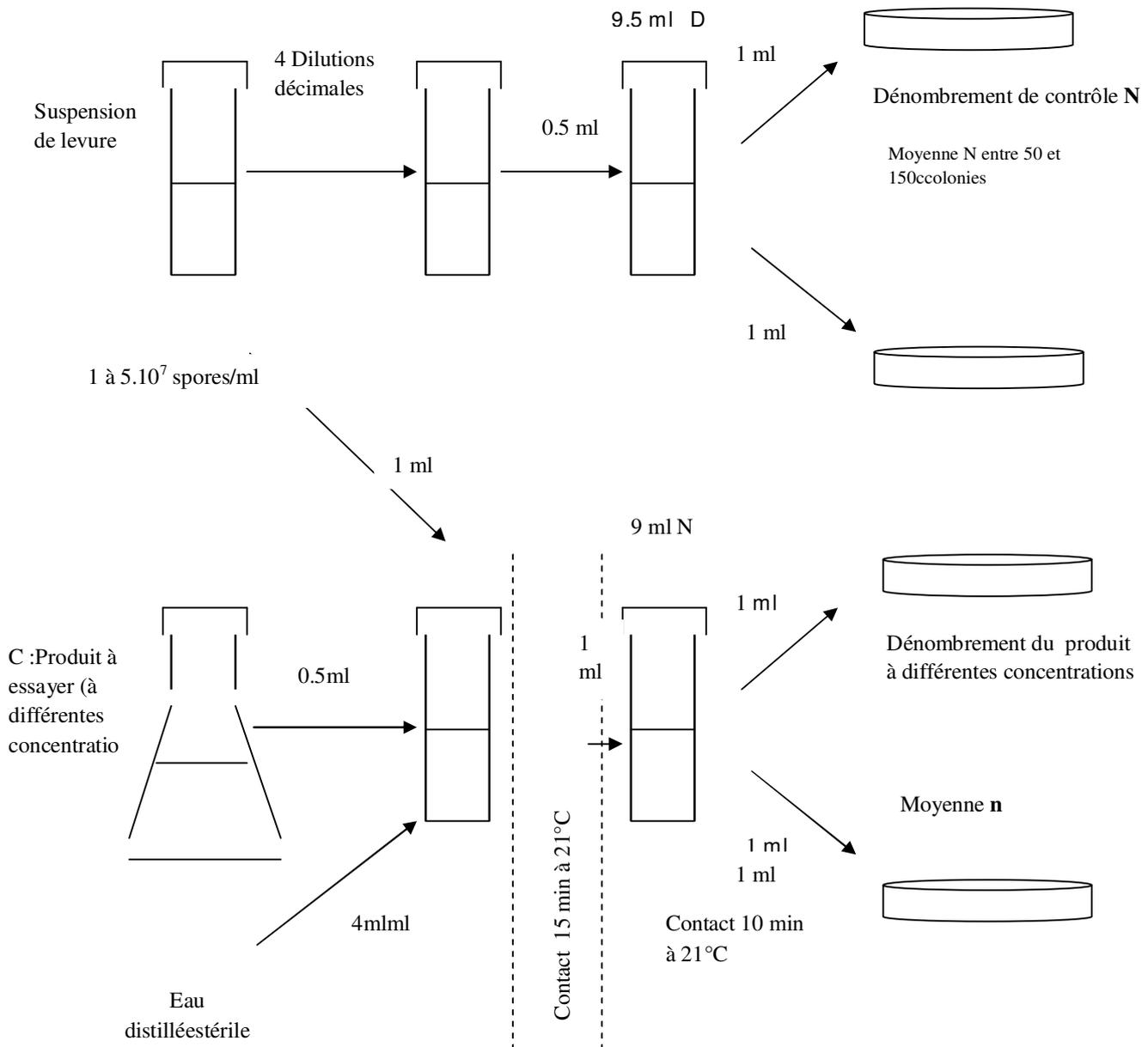
Figure 17 : Essai Préliminaire de l'activité fongicide.

c. Essai proprement dit de l'activité fongicide

Nous avons préparés pour antiseptique testé une gamme de dilutions selon le degré ou la concentration présumée d'activité du produit soumis à l'essai.

Pour chaque concentration du produit à testé, nous avons ajouté la même quantité de la suspension mère de levure (1 à $3 \cdot 10^7$ Cellule/ml) et qui ont été laissées en contact 15 minutes à 21°C (souche+produit). Après, nous avons transféré 1 ml de ce mélange dans un tube de 9 ml de neutralisant convenable pour chaque antiseptique, à 21°C pendant 10 min (**Figure 18**).

Nous avons déterminés **n** (nombre de colonies dans l'essai du produit à différentes concentrations) après un dénombrement réalisé sur la gélose de dénombrement et une incubation de 72 heures à 30°C, puis nous avons vérifié que $n \leq 1/10 \cdot N$ ce qui correspond à une réduction de 10^4 fois du nombre de levures préparés initialement selon la norme Afnor NF T 72- 150, éditions 1989 et la norme européenne NF EN 1275, édition 1997, 2006. Et c'est la condition pour laquelle nous avons pu déterminer la concentration minimale fongicide CMF pour chaque antiseptique testé vis-à-vis de la levure *Candida albicans*.



D : Dilution

N : neutralisant

C : Concentration du produit après dilution

Figure 18 : Essai proprement dit de l'activité fongicide pour une dilution du produit à testé

III.1. Résultats:

III.1.1. Résultats de la vérification de l'identité des souches de référence:

L'étude des caractères culturels des colonies des souches tests (macroscopie : Forme , Taille , Surface , Couleur , Consistance , Opacité , Odeur) , caractères morphologiques des cellules microbiennes (microscopie :Cocci , bacille , mode d'arrangement , mobilité , présence ou absence de spores) et l'étude des caractères biochimiques (**Annexe 10**) confirment l'identité des cinq souches utilisées dans ce travail à leurs références(**Tableau VII Annexe 11**)

III.1.2. Résultats de la pureté (le non contamination) des différents antiseptiques testés

Tous les produits testés sont purs et aucune contamination n'a été trouvée, cela est illustré par les résultats obtenus et qui sont regroupés dans le **tableau IX**.

Tableau IX : Résultats de la pureté des antiseptiques testés.

Produit Test	Polyvidone iodée 10%	Digluconate de Chlorhexidine 0,5%	Alcool chirurgical 90°	Eau oxygénée 10V	Norme (Pharmacopée européenne)
Dénombrement des germes viables totaux	00	00	00	00	-Maximum 10 ² bactéries/ml -Maximum 10 ² moisissures et levures /ml
Recherche des entérobactéries et autres Gram négatifs	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance	Absence de croissance
Recherche de	Pas de	Pas de	Pas de	Pas de	Absence

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	croissance	croissance	croissance	croissance	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans 1ml
Recherche du <i>Staphylococcus aureus</i>	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance	Absence de <i>Staphylococcus aureus</i> dans 1ml

(Pharmacopée^{6^{ème}} édition, 2008)

III.1.3. Résultats d'étude *in vitro* de l'activité antimicrobienne des différents antiseptiques testés

III.1.3.1. Polyvidone iodée PVP-I

III.1.3.1.1- Résultat préliminaire (validation du neutralisant= Thiosulfate de Sodium 0,5%)

Les résultats d'essai préliminaire pour valider le neutralisant adéquat pour la polyvidone iodée PVP-I10% sont regroupés dans le **tableau X**

Tableau X: Essai préliminaire du Polyvidoneiodée (PVP-I) 10% (Septidine®)

Souches testés	N° de Test	N Dénombrement contrôle (100 – 300 colonies)	(c°) du produit en mg/l	N° Dénombrement témoin thiosulfate de Na à 0.5% + eau distillée	n' Dénombrement essai thiosulfate de Na à 0.5% + produit
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1	202	4000	180	145
	2	168		111	95
	3	186		108	105
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	146	4000	120	104
	2	222		182	154
	3	171		120	71
<i>S.aureus</i> ATCC 25923			4000	190	145
	1	210		120	85
	2	120		147	104
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	3	147	4000		
	1	156		144	103
	2	162		140	99
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	3	144	4000	136	74
	1	120		106	79
	2	128		112	95
	3	147		110	82

D'après le **tableau X**, nous constatons que N' est proche de N et $n' > 0.5N'$, cela prouve que le thiosulfate de sodium à 0.5% est le neutralisant approprié à cet antiseptique.

Ce neutralisant a permis d'obtenir au moins 50% de micro-organismes survivants (n') de l'action du produit comparativement au témoin (N'), donc le thiosulfate de sodium à 0.5% est le neutralisant le mieux adapté pour valider l'essai préliminaire et entamer l'essai proprement dit.

III.1.3.1.2. Résultat proprement dit du Polyvidone iodée PVP-I

Les résultats du test proprement dit du polyvidone iodée 10% sont regroupés dans le **tableau XI** et représentés par la **figure 20**.

Tableau XI : concentrations minimales bactéricides, sporocides et fongicides en mg/l de la polyvidone iodée :

Souches	N °de test	N' Dénombrement témoin	n (nombre de colonies en fonction de la concentration du produit en mg/l)				
			4000	2000	1000	500	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1	202	00	16	23	240	370
	2	168	00	14	33	190	249
	3	186	00	20	25	310	320
				m=0	m=17	m=27	m=247
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	146	00	00	16	27	196
	2	222	00	00	22	31	242
	3	171	00	00	18	24	215
				m=00	m=00	m=19	m=27

<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1	210	00	28	32	354	342
	2	120	00	18	27	269	372
	3	147	00	26	31	278	296
			m=00	m=24	m=30	m=300	m=337
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1	144	00	25	27	297	351
	2	140	00	21	33	322	344
	3	136	00	16	28	237	293
			m=00	m=21	m=29	m=285	m=329
<i>C. albicans</i> ATCC 21031	1	20	00	14	32	264	320
	2	128	00	16	43	342	372
	3	147	00	16	33	249	295
			m=00	m=15	m=36	m=285	m=329

m: la moyenne du nombre de colonies calculée dans les trois tests.

Les concentrations minimales s'échelonnent entre 4000 et 250 mg/l.

Nous remarquons, d'après le **tableau XI**, une bonne efficacité de Polyvidone iodée (Septidine®) sur toutes les souches ($n < N'/10$), cela montre que le produit exerce une réduction de 5 log de 10 pour les bactéries et les spores, et 4 log de 10 pour les levures, qui correspond à un pourcentage de destruction de 99.99%.

Nous avons obtenus une CMB de 2000 mg/l pour *P. aeruginosa*, *S. aureus* et une très bonne activité sur *E. coli* avec une CMB entre 1000 et 500 mg/l.

On note aussi respectivement, une concentration minimale sporocide CMS et fongicide CMF de 2000 mg/l pour *B. subtilis* et sur les levures de *C. albicans*.

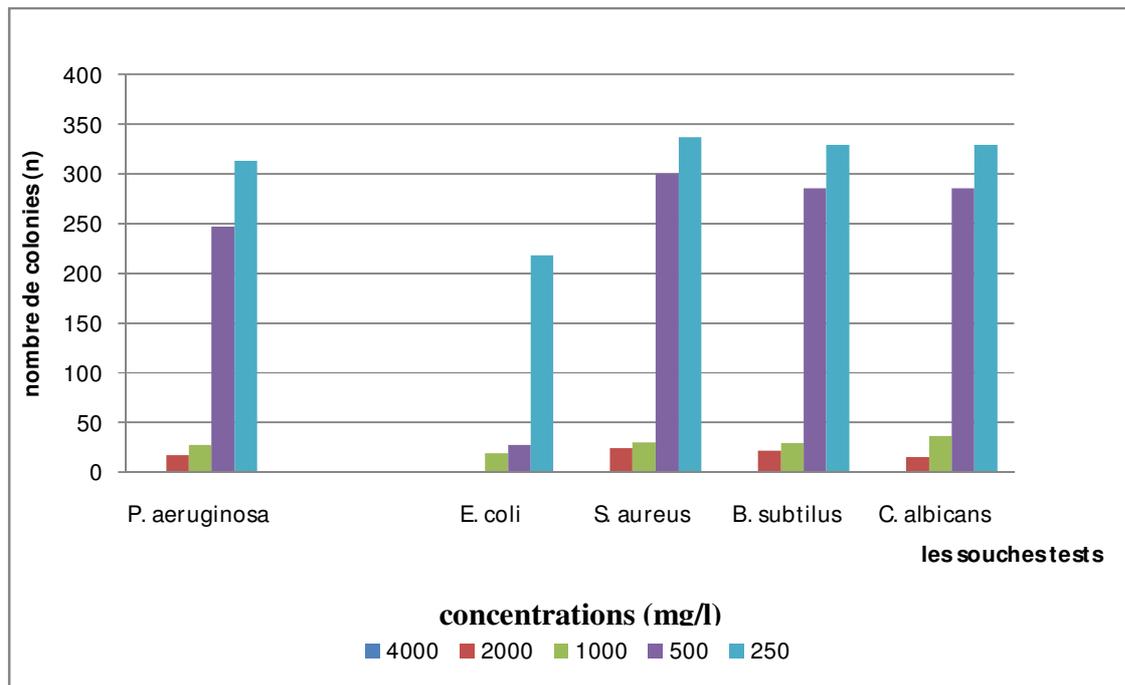


Figure 19 : Concentrations minimales bactéricides, sporocides et fongicides en mg/l du polyvidone iodée (Septidine®)

III.1.3.2. Digluconate de chlorhexidine 0,5% :

III.1-3.2.1. Résultats préliminaire (validation du neutralisant =Jaune d'œuf à 10%)

Les résultats d'essai préliminaire du digluconate de chlorhexidine, dont le but de valider le neutralisant appropriée, sont regroupés dans le **tableau XII**

Tableau XII: Résultats Essai préliminaire chlorhexidine 0,5 %

Souches tests	N° de Test	N Dénombrement contrôle (100 – 300 colonies)	(c°) du produit en mg/l)	N'		n' Dénomb essai. d'œuf d'œuf produit
				Dénombrement témoin Jaune 10% distillée	d'œuf +Eau	
<i>Pseudomonas. aeruginosa</i> ATCC 27853	1	165	5000	110		64
	2	153		132		78
	3	234		152		102
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	213	5000	162		198
	2	209		181		102
	3	155		132		87
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1	246	5000	235		111
	2	251		188		105
	3	178		147		95
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1	168	5000	173		168
	2	194		206		152
	3	216		231		160
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1	136	5000	122		94
	2	151		138		104
	3	127		109		78

Les valeurs du **tableau XII** montrent l'efficacité de notre neutralisant (Jaune d'œuf), puisque (n') est toujours supérieur ou égale le moitié de N' ($n' > N'/2$).

Donc nous avons obtenu au moins 50% des micro-organismes, qui sont protégés de l'action antimicrobienne du digluconate de Chlorhexidine.

III.1.3.2.2. Résultats proprement dit du Digluconate de Chlorhexidine

Les résultats du test proprement dit de digluconate de Chlorhexidine sont regroupés dans le **Tableau XIII**, et représentés par la **figure 21**.

Tableau XIII: Concentrations minimales bactéricides, sporocides et fongicides en mg/l de Digluconate de Chlorhexidine.

Souches	n° de test	N' Dénombrement témoin	n (nombre de colonie en fonction de la concentration du produit en mg/l)					
			5000	2000	1000	700	500	250
<i>Pseudomonas. aeruginosa</i> ATCC 27853	1	110	00	14	83	287	+	+
	2	132	00	16	105	353	+	+
	3	152	00	20	123	400	+	+
			m=00	m=17	m=279	m=347		
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	162	00	00	22	104	271	+
	2	181	00	00	30	133	285	+
	3	132	00	00	19	97	362	+
			m=00	m=00	m=24	m=111	m=306	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1	235	00	00	07	28	136	+
	2	188	00	00	03	23	204	+
	3	147	00	00	00	20	97	+
			m=00	m=00	m=03	m=24	m=146	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1	173	+	+	+	+	+	+
	2	206	+	+	+	+	+	+
	3	231	+	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1	122	07	15	99	258	323	
	2	138	11	18	145	261	294	+
	3	109	00	13	177	184	242	+
			m=6	m=15	m=140	m=234	m=286	+

m : La moyenne calculée du nombre de colonies issue des trois tests.

+ : nombre de colonies supérieur ou égale à 1000.

Les concentrations minimales germicides s'échelonnent entre 5000 mg/l et 200 mg/l.

D'après le **Tableau XIII**, La Chlorhexidine testée est très active sur les bactéries Gram positifs(+) et les bactéries Gram négatifs(-) et sur candida albicans ($n \leq N/10 N$)

Par contre nous n'avons remarqué aucune activité sporocide sur les spores de *Bacillus subtilis*.

On note une CMB de 700 mg/l pour *S. aureus*, de 1000 mg/l pour *E. coli*, de 2000 mg/l pour *P. aeruginosa* et une concentration minimale fongicide CMF de 2000 mg/l pour *Candida albicans* aussi.

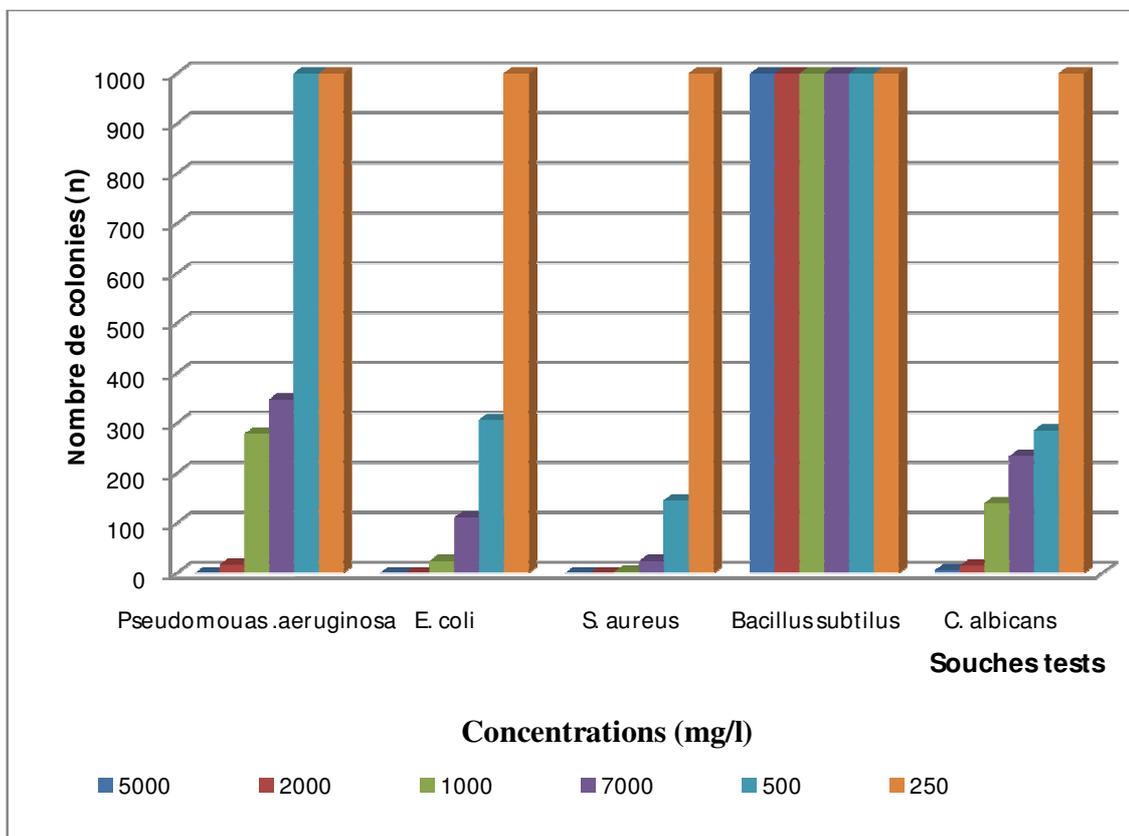


Figure 20 : Concentrations minimales bactéricides, sporocides et fongicides en mg/l du digluconate de chlorhexidine.

III.1.3.3 .Alcool Chirurgical 90°

III.1.3.3.1 : Résultats préliminaire (validation du neutralisant = Tween 80 à 4%+ jaune d'œuf à 2%)

Les résultats de l'essai préliminaire d'Alcool Chirurgical 90° et qui nous ont permet de choisir le neutralisant convenable pour ce produit, sont illustrés dans le **Tableau XIV**.

Tableau XIV : Résultats Essai préliminaire Alcool Ethylique 90°

Souches tests	n° du test	N Dénombrement contrôle (100 – 300 colonies)	(c°) produit degré	du en	N' Dénombrement témoin jaune d'œuf (2%) + tween 80(4%) + eau distillée	n' Dénombrement essai jaune d'œuf (2%) + tween 80(4%) + produit
<i>Pseudomonas. aeruginosa</i> ATCC 27853	1	130	90		166	101
	2	174			153	97
	3	126			116	88
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	204	90		173	126
	2	180			201	120
	3	200			186	114
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1	210	90		168	100
	2	171			187	109
	3	233			190	122
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1	184	90		225	165
	2	170			211	140
	3	206			183	172
<i>C. albicans</i> ATCC 21031	1	169	90		116	83
	2	105			89	55
	3	120			108	62

D'après le **Tableau XIV**, nous avons constaté que $n' > \text{ou égale } 0.5 N'$, cela prouve que le neutralisant utilisé est efficace, car presque le moitié de micro-organismes de chaque souches testées sont protégé de l'effet antimicrobien du produit (effet microbicide ou micro- biostatique du produit).

III.1.3.3.2. Résultat proprement dit Alcool Chirurgical 90°:

Les résultats du test proprement dit d'Alcool chirurgical 90° sont regroupés dans le **Tableau XV** et représentés par la **figure 22**.

Tableau XV : Concentrations minimales bactéricides, sporocides et fongicides en degré d'Alcool Ethylique 90°.

Souches	N° du test	N° Dénombrement témoin	n (nombre de colonie en fonction de la concentration du produit en degré (°))					
			90°	70°	60°	50°	40°	30°
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1	166	96	00	00	00	178	+
	2	153	88	00	00	17	207	+
	3	116	80	00	00	11	169	+
<i>E. coli</i> ATCC 25922			m=88	m=00	m=00	m=13	m=185	
	1	173	101	00	00	13	236	+
	2	203	119	00	09	24	178	+
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3	186	108	00	00	15	174	+
			m=109	m=00	m=00	m=17	m=196	
	1	168	110	11	33	256	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	2	187	122	07	25	241	+	+
	3	190	113	05	19	167	+	+
			m=115	m=08	m=26	m=221		
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1	225	+	+	+	+	+	+
	2	211	+	+	+	+	+	+
	3	183	+	+	+	+	+	+
	1	116	52	00	12	176	+	+
	2	89	80	00	10	243	+	+
	3	108	88	00	20	231	+	+
			m=73	m=00	m=14	m=217		

m : la moyenne du nombre de colonies (n) calculée des Troie test effectués.

+ : nombre de colonies supérieur ou égale à 1000.

Notre gamme de concentration varie de 90% à 30%

D'après les résultats du **Tableau XV**, l'alcool éthylique est très efficace sur les bactéries Gram (+), et les bactéries Gram (-) et sur les levures de *Candida albicans* ($n \leq N/10$)

Nous avons noté aussi une concentration minimale bactéricide CMB de 50% pour *P. aeruginosa* et *E. coli*, et de 60% pour *S. aureus*, ainsi qu'une concentration minimale fongicide CMF de 60% pour *C. albicans*.

Par contre, nous avons constaté que l'Alcool éthylique n'a aucune activité sur les spores de *Bacillus subtilis*, d'où la notion de Resistance.

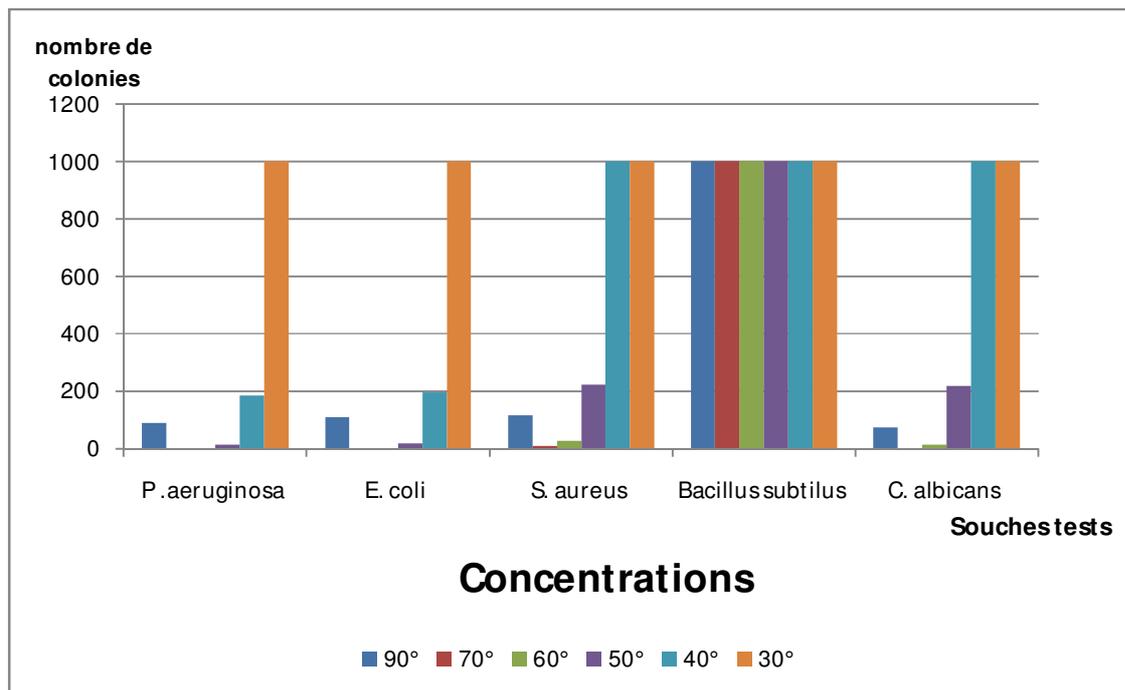


Figure 21 : Concentrations minimales bactéricides, sporocides, et fongicides en % d'Alcool Ethylique (Alcool chirurgicale 90°).

III.1.3.4 L'eau oxygénée 3%

III.1.3.4.1 .Résultat préliminaire (Validation du neutralisant = Tween 80 à 3% +Jaune d'œuf à 5%)

Les résultats d'essai préliminaire d'Eau oxygénée 10V, qui nous ont permis de valider le neutralisant choisi, sont regroupés dans le **Tableau XVI**

Tableau XVI : Résultats Essai préliminaire de peroxyde d'hydrogène 3%.

Souches tests	n° de tests	N Dénombrement contrôle (100 – 300 colonies)	(c°) max du produit en (mg/l)	N' Dénombrement témoin : Tween 80(3%)+Jaune d'œuf(5%) + eau distillée	n' Dénombrement essai : Tween80(3%)+jaune d'œuf(5%) + produit
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	1	210	30.000	190	100
	2	178		143	83
	3	231		151	85
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	216	30.000	184	102
	2	246		201	114
	3	178		123	78
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1	221	30.000	166	80
	2	241		181	110
	3	208		155	96
<i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> ATCC 6633	1	164	30.000	172	106
	2	178		156	86
	3	153		180	113
<i>C. albicans</i> ATCC 20131	1	192	30.000	164	89
	2	164		147	104
	3	184		168	91

D'après le **Tableau XVI**, nous avons constaté que $n' \text{ est } \geq 0.5 N'$, ces valeurs expliquent l'efficacité de Jaune d'œuf à 5% et le tween 80 à 3% utilisé comme neutralisant de l'activité antimicrobienne de l'eau oxygénée 10V .

III.1.3.4.2 .Résultat proprement dit d'Eau Oxygénée (10V) :

Les résultats du test proprement dit d'Eau Oxygénée 10V sont regroupés dans le **Tableau XVII**, et représenté par la **figure23**.

Tableau XVII: concentrations minimales bactéricides, sporocides, fongicides en mg/l de peroxyde d'hydrogène.

Souches	n° du test	N' Dénombrement témoin	n (nombre de colonie en fonction de la concentration du produit en mg/l)				
			30.000	24.000	18.000	12.000	6000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1	192	00	+	+	+	+
	2	143	00	+	+	+	+
	3	151	00	+	+	+	+
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	184	00	+	+	+	+
	2	201	00	+	+	+	+
	3	123	00	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1	166	00	+	+	+	+
	2	181	00	+	+	+	+
	3	155	00	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1	172	00	+	+	+	+
	2	156	00	+	+	+	+
	3	180	00	+	+	+	+
<i>C. albicans</i> ATCC 20131	1	164	00	+	+	+	+
	2	147	00	+	+	+	+
	3	168	00	+	+	+	+

+ : nombre de colonies supérieur ou égale à 1000.

Notre gamme de concentrations minimales varie de 30.000 mg à 6000 mg/l.

Les résultats du **Tableau XVII**, nous a permet de montrer que l'Eau oxygénée 10V testé n'est efficace qu'a la concentration initiale 30.000 mg/l sur les souches microbiennes (bactéries, levures et spores). Et moins de cette concentration nous observons aucune activité.

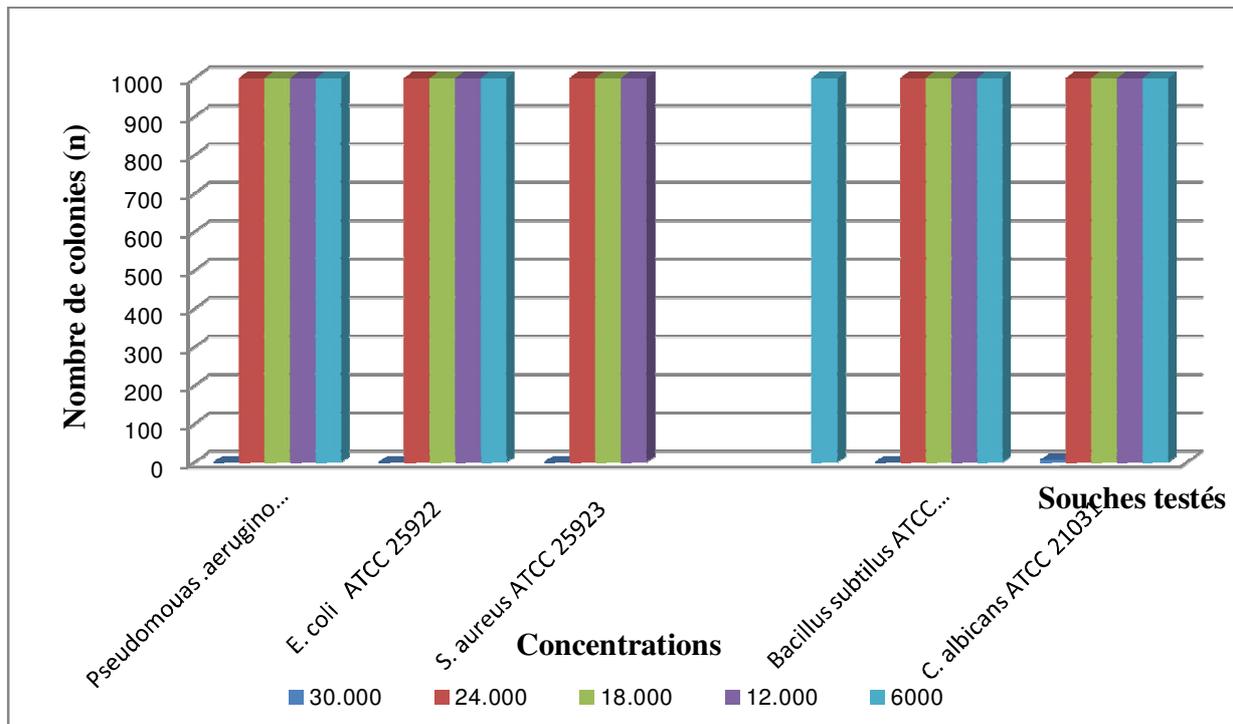


Figure 22:Concentrations minimales bactéricides, sporocides et fongicides en mg/l de peroxyde d'hydrogène (Eau oxygénée 10V).

III.2. Discussion:

III.2.1. Remarques relatives aux méthodes

Les méthodes d'études de l'activité bactéricide, sporocide et fongicide des antiseptiques retenus pour notre travail sont respectivement basée sur des normes européennes (Afnor et le comité européen de normalisation CEN):(NF T 72-150 ; NF EN 1040 : La bactéricidie),(NF T 72- 230 ; NF EN 14347 : La sporocidie), (NF T 72-200 ;NF EN 1275 : La fongicidie) dont l'objectif est étudié et évalué l'activité antimicrobienne de base de ces produit par détermination de la concentration minimale germicide et la sélection de neutralisants par la méthode de dilution neutralisation.

III.2-1-1 Viabilité des essais préliminaires:

Nous avons prouvé par les essais préliminaires tous valides que la plus part des antiseptiques étudiés dans ce travail étaient facilement neutralisés lorsque le neutralisant idéal était utilisé, c'est donc une action germicide qui est mise en évidence lors des essais proprement dits selon les normes NF – EN.

Toutefois, on doit signaler que l'effet bactériostatique, sporostatique et fongistatique est possible si l'antiseptique a une fort affinité pour les structure externes des micro-organismes, l'essai préliminaire selon les normes NF – EN est insuffisant pour mettre en évidence ce type d'effet bactériostatique, sporostatique et fongistatique dû à la présence de produit sur le corps microbien.

On peut aussi considérer à la limite, que la fixation irréversible d'un antiseptique sur la paroi d'un micro-organisme conduit à un effet bactériostatique, sporostatique ou fongistatique prolongé équivalent à un effet bactéricide, sporocide ou fongicide vrai.

III.2.1.2. Viabilité des résultats proprement dit:

Des essais réalisés en parallèle par plusieurs équipes ont démontré une bonne reproductibilité des résultats qui est on fait par habituel dans ce domaine, ce qui leur confère une valeur indéniable (**Drueilles *et al.*, 1986 ; Dieng., 1998 ; Thiam., 2000., Essayagh ., 2010**)

Il nous est également permis d'entreprendre des études comparatives et d'apprécier des variations même faibles de l'activité antimicrobienne(germicide)des antiseptiques.

Il nous est donc enfin permis de considéré les résultats ainsi acquis comme des données scientifiques valables.

III.2.1.3. Avantages de la méthode:

La méthode NF-EN dont le principe repose sur la technique de dilution - neutralisation est une méthode

- qui n'exige pas de matériel onéreux ;
- relativement facile à mettre en ouvre ;
- dont les résultats sont reproductibles, cette reproductibilité a été démontrée par plusieurs équipes qui ont réalisé des essais en parallèle.

III.2.1.4.limite de la méthode:

Les techniques d'Afnor et du Comité Européen NF EN sont certes de référence mais la méthode de dilution neutralisation est très classique, dont son principe doit être rigoureusement appliquée pour donner les résultats que l'on attend.

Ce n'est pas une méthode universelle pour être applicable ; elle doit mettre en œuvre un neutralisant convenable. Elle n'est pas la plus adéquate pour l'étude d'un grand nombre de souches et de plusieurs antiseptiques.

On pourrait reprocher aux trois méthode NF/NF EN (T 72-150/1040 ; T 72-230/14347 ; T 72-200/ 1275) un éventail trop restreint de souches bactériennes et fongiques, car même si les souches testées (*Pseudomonas aeruginosa* , *Escherichia coli* , *Staphylococcus aureus* , *Bacillus subtilis* , *Candida albicans*) sont assez représentatives de l'hospitalisme infectieux, étant donné que sont constamment incriminée lors des surinfections acquises a l'hôpital, d'autre espèces bactériennes et fongiques peuvent être aussi redoutables.

Les méthodes NF /NF EN (T72-150/1040 ; T72- 230/NF EN 14347 ;T72-200/NF EN 1275) sont aussi des technique laborieuses exigeant des manipulateurs qualifiés et imposant des contraintes parfois bien pesantes :

- nécessité d'établir un calendrier de repiquage des souches pour la préparation de l'inoculum

- obligation de rejeter tous les essais non conformes si l'inoculum est trop faible ou trop abondant.

III.2.2. Autre méthodes

Il est reproché aux méthodes NF EN (Afnor et CEN) de s'appliquer difficilement à l'étude systématique d'un grand nombre de souches ou d'antiseptiques. **Dupas *et al.*, 1981** ont décrit une micro méthode calquée sur les méthodes Afnor. **Surgot et Fleurette., 1982** ont mis au point une micro-méthode inspirée des techniques utilisées pour les antibiotiques, de principe identique aux méthodes d'Afnor qui apprécie une diminution de 5 logs de 10 du nombre de bactéries en 5 minutes et à 21 c°.

Ces méthodes NF EN (Afnor et CEN) peuvent être complétées par des micro-méthodes permettant une surveillance plus facile du comportement des souches isolées eu milieu hospitalier.

L'utilisation des microplaques permet l'étude de l'action de divers antiseptiques vis-avis de plusieurs souches dans une même expérience. Cette méthode de bonne reproductibilité donne des résultats comparables et similaires à la norme Afnor et CEN.

III.2.3. Analyse des résultats d'activité des antiseptiques étudiés in vitro

III.2.3.1. Comparaison des résultats

Il est difficile de comparer les résultats que nous avons obtenus avec ceux des autres auteurs, mêmes si les normes Afnor et CEN font l'autorité à la matière, il existe de très nombreuses méthodes de détermination de l'activité bactéricide, sporocide et fongicide. Elles répondent souvent à des objectifs variés et il n'est pas possibles de les comparer les unes des autres.

Les valeurs des concentrations bactéricide, sporocide et fongicide données dans les ouvrages de la littérature scientifique sont très nombreuses et très variables, les techniques, les souches et les substances utilisées sont très différentes.

Les comparaisons sont donc très difficiles.

III.2.3.2. Analyse des résultats de la polyvidone iodée PVP-I 10%

Les résultats que nous avons obtenus sont en parfait accord avec la littérature scientifique qui confirme que le PVP iodée est un bon antiseptique vis – a – vis des bactéries Gram positifs, bactéries Gram négatifs, levures et les spores (pouvoir bactéricide, sporocide et fongicide)

En effet la PVP- iodée est une molécule stable, constitué d'un complexe entre l'iodée et un agent organique hydrosoluble polyvinyle pyrrolidone ou povidone qui transporte et libère lentement l'iode. Cette structure rend la PVP-I moins irritante, moins allergisante et plus stable dans le temps (Clevenot *et al.*, 2003, Essayaghet *et al.*, 2010).

L'iode est un oxydant capable de pénétrer la paroi des micro-organismes très rapidement. Les mécanismes d'actions demeurent inconnus. A l'intérieur de la cellule, l'iode provoque une réaction avec des enzymes de la chaîne respiratoire et un blocage des protéines cytoplasmique qui se produit (Figure 24) (sixou *et al.* , 2002 , Essayagh *et al.* , 2010).

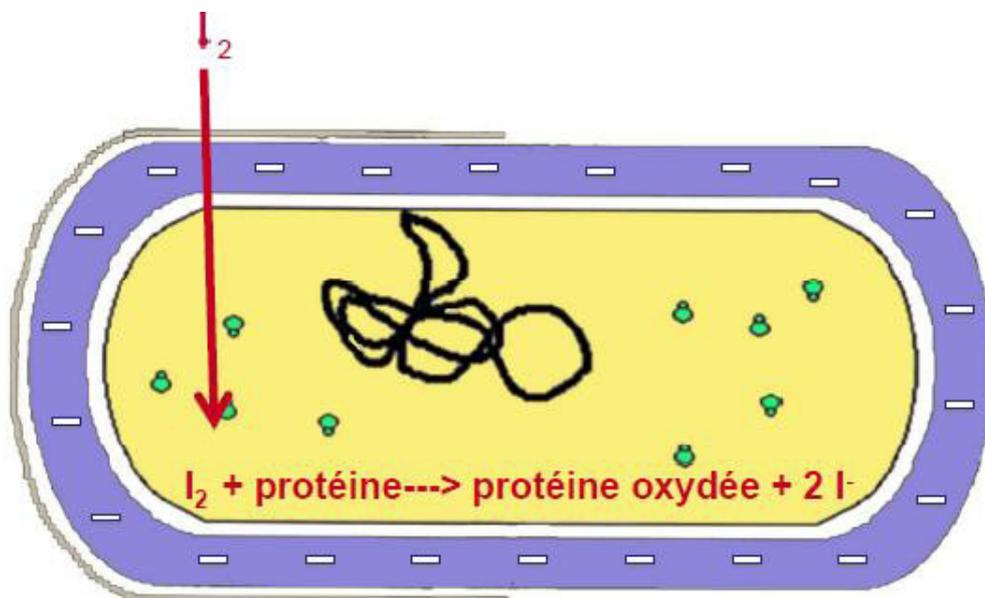


Figure 23 : Schéma représentatif du mode d'action de la polyvidone iodée à l'intérieur de la Cellule microbienne. (Russel *et al.*, 2004)

Dans notre étude, nous avons obtenus une concentration minimale germicide de 2000 mg/l pour *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* et *C. albicans*, et pour *E. coli* elle est de 500 à 1000 mg/l

Cependant selon **Girardoet al en 1989**, en conclusion d'une remarquable étude sur l'activité de la PVP-I souligne qu'on ne peut parler de résistance à la PVP-I que pour des valeurs de concentration minimales supérieures à 2000 mg/l ce fait a été trouvé dans notre étude

Selon d'autres auteurs, la concentration minimale germicide est très variable, cependant d'après **Chanal et al, 1976** que la CMB des bactéries gram négatifs et le *Staphylococcus aureus* ont une CMB en moyenne de 125 mg/l, et d'après **Dupas et al, 1981**, les CMB de *E. coli* varient entre 240 à 960 mg/ml et de 480 mg/l pour *S.aureus* lors d'utilisation d'une micro méthode.

Par contre, **Essayagh et al en 2010.**, ont trouvés des CMB de 62.5 à 4000 mg/l pour *E. coli*, de 250 à 4000 mg/l pour *S. aureus*. Cette différence de concentration minimale germicide, ainsi la différence comparée à nos résultats peut s'expliquer par la difficulté d'appliquer les mêmes techniques et matériels ou exactement par la difficulté de standardisation des méthodes d'évaluation des antiseptiques.

Selon **Essayagh et al(2010)**, montrent que le non respect de la procédure d'utilisation du PVP-I peut à la longue sélectionner des souches résistantes (des CMB > a 2000 mg/l), lors de cette étude, ils ont sélectionné des souches avec de CMB de 4000 à 8000 mg/l. Cette résistance peut être explique par le fait que les micros organismes possèdent des mécanismes évolués, leur permettant d'échapper parfois à l'action des antiseptiques. Il s'agit d'un nombre de modifications qui intervenant au niveau de la membrane externe des bactéries, ce qui diminue voire empêché la fixation ou la pénétration du produit. Les déterminants de la résistance touchent surtout des gènes qui codent pour les pompes d'efflux, ces gènes peuvent être nés dans un plasmide d'espèces à Gram positifs ou codés dans des chromosomes d'espèces a Gram négatifs (**Dupaset al., 1981 ; McDonnell et al., 1999**).

III.2.3.3. Analyse des résultats du Di gluconate de Chlorhexidine

La Chlorhexidine est un antiseptique à spectre large. Dans la littérature les concentrations

Minimales germicides varient de 500 mg/l (0.05%) à 1000 ml(0.1%)(**Jauneet al., 2004** et

Tenenbamm et al ; 1996)

Dans notre étude, notre gamme de concentration varie de 15000 mg/l (0.5%) à 200 mg/l (0.02%). Dans cette intervalle, la chlorhexidine testée, exerce une activité bactéricide vis –a-vis des trois souches bactériennes utilisées avec une CMB de 700 mg/l(0.07%) pour *S. aureus* et 1000 mg/l (0.1%) pour *E. coli*, et 2000 mg/l (0.2%) pour *P. aeruginosa*. Cela montre que la chlorhexidine a une action surtout sur les bactéries Gram positifs puis sur les bactéries Gram négatifs, ce résultat est en accord avec la littérature scientifique et avec d'autres études.

Nous avons donc obtenue une activité bactéricide avec la chlorhexidine testée de 700 mg/l à 1000 mg/l (0.07% à 0.1%).

Mais selon **Ernstet al., 1998**, lors de la conclusion d'une remarquable étude ,ont trouvé que la Chlorhexidine a une activité bactéricide entre 1000 mg/l à 2000 mg/l (0.1% - 0.2%), cette différence de concentrations minimales bactéricide comparant à nos résultats , peut s'expliquer par les techniques et matériels différents qui ont été utilisés .

Le résultat que nous avons obtenus sur l'activité fongicide du chlorhexidine testée sur *Candida albicans* avec une concentration minimal fongicide CMF de 2000 mg/l (0.2%) est superposable à celui obtenu par **Michelet al., 2005**.

Ainsi que le résultat obtenue sur l'absence d'activité sporocide du chlorhexidine testée dans notre travail sur les spores de *Bacillus subtilis* est en parfait accord avec les ouvrages de la littérature (**Billast et al., 2000 ; Placet et al., 2001 ; Kaestli et al.,2007**) .

Cette forme de résistance naturelle est expliquée par **Gardaneret al., 1983**, ces dernier montrent que la chlorhexidine se combinent avec les enveloppes sporales , mais ne peut pas pénétrer dans la spore .Elle agit cependant sur la spore en cours de sa formation et se montre active jusqu'au stade 4 de la sporulation (début de la formation du cortex)

Mais **Gorman et al., 1987**, ont montrée dans leurs travaux que la chlorhexidine peut être sporocide à une température supérieure à 70 c° après un contact prolongé, avec des concentrations plus élevées.

D'après des études menées par **Sixou et Hamel., 2002**, arrivent a une conclusion que la chlorhexidine est un inhibiteur de croissance à faible dose (20 – 50 mg/l) et un agent létal à forte dose.

En effet à faible concentration, la chlorhexidine se fixe sur les membranes cellulaires, les ions Mg⁺⁺ et Ca⁺ sont déplacée, ce qui affecte l'osmorégulation de l'activité des membranes et

entraînerait la fuite des éléments cytoplasmiques de faible poids moléculaire (Mulberry *et al.*, 2001 ; Russel *et al.*, 2004).

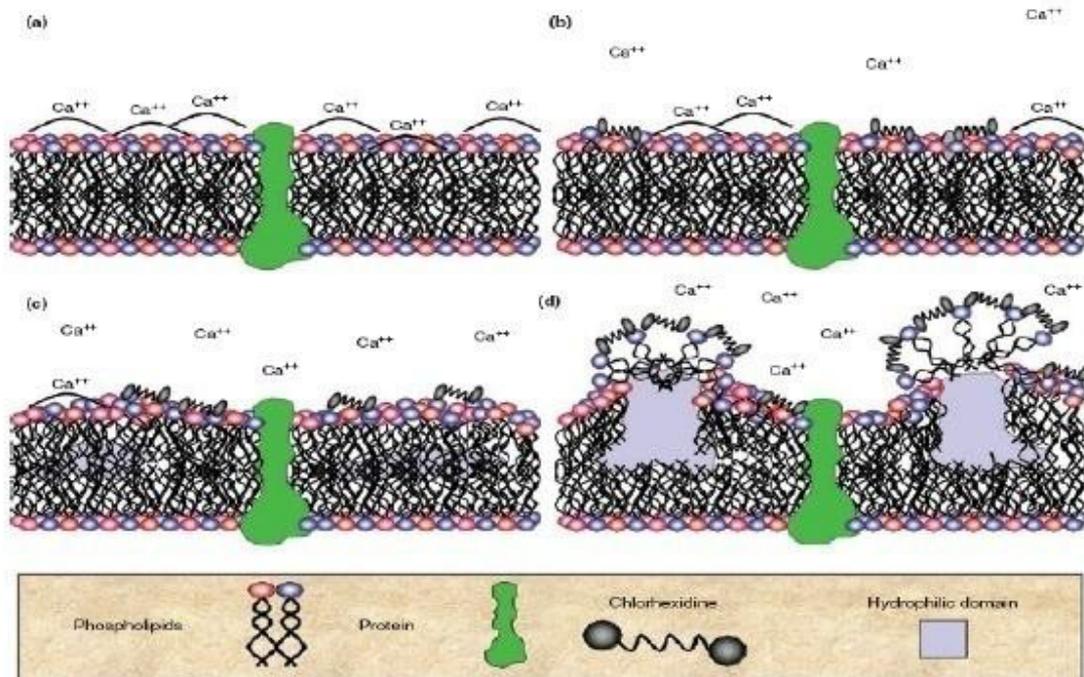


Figure 24 : Schéma représentatif du mode d'action de la chlorhexidine sur la membrane de la cellule microbienne (Russel *et al.*, 2004)

Tandis que à forte concentration (> 100 mg/l), la chlorhexidine provoque la précipitation des protéines et les acides nucléiques d'où la mort de la cellule microbienne (Sixou et Hamel, 2002).

Et selon Bouteldja, 2011, l'inhibition de la croissance par la chlorhexidine est obtenue par l'effet direct sur l'ATP-ase, interférant ainsi avec les mécanismes de transport de l'énergie (inhibition enzymatique)

L'étude menée par Noorani *et al.*, 2010, montre que l'efficacité du chlorhexidine est liée à sa concentration, mais aussi et surtout à son pouvoir d'adhésion et de rétention sur les surfaces cutanées. Cette efficacité resterait stable pendant 8 à 12 heures, ou 30% de la qualité du produit introduit persiste après une minute de rinçage, d'où la notion du pouvoir rémanent du chlorhexidine, et c'est la raison de son utilisation comme produit du premier choix dans le

traitement des gingivites comme bain de bouche ou d'autre problème de parodontie (**James et al ; 2004** et **Michelet al , 2005**).

Les travaux de **Chaiyakunapruket al ; 2002**, montrent que la chlorhexidine est le meilleur antiseptique dans le cas d'insertion de cathéter veineux, artériel ou péri-dural. Cette étude montre le rôle de la chlorhexidine dans la réduction significative du risque d'infection systémique liée au cathéter.

Cette antiseptique possède un effet antimicrobien rémanent pouvant perdurer jusqu'à la sixième heure (**Sreenivasan et al., 2000**). Cela indique que l'activité de la chlorhexidine n'est pas altérée en présence de produits biologiques comme le sang, le sérum, les composés protéiques, par rapport à d'autres antiseptiques qui sont reconnus par une très large activité antimicrobienne comme les produits iodés, ou leur activité est diminuée en présence de produits biologiques (**Abbara., 2004**).

III.2.3.4. Analyse des résultats de l'Alcool Éthylique 90°

Nos résultats sont superposables avec ceux de **d'Essayaghet al., 2010** et s'accordent avec plusieurs auteurs sur l'activité bactéricide et fongicide de l'alcool éthylique à 70° et 60° où nous avons observé une meilleure efficacité.

Selon une étude faite par **Druilles et al., 1986**, l'éthanol est efficace sur les souches bactériennes à une CMB de 45° surtout sur *P. aeruginosa*, ce résultat est proche de nos résultats, où nous avons enregistré une CMB de 50° pour *P. aeruginosa* et *E.coli*. Et respectivement une CMB et une CMF de 60° pour *S.aureus* et *C.albicans*.

Par contre l'alcool éthylique testé dans notre travail, et quel que soit la concentration en alcool testée n'exerce aucune activité sur les spores de *Bacillus subtilis*, d'où la notion de résistance des formes sporulées aux alcools d'une façon générale

Ce fait a été trouvé dans la littérature et prouvé par plusieurs études (**Kaestli et al., 2001 ; Hubner et al., 2006**)

Vue l'absence de l'activité sporocide, les solutions d'alcools préparés peuvent être contaminées par les spores, c'est la raison pour laquelle ces derniers doivent être préparés en pharmacie, au moyen d'alcool stérile, traité par filtration (**le Guerrier ; 2002**).

Nous avons aussi remarqués que l'éthanol à 90° est moins actif que celui qui à la concentration 70° et 60°, surtout sur *E. coli* et *S. aureus*. Cela est expliqué par la légère dilution effectuée sur l'alcool 90° lui facilite la pénétration a travers les membranes de la cellule microbienne et agit a l'intérieur en dénaturant les protéines, ceci constitue le principale mécanisme d'action antimicrobien (**Allen., 2006**)

Mais l'activité de l'éthanol est très bref, car il s'agit d'un produit très volatil et qui s'évapore très rapidement lors de son utilisation sur la peau, donnant une impression de refroidissement, d'ou l'absence d'activité rémanente (**Hugonnetet al., 2002**)

Il agit avec un délai d'action de 2 minutes, si la peau soit maintenue humide, car l'hydratation représente le facteur principal pour son efficacité sur les cellules microbiennes (**Maury., 2007**)

III.2.3.5. Analyse des résultats d 'Eau Oxygénée 3% (10V)

L'eau oxygénée ou le peroxyde d'hydrogène a sa concentration initiale 30.000 mg/l (3%) est a spectre large, mais il est considéré à tort comme antiseptique, malgré son appartenance à la famille des oxydants (**Kaestli., 2007**).

Notre gamme de concentration varie de 30.000 mg/l à 600 mg/l correspondant respectivement de 10V à 2V.

Les résultats que nous avons obtenue, montrent que l'Eau Oxygénée 10V testée présente une activité bactéricide, sporocide et fongicide qu'a la concentration initial 30.000 mg/l seulement correspondant à 3% de peroxyde d'hydrogène. Donc on peut considérer que la concentration minimale germicide d'eau oxygénée est 30.000 mg/l, qui représente la concentration du produit commercialisé et prêt à l'emploi.

Nos résultats sont identiques à ceux obtenus par **Essayagh et al ., 2010**, mais ne s'accordent pas avec ceux obtenus par **Druilles et al ., 1981** ,qui a réalisé une étude d'activité bactéricide d'eau oxygénée avec la méthode de porte germe et la méthode de filtration , arrivons a déterminer une CMB de 15000 mg/l correspondant à 5V pour *Ps. aeruginosa* , confirmant l'efficacité d'Eau Oxygénée sur les bactéries Gram négatifs que sur les bactéries Gram positifs.

Cette différence de concentration minimale germicide peut être s'expliquer par la déférence des techniques et matériels qui ont été utilisés.

L'activité antimicrobienne d'Eau Oxygénée à 30.000 mg/l (3%) ou (10V) est basée sur la libération d'oxygènes qui constitue le principe actif du produit, entraînant l'oxydation des systèmes enzymatiques (**Jame et al ; 2004**), c'est la cause de son efficacité positive sur les anaérobies. C'est un antiseptique utilisé en chirurgie dentaire et pour l'antiseptie des plaies gangrénées ou délabrements tissulaires nécrotique (germes anaérobies)

Cependant selon **Silvina .R, 2003**, l'Eau Oxygénée 10V à la température ambiante, il est lentement levuricide et sporocide, et comme les conditions des normes Européennes (Afnor et CEN) exigent un certains temps de contact, fait que ce produit n'exerce pas son activité comme dans la réalité.

Si on augmente la concentration, il devient plus un antiseptique vu sa toxicité ; le cas d'eau oxygénée 30V (6% à 10% de peroxyde d'hydrogène)(**Gautier., 2013**).

III.2 4. Essai de classification

Même si notre étude demande d'être poursuivie, pour une meilleure connaissance des différents produits par une évaluation chimique (dosage d'Iode, dosage d'H₂O₂, mesure d'alcool à l'aide d'un alcoomètre....), nos résultats permettent néanmoins d'établir un essai de classement des antiseptiques étudiés sur la base de la concentration minimale germicide mesuré dans notre travail :

1- La polyvidone iodée 10% (PVP-I)

Le PVP-I a montré sa remarquable activité sur toutes les souches testées. C'est un bon antiseptique dont le spectre est large .Mai il faut voir son efficacité *in vivo*, ou il peut être inactivé par les matières organiques, selon la littérature.

2- Le Digluconate de chlorhexidine

Ce produit a montré une action bactéricide et fongicide (levuricide), mais il est inactif sur les spores. D'après plusieurs travaux réalisés *in vivo* , (**Mimoz et al 1999 ,Traore et al . , 2000 , Kinirons et al . , 2001 , ChaiyaKunapruk et al . ,2002**) , ces auteur sont arrivés à une conclusion que la diminutions de la fréquence des contamination était plus importante lorsque la chlorhexidine était utilisé par rapport à la polyvidone Iodée (PVP-I) pour l'antiseptie cutanée avant une procédure invasive (insertion de cathéter) . Ces résultats sont

assez discordants avec ceux obtenus *in vitro*, où l'activité du PVP-I est assez comparable à celle de la chlorhexidine. Cela est s'expliqué par la diminution de l'activité antimicrobienne des produits iodés en présence de sang, sérums ou d'autre composés protéiques. Il faut également rappeler que la chlorhexidine possède un effet antimicrobien rémanent pouvant perdurer jusqu'à la sixième heures, Alors que cet effet est quasiment virtuel avec les produit iodés (Maury., 2007).

Mais dans notre étude *in vitro*, et vu l'absence d'activité sporocide du Digluconate de chlorhexidine , faite que ce dernier est classé en deuxième position.

3- L'Alcool Ethylique à 90°

Nous avons remarqué une activité bactéricide et fongicide optimale à la dilution 70° et 60°qu'à la concentration initiale 90° d'Alcool Ethylique testé. En plus, aucune activité sporocide est observée. Donc c'est un produit qui est caractérisé par le même spectre d'activité que le Digluconate de Chlorhexidine, malgré la différence de l'appartenance à la même famille et la différence du mécanisme d'action. Mais comme l'Alcool éthylique se caractérise par l'absence d'effet rémanent et par la présence de propriétés volatiles, c'est pour ces deux raisons que nous avons classé ce produit après la chlorhexidine en troisième position.

4- L'eau oxygénée 10V

Ce produit est considéré à tort comme antiseptique, mais il possède un large spectre d'activité (bactéricide, sporocide et fongicide) seulement à la concentration initiale (3%). Et nous n'avons pas déterminé d'autres concentrations minimales au-dessous de 3%, c'est la raison pour laquelle, ce produit est classé en dernière position.

Conclusion

Les antiseptiques sont des médicaments à usage externe Ils jouent un rôle primordial dans la prévention et la lutte contre les infections, surtout les infections nosocomiales.

La bonne gestion de ses produits permet de limiter l'utilisation des antibiotiques et donc de limiter l'émergence et la diffusion de souches microbiennes résistantes. Cette résistance pose actuellement un problème de santé publique avec une surmortalité, une sur morbidité et un surcout important.

L'étude a été pour but d'évaluer *in vitro* de l'activité bactéricide, fongicide et sporocide de quatre antiseptiques cutanés (polyvidone Iodé 10%, Digluconate de chlorhexidine 0,5%, Alcool chirurgical(éthylrique à 90°) et l'Eau oxygénée 10V, sur des souches référenciées de collection, ce sont des antiseptiques connus pour leur efficacité *in vivo* et largement utilisés à l'hôpital et à domicile.

Cette étude est réalisée à l'unité de microbiologie, laboratoire de contrôle de qualité à l'Institut Pasteur d'Algérie.

L'étude de l'activité antimicrobiennes des quatre antiseptiques s'est basée sur les normes de base : Norme Afnor et CEN ; la bactéricidie(NF T72-150 /NF EN 1040 ; 1989/2006), la sporocidie (T72- 230/NF EN14347 ; 1989/ 2005), la fongicidie (NF T72-200/NF EN1275 ; 1989/ 2006).Il s'agit d'une méthode de suspension dont le principe est le suivant :

- La mise en contact d'une suspension de micro – organismes pendant un temps et une température donnés avec un antiseptiques à différentes concentration,
- Arrêt de l'action du produit testé par dilution – neutralisation,
- Dénombrement des micro– organismes survivants et une appréciation d'une réduction logarithmique de la population testée.

Cette méthode nous a permet d'étudier facilement le comportement (sensibilité, phénomène de résistance) des souches testées vis – a – vis des antiseptiques étudiés, et nous a permet aussi de déterminer la concentration minimale microbicide qui produit une réduction de 5log10,qui correspond a un taux de destruction microbien de 99,99%.

Elle a pour avantage la facilité de mise en œuvre par la disponibilité du matériel, la reproductibilité (méthode normalisées). Et pour inconvénient qui est surtout représenté par une étude d'activité irréelle du fait du non disponibilité des conditions réelles d'utilisation des antiseptiques sur une surface cutanée.

Les résultats que nous avons obtenulors de cette étude, ont montré la sensibilité et l'apparition d'éventuelle résistance des souches testées vis – a – vis des antiseptiques étudiés, ce qui nous a permis d'établir un classement en fonction des concentrations minimales microbicide à savoir :

- 1- La polyvidone iodé (PVP-I) est l'antiseptique de choix, il présente une meilleure activité bactéricide, fongicide et sporocide avec des concentrations minimales qui varie entre 2000 mg/l et 250 mg/l .ce produit doit être utilisé avec précaution et de façon non prolongé vu les contres indications selon des revues de la littérature.
- 2- La chlorhexidine exerce une activité bactéricide et fongicide, ce pendant, nous avons observé que son efficacité est optimal entre 1000 mg/l et 2000 mg/l, et a partir de 500 mg/l, la chlorhexidine est moins efficace.

En plus notre étude confirme la résistance naturel des spores à cet antiseptique, malgré le pouvoir rémanent de la chlorhexidine .

- 3- L'alcool éthylique 90° , qui présente un efficacité optimale a la concentration 70° et 60° qu'a la concentration initiale 90° , ou nous avons observé une activité bactéricide et fongicide . Mail'activité sporocide est absente, qui peut être expliqué par la nature du produit qui est très volatil et son mode d'action rapide et par l'absence d'effet rémanent.
- 4- L'eau oxygénée 10 V, est considérée d'après les résultat obtenus, un antiseptique à large spectre qu'a la concentration initiale 3% (30.000 mg/l) , ou nous avons noté une activité bactéricide , fongicide et sporocide, et moins de cette concentration , l'eau oxygénée est non efficace .

L'établissement de ces procédure, nous a permet une mise au point des différentes techniques et une appréciation de la standardisation des méthodes pour l'évaluation d'autre antiseptique de différentes familles, en déterminant leur concentrations minimales germicides.

Comme perspective et en continuant a ce travail, il serait intéressant de :

- 1- Rechercher l'activité virucide
- 2- Rechercher l'activité antimicrobienne en présence de substance interférente, qui représente les normes d'applications selon les normes européennes NF EN.
- 3- Aborder des micro- méthodespar utilisation des microplaques, qui constitue une approche moderne et dont les résultats sont très précis et similaires aux normes européens NF EN. elles permettent l'étude de l'action de divers antiseptiques vis – a – vis de plusieurs souches dans une même expérience.

Comme recommandation, et pour vérifier l'adaptation des concentrations d'emploi préconisées et préciser les indications d'utilisation des antiseptiques en fonction des micro-organismes, il serait judicieux d'inclure deux souches de contrôle, l'une sensible, l'autre résistante, au cours des essais *in vitro*.

Références bibliographiques

- **Abbara A., 2004.** Lexique de l'Hygiène médicale, Livre interactive Gynécologie obstétrique et Echographie, Edition 2004, Paris, France, PP :96-110.
- **Agostinho A., 2011.** Antiseptiques et désinfectants, Service prévention et contrôle de l'infecton, Formes escarres, HUG, Geneve –Suisse, PP : 01-50.
- **Allion A ., 2004.** Environnement des bactéries et sensibilités aux biocides – Mise au point une technique rapide pour déterminer in situ l'efficacité bactéricide d'agents antimicrobiens . Thèse de Doctorat, Ecole Nationale supérieure des industries agricoles et Alimentaires et les laboratoires Anios (Lille-hellemmens), France, 194p.
- **Allen Upton D., 2006.** Les produits antimicrobiens à domicile, Le problème de l'antibiorésistance (Société canadienne de pédiatrie SCP), *Pediatrchildhealth* , 11(3), PP : 177-182.
- **Amazian K., Rossello J., Castella A., Sekkat S., Terzaki E., Dhidah T., Abdelmoumene T. et Fabry J., 2010.** Prévalence des infections nosocomiales dans 27 hôpitaux de la région méditerranéenne, *EasternMediterraneanHealth Journal EMHJ* 16,(10), PP : 1070- 1078.
- **Atif M.L et al., 2006.** Evolution de la prévalence des infections nosocomiales dans un centre hospitalier universitaire en Algérie (2001- 2005). *Medecine et Maladies infectieuses*, 36 (8), PP : 423- 428.
- **Auroy M., Genis S et Benite P., 2010.** Normes européennes relatives aux antiseptiques et désinfectants chimiques, Fiches conseils pour la prévention du risques infectieux- Agents infectieux, Cclin Sud-Est (mai 2010), Paris, France, PP :01-04.
- **Badrikian L et Boiko-Alaux V., 2006.** L'antiseptoguide : Guide d'utilisation des antiseptiques, 3^e édition, CHU. Clément Ferrand, France, 58PP.
- **Bendayan J., Blech M.F., Faccini G., Lejeune B et Guerray T., 2007.** Guide des bonnes pratiques de l'antiseptie chez l'enfant, Hygienes, Société Française d'hygiène hospitalière SFHH (Mai 2007), 48 pp.
- **Berdeu D et Vela D., 2002.** Pharmacologie et thérapeutique en soins infirmières, Ellipses édition Marketing S.A. Paris, PP : 102-112.

- **Billast N., Duffet A., Dumartin C., Feldman P., Fossé F., Pourrier C., Ricou G et Soumah F., 2000.** Antiseptiques et désinfectants, CCLin Paris-Nord (mai 2000), France, PP : 05-40.
- **Carrelet T et Pospisil F., 2001.** Guide technique pour l'hygiène et la protection des mains. Publication CCLin Sud-Est, Paris, France, PP 49-52.
- **Chanal M., Cluzel M., Joly B et Cluzel R., 1976.** Activité bactéricide des dérivés iodés in vitro et in vivo sur la peau saine, Med Mal infect, n°06, PP : 451-458.
- **Chaiyakunapruk N., Veetra D., Lipsky B et Saint S., 2002.** Chlorhexidine compared with povidone-iodine solution for vascular catheter- site care, a meta-analysis, Annals of Internal Medicine, n°136(11), PP: 792-801.
- **Clevenot D., Robert S., Debane B et Mimoz O., 2003.** Analyse critique de la littérature sur l'utilisation comparée de deux antiseptiques lors du cathétérisme vasculaire ou rachidien, Annals for Anesth, n°22, PP: 787-897.
- **Costerton J.W., Lewandowski Z., Debeer D., Caldwell D., Korber D., James D., 1994.** Biofilms, the customized microniche; Minireview, Journal of Bacteriology, 176, PP: 2137- 2142.
- **Crémieux A et Freney J., 1995.** Bases fondamentales de l'action antimicrobienne des antiseptiques et désinfectants dans l'antisepsie et désinfection, Fleurette. J, Freney et Reverdy ME, Edition ESKA, France, PP : 23- 37.
- **Cruzy R., Joly B et Sirot J., 1973.** Evaluation de l'activité bactéricide d'un antiseptique par la méthode de filtration sur membrane, Path- Biol, 21, n°8, PP : 861-869.
- **Darouiche R.O., 2001.** Device- associated infection a macroproblem that starts with microadherence, Clinical Infection Disease, 33, PP : 1567 – 1572.
- **Dictionnaire scientifique, 2012.** Glossaire Biologique, Office des Publications Universitaires 4- 2012 Alger, Edition (41.04.4957), I.S.B.N (978.9961.0. 1141.6), 127 PP.
- **Dieng. C T., 1998.** Chimio prophylaxie et prévention des infections nosocomiales, Thèse de Doctorat en Pharmacie, Dakar, n°27, PP : 97P
- **Donlan RM. et Costerton JW., 2002.** Biofilms survival Mechanisms of clinically relevant Microorganisms, Clinical Microbiology Reviews, 15, PP: 167-193

- **Drenkard E., 2003.** Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, *Microbes and Infection*, 5, PP: 1213- 1219.
- **Druilles JA., Chantefort M. et HaetR , 1986.** Activité bactéricide de quelques antiseptiques, *Revue de L'Institut Pasteur de Lyon* ; n°19, PP : 217-231.
- **DupasH., Nomgayred P. et Perrin G.,1981.**Contrôle de l'activité bactéricidedes désinfectants, présentation d'une micro méthode destinée à déterminer la concentration minimale bactéricide, *RevmedVet* ; n°132, PP : 209-215.
- **Ernst C., Prockl K. etWillershausenB. , 1998.** Effectiveness and side effects of 0,1% and 0,2% chlorhexidinemouthrinses; A clinical study, *Quntessenseint* , n°29, PP: 443-448.
- **Essayagh T., Elameri A., Zohoun A., Miloudi M. etElhamzaoui S ., 2010.** Activité antibactériennes des antiseptiques utilisés à l'hôpital militaire d'instruction Mohamed V de Rabat, *Ann BiolCli* ,n°68(4), PP : 421-427.
- **Fleurette J., Freney J. et ReverdyME., 1995.** Antisepsie et désinfection.EditionEska, Paris,639p.
- **Fleurette J., Freney J., Reverdy ME. et Tissot G. et 1997.**Guide pratique de l'antisepsie et la désinfection. Edition Alexandre Lacassagne, Lyon, PP :167-170.
- **Fonzo-christ C. et KuntheavyR. et 2005.** Cours Antiseptiques et désinfectants, Formation Post-diplôme du domaine opératoire, Pharmacie des HUG, Genève, PP : 01-38.
- **Gardner JF. et GrayKJ . et 1983.** Chlorhexidine in disinfection, sterilization and preservation, Black SS Ed , Lee and Fabiger, Philadelphia, PP: 251-270.
- **Gautier C., Boyer F., Couquet H.,Larroude P., Lasheras BA. et Vergnes H., 2013.** Le bon usage des antiseptiques pour la prévention du risque infectieux chez l'adultes.CclinSud-oust. Edition 2013, PP :5-31.
- **Gorman SP., Jones D.S. et Loftins AM. et 1987.**The sporicidal activity and inactivation of chlorhexidinedigluconate in aqueous and alcoholic solution. *Journal App.Bacteriol*, 63, PP: 183-188.
- **Girardo P., ReverdyMF., Marta A. et Fleurette J, 1989.** Détermination de la concentration minimale bactéricide de trois antiseptiques et un désinfectant sur 580

souches de bacilles à Gram négatif d'origine hospitalier. Path .Biol , 35 n°5 bis, PP : 605-611.

- **Hancock R.E.W, 1998.**Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other Nonfermentative Gram- Negative Bactéria. Clinical Infection Disease, 27, (suppl 1), PP: S93-S99.
- **Hubner NO., Kampf G., Loffler H. et Kramer A. et 2006,**Effet Of a 1Min Hand Wach on the bactericidal efficacy of consecutive surgical hand disinfection with standard alcohols and skin hydratation; Intern Journal of Hygien et Environmental Health, 209(3), PP: 285-291.
- **Hugonnet S., perneger TV. etPittet D., 2002.** Alcohol- based hand rub improves compliance with hand hygiene in intensive care unit. Archive of Internal medicine, 162(9), PP: 1037-1043.
- **Hiom SJ., Furr JR ., Russel AD. et Dickinson JR , 1992.**Effect of chlorhexidinediacetate on *C. albicans*, *C.glabrata* and *Saccharomyces cervisiae*.J. Appl.bacteriol , 72 , PP: 335-340.
- **Jaune O., Orti V, Bousquet P., Calas I. et Gilbert P, 2004.**Antiseptiques en Parodontie. Encyclopédie Médico- chirurgicale, E-11, PP :423-445.
- **Jones M.V.,HerdT.M. et Christie H.J. , 1989.**Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to amphoteric and quaternary ammonium biocides, Microbios, 58, PP: 49-61.
- **Joly B., 1995.** La résistance microbienne à l'action des antiseptiques et désinfectants. Dans Antisepsie et désinfection, Fleurette J, Freney J, Reverdy M.E, Edition Eska, PP : 52-65.
- **Kaestli L.Z., Vog-ferrierN., Roseline K. etFonzo-christe C ., 2007.**Désinfectants et antiseptiques. Bulletin d'information du CAAPP-Info HUG , Genève, 46, PP : 1-7.
- **Kinirons B., Mimoz O.,Lafendi L., Naas T., Meunier JF. etNordmanP.,2001.**Chlorhexidine versus Polyvidoneiodée in preventing colonization of continuous epidural catheters in children arandomizecontrolled trial .Anesthesiology , 94, PP: 239-244.
- **Langsrud S ., Sundhein G. et Borgmann SR., 2003.**Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in Food-related *Pseudomonas* spp. Journal of AppliedMicrobiology, 95, PP: 1538-1543.

- **Larousse Médicale., 2011.,** La Référence en Médecine, Larousse médicale, Encyclopédie multimédia, CD- ROM(386MO), LAROUSSE.
- **Le Guerrier P., 2002.**L'antisepsie des mains est-il temps de passer à l'alcool? , Le médecin du Québec, Vol 37, 03, PP : 79-85.
- **loughlinMF., Jones MV. et Lambert PA., 2002.***Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium show resistance to other membrane-active agents but not to clinically relevant antibiotics. Journal of antimicrobial chemotherapy, 44, PP: 631-639.
- **MaillardJY ., 2002.** Bactériol target sites for biocide action. Journal. Appl. Microbiol, 92 Suppl: 16s-27s.
- **Maury Eric., 2007.** Les antiseptiques, de vrais médicaments à connaître .MAPAR, HygièneSFHH , PP :650-656.
- **Marchal N., Boudon J. et Richard C., 1982.** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Edition Doin, Paris, 482P.
- **Marck V., 2010.** Manuel de techniques d'anatomo-cytopathologie, théorie et pratique. Ed Elsevier Masson, 183p.
- **MassonV. A ., 2009.** Evaluation préopératoire de l'efficacité d'un savon antiseptique à base de chlorhexidine sur la désinfection des mains. Thèse de Doctorat. Ecole nationale Vétérinaire de Toulouse, Tou 3-4069,96 p.
- **McDonnell G. et Russell AD., 1999.**Antiseptiques and disinfectants: Activity, Action and Résistance. Clinical Microbiology Reviews, 12, PP : 147-179.
- **Michel C., Brousse S., Luc J. et Roques C ., 2005.** Comparaison de l'activité bactéricide et levuricide in vitro de bain de bouche, dans des conditions représentatives de l'usage.Revue Odontostomat, 34,PP :193-203.
- **Mimoz O., Karim A., Mercat A ., Cosseron M. et FalissardB. et Parker.,1999.**Chlorhexidine compared with povidone-iodine as skin preparation before blood culture. A randomized, controlled trial, Annals of Internal Medicine, 131(11), PP: 834-837.
- **Ministère de la santé et la réforme hospitalière MSRH ., 2012.** Taux national de prévalence des infections nosocomiales en Algérie, Direction de la prévention, Cellule d'information journal EL Watan (Mai 2012).

- **Mulberry G., Snyder AT., Hellman J. et Pyreck. J., 2001.** Evaluation of a waterless chlorhexidine gluconate / ethanol surgical scrub for antimicrobial efficacy. American of Infection Control, 29, PP : 377- 382.
- **Neidhart FC., Ingraham JL. et Schaechter M., 1994.** Physiologie de la cellule bactérienne, une Approche moléculaire, Ed Masson, 487P.
- **Norme AFNOR, 1989.** Antiseptiques et désinfectants : Vocabulaire, Recueil de Nomes Française. Paris , 1989. 2^e édition, PP : 3- 5.
- **Norme AFNOR NF T 72 -150., 1989.** Antiseptique et Désinfectants utilisés à l'état liquide miscible à l'eau. Détermination de l'activité bactéricide (Méthode de dilution-neutralisation), Paris, 2^e Edition, PP : 32- 52.
- **Norme AFNOR NF T 72- 230 ., 1989.** Antiseptique et Désinfectant utilisés à l'état liquide miscible à l'eau. Détermination de l'activité sporocide (Méthode de dilution-neutralisation), Paris, 2^e Edition, PP : 210- 228.
- **Norme AFNOR NF T 72- 200 ., 1989.** Antiseptique et Désinfectant utilisés à l'état liquide miscible à l'eau. Détermination de l'activité fongicide (Méthode de dilution-neutralisation), Paris, 2^e Edition, PP : 172- 190.
- **Norme AFNOR et EN, NF EN 1040\ NF T 72- 152 ., 1997.** Etude de l'activité bactéricide, Peau et surface propre, Antiseptiques miscible à l'eau (Méthode de suspension), Comité européen de Normalisation CEN, Afnor Ed, Paris.
- **Norme AFNOR et EN, NF EN 1275\ NF T 72- 230., 1997.** Etude de l'activité fongicide, peau et surface propre, Antiseptiques miscible à l'eau (Méthode de dilution-neutralisation), Comité Européen de Normalisation CEN, Afnor Ed, Paris.
- **Norme AFNOR., 1998.** Recueil de Normes et Réglementation; Antiseptiques et désinfectants, Association Française de Normalisation, Afnor Ed, Paris.
- **Norme AFNOR et EN, NF EN1040., 2006.** Antiseptiques et désinfectants chimiques. Activité bactéricide de base .Méthode d'essai et prescription (Phase 1), Comité Européen de Normalisation CEN, Afnor Ed, Paris.
- **Norme AFNOR et EN, NF EN 14347 ., 2005.** Antiseptiques et désinfectants chimiques. Activité sporocide de base. Méthode d'essai et prescription (Phase 1), Comité Européen de Normalisation CEN, Afnor Ed, Paris.

- **Norme AFNOR et EN, NF EN 1275 ., 2006.** Antiseptiques et désinfectants chimiques. Activité fongicide de base. Méthode d'essai et prescription(Phase1), Comité Européen de Normalisation CEN, Afnor Ed, Paris.
- **Nosoclean., 2012.** Le pharmacien hospitalier, Journée d'étude, Nosoclean, Laboratoire Anios, Journal ElWatan (Mai 2012).
- Noorani A., Robey N., Walsh S.R., Davies R.J., 2010. Systematic review and meta-analysis of preoperative antisepsis with chlorhexidine versus Povidone –iodine in clean –contaminated surgery , Brit Journ Surg , 97, PP : 1614- 1620.
- **Pharmacopée européenne 6^e édition., 2008.** Méthode biologique, Contrôle des produits non stérile, European Directorate for the Quality of Medicines et Healthcare Qm , Séries des traités européens, 50, Tome 1, 1147 PP.
- **Placet T., Bonnin B., Boulestreau., Laffort. et Quesnel ., 2001.** Le bon usage des antiseptiques. C Clin Sud-ouest, Version n°1, Paris, PP : 7-9.
- **Poole K., 2002.** Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. Journal Applied Microbiol Symposium, suppl, 92, 55S-65S.
- **Reverdy M.E., 1995.** La Chlorhexidine. Dans : Antisepsie et désinfection, Fleurette J, Freney J, Reverdy M.E, eds, Edition Eska, PP : 135- 168.
- **Rihn BH, Hadon T. et Le Faou A., 2001.** Virus Produits antiseptique et désinfectant, Dossier medico- technique dmt, 86, PP : 143- 149.
- **Russel A.D., 1997.** Plasmids and bacterial resistance to biocides. Journal of Applied Microbiology, 82, PP: 155- 165.
- **Russel A.D., 2004.** Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. 4^{ème} Ed , Oxford, Blackwell, PP :
- **Sheldon AT., 2005.** Antiseptic “ Resistance” real or perceived ?. Clin infect Dis ,40(11) , PP: 1650-1656.
- **Sixou M. et Hamel O., 2002.** Critères du choix bactériologiques lors de la prescription de bains de bouches antiseptiques en odontostomatologie . Journ Parodontol Implantol, 21, PP : 25-41.
- **Sreenivasan P. et Galfar A ., 2002.** Antiplaques biocides and bacterial resistance, review J .clin Periodont, 29, PP : 965-974.

- **Surgot M., Fleurette J et Reverdy M.E., 1982.** Utilisation d'une micro méthode pour l'étude de l'activité bactéricide des antiseptiques et désinfectants, Revue de l'Inst. Pasteur de Lyon , 15(2), PP : 241-252.
- **Tabata A ,Nagamun H , Maeda T ,Murakami K ,MiyaK.Y. et Kourai H ,2003.**Correlation between Résistance of Pseudomonas aeruginosa to Quaternary Ammonium Compounds and Expression of Outer Membrane Protein Opr R. Antimicrobial Agents and chemotherapy, 47, PP: 2093-2099.
- **TenenbaumH , 1996.** Antibiotiques et Antiseptiques dans le traitement des maladies parodontales. De Boek Université, Bruxelles, PP : 193-201.
- **Thiam M, 2000.** Détermination de l'activité bactéricide, fongicide et sporocide de cinq formes d'antiseptiques sur des souches référencées de collections au laboratoire national de contrôle des médicaments. Thèse pharm., Dakar, 68, 76 pages.
- **Thomas L, Maillard JY ,Lamberd RJW. etRussel AD , 2000.**Development of resistance to chlorhexidinediacetate in Pseudomonas aeruginosa and the effect of a "residual" concentration. Journal of Hospital Infection, 46, PP: 297-303.
- **TO MS.,Favrin S., Romanova N. et Griffiths M., 2002.** Postadaptational Resistance to Benzalkonium Chloride and Subsequent Physicochemical Modification of Listeria monocytogenes. Applied and Environmental Microbiology, 68, PP 5258- 5264.
- **Traore O.,AlloaertFA. , Fournet F., Verriere JL. etLaverauH , 2000.**Comparaison of in vivo antibacterial activity of two skin disinfection procedures for insertion of peripheral catheters: povidone versus chlorhexidine, Journal HospInf, 44, PP: 147-150.
- **Verdeil X., Bouquet TH. etCance-RouzardA , 1997.** Surveillance des infections nosocomiales dans les établissement pour personnes âgées, Hygines, 6 , PP : 360- 365.

Annexe 1

Tableau II : Composition de la flore résidente.

Genre	Espèces	Localisation	Densité
Staphylococcus	<i>S. epidermidis</i>	Tous les territoires cutanés, mais surtout sur la face, les narines, les creux axillaires	- Zones humides : 10^3 à 10^6 UFC/cm ² - Zones sèches : 10 à 10^3 UFC/cm ² C
	<i>S. haemolyticus</i>	Les zones humides : - bras - jambes - espaces interdigitaux	
	<i>S. hominis</i>	Les creux axillaires, les plis inguinaux, le périnée	
	<i>S. aureus</i>	Chez 19 à 40 % de la population au niveau des narines, des creux axillaires et les plis inguinaux	4 à 7 log ₁₀ /cm ²
	<i>S. haemolyticus</i> <i>S. hominis</i> <i>S. simulans</i> <i>S. epidermidis</i>	Espèces principales au niveau des mains.	
	<i>S. haemolyticus</i>	Prédominant, avec les <i>Corynebacterium</i> dans les espaces interdigitaux.	
Corynebacterium	<i>C. lipophiles</i>	Abondantes au niveau : - des narine - espaces interdigitaux - le périnée	
	<i>C. jeikeium</i>	Colonise : - les mains du personnel hospitalier : jusqu'à 18 % - la peau du sujet sain : 11 à 36 % - la peau des malades	

		non immunodéprimés : 13 à 79 % - la peau des malades immunodéprimés : 40 à 82 %	
	<i>C. urealyticum</i>	Portage cutané fréquent en milieu hospitalier	
	<i>C. jeikeium</i> <i>C. urealyticum</i>	Espèces principales au niveau des mains.	
	<i>C. lipophiles</i> <i>C. urealyticum</i> <i>C. minutissimum</i>	Avec les <i>S. haemolyticus</i> , ils prédominent dans les espaces interdigitaux des mains.	
Propionibactérium	<i>P. acnes</i>	Il apparaît à la puberté au niveau : - des zones riches en acides gras libres : cuir chevelu, ailes du nez, face - sur les muqueuses - il colonise le canal du follicule pilo-sébacé en superficie	
	<i>P. granulosum</i> <i>P. avidum</i>		
Autres genres...	<i>Micrococcus lutéus</i> <i>Micrococcus varians</i>		
	<i>Streptococcus</i> Groupes A, B, C		
	<i>Brevibacterium</i>	Au niveau des espaces interdigités	
	<i>Malassezia</i>	En zones cutanées lipidiques	

(Masson, 2009).

Annexe 2

Tableau III : Résistance plasmidique aux antiseptiques et désinfectants.

Famille	Bactérie	Mécanisme génétique et biochimique
Ammonium quaternaire	<i>S.aureus</i> <i>Staphylococcus spp</i> <i>E.coli</i> <i>Klebsiella.pneumoniae</i>	Gène q.a.c Plasmide P.S.K efflux augmenté
Métaux lourds		
Phénol -Hexachlorophène - Triclosan	<i>P.aeruginosa</i> <i>E.coli</i> <i>Salmonella spp</i> <i>S.aureus</i>	Plasmides Modification de surface
Biguanide -Chlorhexidine	<i>Pseudomonas</i>	Gène q.a.c Plasmide p.s.k efflux augmenté
Colorants -Sels d'acridine -Bromure d'éthidium	<i>S.aureus</i>	Gène q.a.c Plasmide p.s.k efflux augmenté
Amidines	<i>S.aureus</i>	Gène q.a.c Plasmides p.s.k efflux augmenté
Aldéhydes	<i>S.marcescens</i>	Déshydrogénase

(MacDonnell et al., 1999).

Annexe 4

Matériel non biologique : Matériel du laboratoire

Appareillage	Verreries et consommables
<ul style="list-style-type: none">-Etuve bactériologique à 30°C, MEMERT-Bain marie thermostat réglable.-Agitateur type vortex-Compteur des colonies-Centrifugeuse-Microscope optique-Spectrophotomètre-Bec Bunsen-Réfrigérateur-PH-mètre-Chronomètre-Micropipette P1000	<ul style="list-style-type: none">-Tubes à essais stérile-Flacon en verre stérile de 250 ml-Pipette en verre gradué de 5 ml et 10 ml-Bille de verre (2-4mm)-Erlen Meyer-Eprouvette de 50 ml, 100ml-Fiole jaugées-Poires-Boîtes de Pétri-Cuve jetable pour spectrophotomètre-Pipettes pasteur-Portoirs-Embout jetable de 1 ml-Lames et lamelles

Réactifs et colorants	Stérilisation
<ul style="list-style-type: none">-Tween 80-Eau physiologique stérile-thiosulfate de Na (0,5%)-Bleu de méthylène-violet de Gentiane-Lugol-Fushine-Alcool acétone-Eau distillée stérile	<ul style="list-style-type: none">-Stérilisation par la chaleur humide : Autoclave-Stérilisation sèche à 170°C au moins pendant 1 Heure : poupinelle-Stérilisation par filtration sur des membrane ayant des pores de 0,45 Mn de \varnothing : les produits sensible à la chaleur : le cas des neutralisants dans cette étude

Annexe 5

Composition des milieux de cultures (pour 1 litre)

Gélose Tryptocase Soja AGAR TSA	Gélose PCA pour dénombrement
Peptone trypsique de caséine.....15 g/l Peptone de Soja.....5 g Chlorure de sodium.....5 g Agar agar.....18 g Eau distillée.....Qsp 1000ml Ajuster le PH à 7.2 ± 0.2 , autoclaver à 121° C pendant 20 min	Extrait de levure déshydraté2.5 g Peptone trypsine de caséine.....5 g Glucose.....1 g Agar agar.....18 g Eau distillée.....Qsp 1000ml Ajuster le PH à 7.2 ± 0.2 , autoclaver à 121° C pendant 20 min
Milieu de Sabouraud	Gélose pour dénombrement des levures
Bacto Neopeptone.....10 g Bacto dextrose.....20 g Bacto agar.....20 g Eau distillée.....Qsp 1000ml Ajuster le PH à 7.2 ± 0.2 , autoclaver à 120° C pendant 20 min	Extrait de levure.....20 g Glucose20 g Agar-agar18 g Eau distillée.....Qsp 1000ml Ajuster le PH à 6.8 ± 0.1 , autoclaver à 120° C pendant 20 min
Bouillon pour inoculum de <i>Bacillus</i>	Gélose pour préparation de spores de <i>Bacillus</i>
Extrait de levure2.5 g Tryptone.....5 g Glucose1 g Eau distillée.....Qsp 1000ml Ajuster le PH à 7.2 ± 0.1 , autoclaver à 120° C pendant 20 min	Extrait de viande10 g Extrait de levure.....2 g Mn SO ₄ , H ₂ O.....0.04 g(=40 mg) Agar-agar.....25 g Eau distillée.....Qsp 1000ml Ajuster le PH à 7 ± 0.1 , autoclaver à 120° C pendant 20 min
Gélose cétrimide : milieu selectif pour la recherche des <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gélose Chapman : milieu selectif pour la recherche des <i>Staphylococcus aureus</i>
Digeste pancréatique de gélatine.....20g Sulfate dipotasique..... 10g Chlorure de magnésium.....1,4g Cétrimide.....0,3g Agar.....13,6g Eau distillée.....Qsp 1000ml Ajuster le PH à $7,2\pm 0,2$, autoclaver à 120° c pendant 15min	Tryptone.....05g Extrait de levure.....03g Extrait de viande.....03g Chlorure de sodium.....70g Peptone bactériologique..... 10g Mannitol..... 10g Rouge de phénol.....0,05g Agar.....18g Eau distillée.....Qsp 1000ml Ajuster le PH à $7,4 \pm 0,1$, autoclaver 120pendant 20min.
Bouillon nutritive : milieu liquide aux	Tampon peptonée au chlorure de sodium

peptones de caséine et de soja	PH= 7
Peptone pancréatique de caséine..... 17g Peptone papaique de soja..... .3g Chlorure de sodium.....5g Phosphate dipotassique.....2,5g Glucose monohydraté.....2,5g Eau distillée.....Qsp1000ml Ajuster le PH à 7,3±0,2, autoclaver à 121c° pendant 15 min	Phosphate monopotassique.....3,6g Phosphate disodique duhydraté.....7,2g Equivalentà 0,067M de phosphate Chlorure de sodium.....4,3g Peptone de viande ou de caseine..... 1g Eau distillée.....Qsp 1000ml Autoclaver à 121c° pendant 15min
Milieu liquide lactosé	Milieu d'enrichissement pour les entérobactéries - Mossel
Extrait de viande de bœuf.....3g Hydrolysate pancréatique de gélatine.....5g Lactose monohydraté.....5g Eau distillée.....Qsp1000ml Ajuster le PH à 6,9±0,2, autoclaver à 120c° pendant 15 min	Hydrolysate pancréatique de gélatine..... .10g Glucose monohydraté..... .5g Bile de bœuf déshydraté.....20g Phosphate monopotassique.....2g Phosphate disodique dihydraté.....8g Vert briant.....15g Eau distillée.....Qsp1000ml Ajuster le PH à 7,2±0,2, autoclaver à 100c° pendant 30min et refoidisser immédiatement
Gélose glucosé biliée au cristal violet et rouge neutre VRBG : pour la recherche des entérobactéries et autres gram négatif	
Extrait de levure.....3g Hydrolysate pancréatique de gélatine.....7g Sels biliaires.....1,5g Lactose monohydraté.....10g Chlorure de sodium.....5g Glucose monohydraté..... 10g Gélose..... .15g Rouge neutre.....30g Violet cristallisé..... .2g Eau distillée.....1000g Ajuster le PH à 7,4±0,2, Chauffer à l'ébullition.	

(Afnor et comité Européen de Normalisation, édition 1997).

(Pharmacopée Européenne 6^e édition, 2008).

Annexe 6

Table pour la dilution de l'alcool (Table de Gay-Lussac) appelée aussi Table de mouillage de l'alcool

Concentration initiale : titre de l'alcool à diluer (exprimer en degrés)															
		100	99	98	97	96	95	90	85	80	75	70	65	60	50
Concentration Finale : titre d'alcool à obtenir (exprimé en degrés)	95	6,5	5,15	3,83	2,53	1,25									
	90	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	6,41								
	85	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	13,33	6,56							
	80	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	13,79	6,83						
	75	37,58	35,9	34,28	32,67	31,08	29,52	21,89	14,48	7,2					
	70	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	39,18	31,05	23,14	15,35	7,64				
	65	59,37	57,49	55,63	53,81	52	50,22	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15			
	60	72,82	70,80	68,8	65,85	64,92	63	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76		
	55	88,6	86,42	84,28	82,16	80,06	77,99	67,87	57,9	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47	
	50	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	95,89	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	
	45	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	117,57	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	11,41
	40	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	144,46	130,8	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	25,55
	35	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	178,71	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	43,59
	30	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	224,08	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71	67,45
	25	308,9	304,52	300,18	295,86	291,56	287,28	266,12	245,15	224,3	203,61	182,83	162,21	141,65	100,73
	20	408,5	403,13	397,79	392,47	387,17	381,9	355,8	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	150,55
15	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	539,66	505,27	471	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	233,64	
10	907,09	896,73	886,4	876,1	865,15	855,15	804,5	753,65	702,89	652,21	601,6	551,06	500,50	399,85	

(Marchal et al., 1982).

Exemple : La table indique qu'il faut ajouter 105,34 ml d'eau à 100 ml d'alcool à 90° pour obtenir de l'alcool à 45°.

Annexe 7 : Liste des neutralisants (Afnor et CEN, 1997)

L'un quelconque des neutralisants suivants peut être utilisé :

- Lécithine 3g/l ; polysorbate 80 30g/l ; thiosulfate de sodium 5g/l ; histidine 1g/l ; saponine 30g/l dans le di30g/l dans le diluant crypton sel ou dans une solution tampon phosphate 0,25mol/l(v/v) à 1%
- Solution tampon phosphate 0,25mol/l ;
 - Eau stérile 500ml
 - KH₂ PO₄ 34g
 - Ajusté le PH à 7,2 + 0,2 avec NAOH1 mol/l et complété à 1000ml d'eau
 - stérilisé à l'autoclave
- Jaune d'œuf frais dilué à 5% (v/v) ou 0,5% (v/v) ;
- 30g/l polysorbate 80 ; 4g/l lauryl sulfate de sodium ; lécithine 3g/l ;
- 5% (v/v) Jaune d'œuf frais : 40g/l polysorbate 80 ;
- 7%(v/v) condensat d'oxyde d'éthylène et d'alcools gras ; 4g/l lécithine ;
- 30g/g polysorbate 80 ; lécithine 3g/l ; L-histidine 1g/l ;
- Glycine (concentration en fonction de la concentration du produit soumis à l'essai) ;
- 30g/l polysorbate 80 ; lécithine 3g/l;
- Emulsion de phospholipide (disponible dans le commerce) à 50ml/ml (dilué au 1/10)
- Thioglycolate de sodium à 0,5g/l ou 5g/l :
- L- cystéine à 0,8g/l ou 1,5g/l :
- Acide thiomatique à 0,075% (v/v) ajusté à PH7 avec NAOH ;
- Thiosulfate à 5g/g
- Catalase ou per oxydase : une unité de ces enzymes catalyse la décomposition de 1M mol de per oxyde d'hydrogène par minute à 25 °C et à PH7 ;
- Polysorbate 8030 g/l ; saponine 30g/l ; L- histidine 1g/l ; L- cystéine 1g/l

Note: la ci-dessus n'est pas exhaustive et il est possible d'utiliser d'autres neutralisants.

Annexe 8

Test du non contamination (Pureté) des antiseptiques testés

Test	Technique	Norme
Dénombrement des germes aérobies viables totaux	<p>Nous avons préparé une dilution de 10 ml du produit à examiner dans une solution de Tampon péptonée au chlorure de Sodium PH=7, correspond a une dilution de 1/10^{cmme}</p> <p>Nous avons effectué un ensemencement en profondeur à raison de 1ml de la dilution déjà préparée pour chaque produit</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Pour le dénombrement des bactéries, nous avons utilisé la gélose TSA, avec une incubation de 5 jours à 37c°. ➤ Pour le dénombrement des levures et moisissures, nous avons utilisé la gélose Sabouraud + Chloramphénicol, avec une incubation de 5 jours à 25c°. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Inférieur ou égale 100 UFC/ ml. ➤ Inférieur ou égale 100 UFC/ ml.
Recherche et dénombrement des Entérobactéries et autre gram négatifs	<p>Nous avons ensemencé 1ml du produit dans 100ml du milieu liquide lactosé, et nous avons incubé 2h à 37c°, Après nous avons prélevé 1ml du milieu lactosé déjà incubé, et inoculé à 100ml du milieu d'enrichissement pour les entérobactéries-Mossel, incubé à 37c° pendant 18-48h, puis nous avons réalisé des subculture sur milieu gélosé à la bile-violet cristallisé-rouge neutre avec glucose VRBG, incubé à</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Pas de croissance de bactéries Gram négatifs

	37c° pendant 24h.	
Vérification de l'absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nous avons prélevé 10ml du produit à examiner et inoculé à 100ml du bouillon nutritif, incubé à 37c° pendant 48h, après nous avons réalisé des subculture sur gélose au Cétrimide, incubé à 37c° pendant 72h.	➤ Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Vérification de l'absence de <i>Staphylococcus aureus</i>	Nous avons prélevé 10ml du produit à examiner et inoculé à 100ml du bouillon nutritif, incubé à 37c° pendant 48h, puis nous avons réalisé des subculture sur gélose chapman, et incubé à 37c° pendant 48h.	➤ Absence de <i>S. aureus</i> .

Pharmacopée 6^{ème} édition, 2008.

Annexe 9

Vérification de l'identité des souches bactériennes et Fongiques retenus pour l'étude L'étude biochimique par les galerie API®.



Avant incubation



Après 24h d'incubation

Figure : Identification biochimique d'*Escherichia coli*

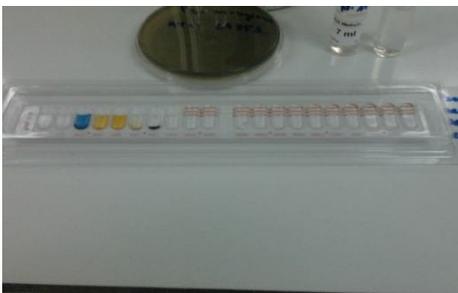


Avant incubation



Après 24h d'incubation

Figure : Identification biochimique de *Staphylococcus aureus*



Avant incubation



Après 24h d'incubation

Figure : Identification biochimique de *Pseudomonas aeruginosa*



- La lecture des galeries API des quatre souche : *P. aeruginosa* ; *E. coli* ; *S. aureus* ; *C. albicans*.

Annexe 10

Tableau VIII : résultats de l'étude de différentes caractéristiques des souches de référence confirmant leur identité

Souches / caractéristique	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
Caractères macroscopiques des colonies	Colonies plates, grandes irrégulière, surface lisse, colleurs bleu verte (pigments), translucides consistance muqueuses, odeur (+)	Colonies bombés, petites, surface lisse, régulières, colleurs blanche claire transparentes, consistance crémeuses, odeur (+)	Colonies bombés, petites régulières, surface lisse, colleurs jaune doré opaques, consistance crémeuses, odeur (+)	Colonies plates, irrégulières, surface rigoureuse de couleurs blanche consistance muqueuses, odeur (+)	Colonies bombés, de taille moyen, surface lisse, régulières, colleurs très blanche, consistance crémeuses
Caractères microscopiques des cellules microbiennes	Bacille, Gram (-) regroupé, mobile A sporulé	Coccobacille Gram (-), isolé, mobile, A sporulé	Cocci Gram (+) en amas, en grappe de raisin, immobile asporulé	Bacille, Gram (+) regroupé en palissade, immobile, sporulé (caractère important de la vérification)	Gros cellules sphérique, prennent la coloration de Gram (+), isolé, immobile
Identification biochimique (Galeries Api 20)	Galerie API 20 NE montre une très bonne identification de 99.9% de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Galerie API 20 E donne une bonne identification de 98.1% à <i>E. coli</i> ATCC 25922	Galerie API staph montre une bonne identification de 98.1% de <i>S. aureus</i> ATCC 25923	On a pas réalisé l'étude biochimique, à cause de la non disponibilité des sucres, et des Galeries API <i>Bacillus</i> .	Galerie API Aux donne une bonne identification à 99.8% de <i>Calbicans</i> ATCC 10231

