

RUPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la vie

Département De Biologie

## Mémoire de Fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV  
Filière Sciences Biologique

**Option :** Microbiologie

**Thème**

### Etude de l'efficacité des biocides vis-à-vis des bactéries multirésistantes

**Présenté par :**

**Date de soutenance : 13/07/2023**

- Mlle Badaoui Hasnaa
- Mlle Nemdil Fethia

**Devant le jury:**

Mme OUAHCHIA C.	MCB/USDB1	Présidente
Mme BOKRITA S.	MCB/USDB1	Examinatrice
Mme HAMAIDI-CHERGUIF.	Professeur/USDB1	Promotrice
Mme BOULESNAM S.L.	Doctorante/USDB1	Co-promotrice

**Promotion 2022/2023**

# **REMERCIEMENTS**

*En premier lieu, nos profonds remerciements vont au bon Dieu de nous avoir donné la volonté et le courage de réaliser ce travail.*

*Comme nous tenons à remercier :*

*Notre promotrice Professeur **HAMAIDI** pour avoir inspiré ce sujet et dirigé notre travail avec efficacité. On est satisfaite de votre qualité exceptionnelle de bonne enseignante. Nous voulons sincèrement vous exprimer notre respect et notre gratitude. .*

*Un grand et respectueux remerciement à Mme **OUAHCHIA** pour avoir accepté de présider le jury de notre soutenance. Recevez ici, toute notre gratitude et reconnaissance.*

*Un grand et respectueux remerciement à Mme **BOKRETA** pour avoir accepté d'examiner notre modeste travail. Vous nous faites l'exemple avec votre compétence. Notre remerciement s'adresse également à notre Co-promotrice Mme **BOULESNEM** pour son encadrement, son aide et surtout pour tous ses conseils et ses remarques.*

*Nous remercions beaucoup le responsable de laboratoire d'hygiène de Blida M **Tefahi** Pour son bon accueil et toute l'équipe de laboratoire pour son aide et son soutien.*

*Enfin, nous tenons à remercier tous les enseignants pour leurs formations depuis notre première année universitaire Jusqu'à ce jour de soutenance.*

**HASNAA et FETHIA**

## *Dédicace*

J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail accompagné d'un profond amour :

A mon très cher père BACHIR, pour ses encouragements, son soutien, surtout pour son amour et son sacrifice afin que rien n'entrave les déroulements de mes études.

A ma très chère mère ASSIA, qui me donne toujours l'espoir de vivre, qui m'a appris, m'a supporté et qui n'a jamais cessé de prier pour moi.

A mes adorables sœurs *ILHEM, SABRINA et HOURIA que j'aime du fond du cœur.*

A toutes mes chères amies : IKRAM, SELMA et Wafa pour leur présence à mes côtés.

*A Toutes l'équipe de laboratoire Dr Zemouli*

*Et enfin à ma très chère binôme et ma sœur HASNAA, que je suis heureuse et fière d'avoir partagé avec moi ce modeste travail.*

*FETHIA*

## *Dédicace*

Du profond de mon cœur, je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers,

A mon père Toufik qui m'a aidé à devenir ce que je suis aujourd'hui, l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu le garde et le protège

A ma mère Sarah qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie que dieu la procure bonne santé et longue vie.

A mes grands-parents paternels et maternels, que DIEU garde leurs âmes dans son vaste paradis.

A mes sœurs SOUHILA et FELLA, mes frère MOHAMED et ISHEK qui n'ont pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que Dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.

A toutes mes chères amies : ZINEB et SELMA qui méritent tout le bonheur.

Et bien sûr à ma très chère binôme FETHIA pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.

*HASNAA*

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.</b> Taxonomie des entérobactéries .....	04
<b>Tableau III.</b> Taxonomie de genre <i>Acinetobacter sp.</i> .....	06
<b>Tableau IV.</b> Les caractères biochimiques d' <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	06
<b>Tableau VII.</b> Lecture quantitative de formation de biofilm.....	23
<b>Tableau VIII.</b> Résultat d'identification de souche 1.....	27
<b>Tableau IX.</b> Résultat d'identification de souche 2.....	28
<b>Tableau X.</b> Résultat d'identification de souche 3.....	30
<b>Tableau XI.</b> Résultat d'antibiogramme.....	31
<b>Tableau XII.</b> Résultat des concentrations minimales inhibitrices d'Ammoniums quaternaires sur les souches <i>k. pneumoniae</i> .....	34
<b>Tableau XIII.</b> Résultat des concentrations minimales inhibitrices d'Ammoniums quaternaires sur les souches <i>E cloacae</i> .....	34
<b>Tableau XIV.</b> Résultat des concentrations minimales inhibitrices d'Ammoniums quaternaires sur les souches <i>A. baumannii</i> .....	34
<b>Tableau XV.</b> Résultat des concentrations minimales inhibitrices de chlorhexidine sur les souches <i>k. pneumoniae</i> .....	39
<b>Tableau XVI.</b> Résultat des concentrations minimales inhibitrices de chlorhexidine sur les souches <i>E cloacae</i> .....	39
<b>Tableau XVII.</b> Résultat des concentrations minimales inhibitrices de chlorhexidine sur les souches <i>A. baumannii</i> .....	39
<b>Tableau XVIII.</b> Résultat des concentrations minimales inhibitrices de glutaraldéhyde sur les souches <i>k. pneumoniae</i> .....	43
<b>Tableau XIX.</b> Résultat des concentrations minimales inhibitrices de glutaraldéhyde sur les souches <i>E cloacae</i> .....	43
<b>Tableau XX.</b> Résultat des concentrations minimales inhibitrices de glutaraldéhyde sur les souches <i>A. baumannii</i> .....	43
<b>Tableau XXI :</b> Détermination de la concentration minimale d'éradication de biofilm (MBEC) après traitement avec les biocides par les souches de <i>k. pneumoniae</i> .....	49
<b>Tableau XXII :</b> Détermination de la concentration minimale d'éradication de biofilm (MBEC) après traitement avec les biocides par les souches d' <i>E.cloacae</i> .....	50
<b>Tableau XXIII :</b> Détermination de la concentration minimale d'éradication de biofilm (MBEC) après traitement avec les biocides par les souches <i>A.baumannii</i> .....	51
<b>Tableau II.</b> Caractères d'indentification des genres le plus fréquemment rencontrés des <i>Enterobacteriaceae</i> .....	70
<b>Tableau V.</b> Quelques biocides utilisés dans les milieux hospitaliers.....	70
<b>Tableau VI.</b> Liste des antibiotiques utilisés pour l'évaluation de l'Antibiorésistance.....	70

## Liste des figures

<b>Figure 01 :</b> Représentation schématique des différentes étapes du mécanisme d'action des biocides.....	08
<b>Figure 02 :</b> Résumé des différents mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	11
<b>Figure 03:</b> Schéma des différents mécanismes de résistance antimicrobienne chez <i>A.baumannii</i> .....	12
<b>Figure 04 :</b> Schéma illustrant les principales étapes du protocole expérimental réalisé dans cette étude. ....	16
<b>Figure 05 :</b> Représentation schématique d'une gamme de dilution de biocide.....	20
<b>Figure 06 :</b> Représentation schématique de la technique des microdilutions (CMI) des biocides vis-à-vis des bactéries multirésistantes.....	21
<b>Figure 07 :</b> Puits de microplaques.....	24
<b>Figure 08:</b> Microplaque après l'ajout des trois concentrations de biocides.....	24
<b>Figure 10 :</b> Détermination des concentrations minimales inhibitrice d'ammonium quaternaire sur les trois souches bactériennes testées.....	33
<b>Figure 11:</b> observation microscopique (état frais) après test CMI d'Ammoniums quaternaires (x40).....	35
<b>Figure 12:</b> Coloration de Gram après contact avec le biocide (X100).....	35
<b>Figure 13:</b> Détermination de la CMB d'ammonium quaternaire observée chez les trois souches étudiées. ....	36
<b>Figure 14 :</b> Représentation graphique récapitulatif de la détermination de la CMI et CMB pour l'ammonium quaternaire.....	37
<b>Figure 16:</b> observation microscopique (état frais) après test CMI du chlorhexidine (x40).....	40
<b>Figure 17 :</b> Représentation graphique récapitulatif de la détermination de la CMI et CMB pour le chlorhexidine.....	41
<b>Figure 18 :</b> Détermination des concentrations minimales inhibitrice de glutaraldéhyde sur les souches de <i>k. pneumoniae</i> . ....	43
<b>Figure 19:</b> observation microscopique (état frais) après test CMI du Glutaraldéhyde (x40).....	44
<b>Figure 20 :</b> Représentation graphique récapitulatif de la détermination de la CMI et CMB pour le Glutaraldéhyde.....	45
<b>Figure 21 :</b> Production de slime chez <i>k. pneumoniae</i> isolé sur milieu rouge congo.....	46
<b>Figure 22 :</b> Evaluation d'efficacité de biocide sur le biofilm formé par la méthode TM.....	47
<b>Figure 24:</b> Pourcentage de l'éradication du Biofilm.....	53
<b>Figure 09:</b> Evaluation de la densité optique du biofilm par lecteur ELISA.....	73
<b>Figure 15 :</b> Détermination des concentrations minimales inhibitrice de chlorhexidine sur les souches d' <i>E. clacae</i> ... ..	73
<b>Figure 23 :</b> Aspect des biofilms sur microplaque et lecture de (DO).....	74

## Liste des abréviations

- **ADH:** Arginine déshydrogénase.
- **ADN :** Analytical profil index.
- **API :** Analytical profil index.
- **ARNm :** acide ribonucléique messenger
- **ATB :** antibiotique
- **BHIB:** Brain heart infusion broth.
- **BMR :** bactérie multirésistantes
- **CHX :** chlorhexidine
- **CIT:** Citrate
- **CLSI:** Clinical and laboratory standard institute
- **CMB :** concentration minimale bactéricide
- **CMI :** concentration minimale inhibitrice
- **CV :** cristal violet
- **DDAC :** Chlorure de didécyltriméthylammonium
- **D.O :** densité optique
- **ELISA:** Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
- **EPS :** exo-polysaccharides
- **GEL:** Gélatinase
- **GLU:** Glucose.
- **GLU :** glutaraldéhyde
- **GN:** gélose nutritive
- **GSC :** gélose au sang cuit
- **HK:** gélose Hektoen
- **I :** Intermédiaire
- **IND:** Indole.
- **INO :** Inositol.
- **LDC :** Lysine décarboxylase.
- **LPS :** les lipopolysaccharides.
- **MAN :** Mannose.
- **MBEC :** concentration minimale d'éradication de biofilm
- **MC:** gélose Mac Conkey
- **MF:** Mac Farland
- **MH:** Mueller-Hinton
- **ODC:** Ornithine décarboxylase.
- **PBP :** protéines de liaison à la pénicilline
- **R :** Résistant
- **RC :** rouge congo
- **S :** Sensible
- **TBS:** Tris Buffered Saline
- **TM:** méthode tube
- **USI:** unité de soins intensifs
- **TM:** method tube
- **VP:** Voges-Proskauer

## RESUME

L'environnement hospitalier constitue un immense réservoir de bacilles à Gram négatif résistants aux antimicrobiens qui peuvent ainsi atteindre les patients et provoquer de graves infections.

L'efficacité antibactérienne et antibiofilm de trois biocides : ammoniums quaternaires, glutaraldéhyde et chlorhexidine ont été testés sur des espèces multirésistantes responsables des infections hospitalières au sein de service de réanimation.

Afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des différents biocides testés, nous avons utilisé une méthode de micro-dilutions sur microplaque. Une autre méthode a été réalisée qui permet de quantifier l'habilité des molécules antimicrobiennes à détruire un biofilm (MBEC). La biomasse totale a été mesurée de la densité optique (DO) par un lecteur Elisa.

Les résultats obtenus ont révélé que les trois biocides possèdent une activité inhibitrice variable selon la concentration et la souche testée. Les concentrations minimales inhibitrices de ces trois agents varient entre 32 à 512 mg/l pour l'ammonium quaternaire, entre 128 à 512 mg/l pour le chlorhexidine et entre 256 à 1024 mg/l pour le glutaraldéhyde. En effet, la MBEC était beaucoup plus élevée et atteint à plus de 1024 mg/l pour la majorité de souches traitées par ces biocides.

Après analyse des résultats, la chlorhexidine a présenté l'activité la plus importante sur les différentes souches testées suivis par l'ammonium quaternaire. Le troisième biocide glutaraldéhyde a montré le plus faible effet antimicrobien.

**Mots clés :** Bacilles Gram négatif, Résistance, Biofilm, Glutaraldéhyde, Ammonium quaternaire, Chlorhexidine, CMI, MBEC.



## Abstract

The hospital environment is a huge reservoir of antimicrobial-resistant Gram-negative bacilli, which can reach patients and cause serious infections.

The antibacterial and antibiofilm efficacy of three biocides: quaternary ammoniums, glutaraldehyde and chlorhexidine were tested on multi-resistant species responsible for hospital infections in intensive care units.

In order to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the various biocides tested, we used a micro-dilution method on a microplate. Another method was used to quantify the ability of antimicrobial molecules to destroy biofilm (MBEC). Total biomass was measured by optical density (OD) using an Elisa reader.

The results showed that all three biocides have variable inhibitory activity, depending on the concentration and strain tested. The minimum inhibitory concentrations of the three agents ranged from 32 to 512 mg/l for quaternary ammonium, from 128 to 512 mg/l for chlorhexidine and from 256 to 1024 mg/l for glutaraldehyde. In fact, MBEC was much higher, reaching over 1024 mg/l for the majority of strains treated with these biocides.

After analysis of the results, chlorhexidine showed the highest activity on the different strains tested, followed by quaternary ammonium. The third biocide, glutaraldehyde, showed the weakest antimicrobial effect.

**Key words:** Gram-negative bacilli, Resistance, Biofilm, Glutaraldehyde, Quaternary ammonium, Chlorhexidine, MIC, MBEC.

## ملخص

ان بيئة المستشفى عبارة عن خزان ضخم من العصيات سالبة الجرام المقاومة لمضادات الميكروبات والتي يمكن أن تصل إلى المرضى وتسبب التهابات خطيرة.

تم اختبار فعالية ثلاثة مبيدات حيوية ضد البكتيريا و البيوفيلم: الأمونيوم الرباعي والجلوتارالدهيد و الكلورهيكسيدين على بعض البكتيريا المقاومة للمضادات مسؤولة عن عدوى المستشفيات في وحدات العناية المركزة.

من اجل تحديد الحد الادنى للتركيز المثبط للمبيدات الحيوية المختلفة استخدمنا طريقة التخفيف الدقيق على الصفائح الدقيقة تم تنفيذ طريقة أخرى تجعل من الممكن تحديد قدرة جزيئات مضادات الميكروبات على تدمير الأغشية الحيوية تم قياس الكتلة الحيوية الكلية بواسطة قارئ Elisa.

اظهرت النتائج المتحصل عليها أن المبيدات الحيوية الثلاثة لها نشاط مثبط متغير حسب التركيز والسلالة المختبرة. تتراوح التركيزات المثبطة الدنيا لهذه العوامل الثلاثة بين 32 إلى 512 مجم / لتر للأمونيوم الرباعي ، وبين 128 إلى 512 مجم/ لتر للكلورهيكسيدين وبين 256 إلى 1024 مجم / لتر للجلوتارالدهيد.

في الواقع كانت قيمة تركيز الحد الادنى للقضاء على البيوفيلم اعلى بكثير ما وصل الى اكثر من 1024 ملغم/ل لأغلبية السلالات المعالجة بهذه المبيدات الحيوية.

بعد تحليل النتائج أظهر الكلورهيكسيدين النشاط الأكبر على السلالات المختلفة المختبرة ، يليه الأمونيوم الرباعي. أظهر المبيد الحيوي الثالث جلوتارالدهيد أضعف تأثير مضاد للميكروبات.

**الكلمات المفتاحية:** عصيات سالبة الجرام ، مقاومة ، بيوفيلم ، جلوتارالدهيد ، أمونيوم رباعي ، كلورهيكسيدين ، الحد الادنى للتركيز المثبط ، تركيز الحد الادنى للقضاء على البيوفيلم.

## Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
RESUME	
Abstract	
ملخص	
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>Partie bibliographique</b>	
<b>I. BACTERIES MULTIRESISTANTES (BMR)</b> .....	<b>4</b>
I.1 <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> .....	4
I.2. BACILLES A GRAM NEGATIF NON FERMENTAIRE .....	5
<b>II. BIOCIDES</b> .....	<b>7</b>
II.1. DEFINITION .....	7
II.2. Notion antiseptique et désinfectant.....	7
II.3. Mécanismes d'action des biocides .....	8
II.4. Facteurs agissant sur l'activité antimicrobienne des biocides .....	9
II.5. Classification des biocides.....	10
<b>III. RESISTANCE BACTERIENNES AUX AGENTS ANTIMICROBIENS</b> .....	<b>11</b>
III.1 Résistances aux antibiotiques .....	11
III.2 Tolérance bactérienne aux biocides .....	12
III.3 Résistance croisée entre biocides et antibiotiques.....	13
<b>Partie expérimentale</b>	
<b>I. MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>15</b>
I.1 Matériel .....	15
I.2 Méthodes .....	15
I.2.1. Isolement et purification.....	15
I.2.2. Identification bactérienne .....	17
I.2.3. Antibiogramme .....	18
I.2.4 Etude de l'efficacité antibactérienne des biocides.....	19
I.2.5 Evaluation de la formation de biofilm <i>in vitro</i> .....	21
<b>Résultats et discussion</b>	

<b>II. RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>26</b>
II.1 Résultats de l'identification .....	26
II.2 Résultats de l'antibiogramme .....	30
II.3 Résultats de l'évaluation de l'efficacité antibactérienne des biocides.....	31
II.3.1 Ammoniums quaternaires .....	32
II.3.2 Chlorhexidine .....	38
II.3.3 Glutaraldéhyde .....	42
II.4 Evaluation de l'efficacité des biocides sur la persistance des bactéries <i>in vitro</i> .....	45
II.4.1 La méthode du Rouge Congo Agar.....	45
II.4.2 La méthode tube (TM).....	46
II.4.3 Technique de détermination de la concentration minimale d'éradication de biofilm (MBEC) sur microplaque .....	47
<b>Conclusion.....</b>	<b>55</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>58</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>69</b>

# *Introduction*

## INTRODUCTION

L'émergence et la diffusion de la résistance aux antibiotiques représentent une menace majeure de santé publique mondiale aussi bien dans les pays développés que dans les pays en développement (**Ouedraogo, 2016**).

Les bactéries à Gram négatif (BGN) sont les plus préoccupantes, vu leur capacité à acquérir des gènes qui codent pour des mécanismes de résistance aux antimicrobiens, en particulier, en présence d'une pression de sélection.

L'environnement hospitalier peut être la première source de propagation d'une maladie épidémique; c'est un milieu susceptible d'être contaminé directement ou indirectement par des agents pathogènes nuisibles à la santé humaine. Afin de contrôler la propagation de ces agents pathogènes, des efforts considérables, dont l'utilisation des biocides tels que des produits désinfectants et détergents, ont été déployés.

Ainsi, les biocides jouent un rôle primordial dans la prévention et la gestion des infections. Ils permettent de limiter l'utilisation des antibiotiques et donc de limiter l'émergence de souches bactériennes résistantes. (**Touria et al., 2010**). Mais l'utilisation croissante et parfois injustifiée des biocides sur les surfaces pouvant exercer une forte pression de sélection des mutants résistants et rendre les bactéries s'adaptent aux ces molécules (**Boutarfi, 2021**). De plus dans certaines conditions défavorables, les bactéries peuvent développer une résistance en formant des biofilms, assurant leur protection contre les antimicrobiens.

De nombreux travaux comme **Ango et al., (2020)** ; **Debabza, (2015)** ; **Ruppé et al., (2015)** ; **Kaye et Pogue (2015)** s'intéressent à la résistance aux antibiotiques, mais peu se basent sur la tolérance aux biocides.

Dans le cadre de notre projet de fin d'étude de master qui s'insère dans la thématique de 'l'équipe 2' du laboratoire Biotechnologies, Environnement et santé, l'objectif principal de cette étude préliminaire est d'évaluer l'efficacité de trois biocides : Chlorure didécyltriméthylammonium, chlorhexidine et glutaraldéhyde de *in vitro*, largement utilisés en Algérie, dans les milieux hospitaliers, pour la désinfection des différentes surfaces vis-à-vis des bactéries Gram négatives multirésistantes suspectées d'être incriminées dans la survenue des infections nosocomiales.

Pour cela, nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Réalisation de la méthode de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu liquide,
- Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB),
- Pour comprendre l'efficacité de ces biocides, nous avons calculé leur capacité à éradiquer les biofilms formés par les bactéries testées.

# *Partie bibliographique*



## I. BACTERIES MULTIRESISTANTES (BMR)

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

Cet environnement est en effet un réservoir important d'éléments génétiques mobiles, hébergés par différents types de bactéries, pouvant contribuer à la propagation et à l'émergence des gènes de résistance (**Caselli et al., 2018; Weingarten et al., 2018 ; Shamsizadeh et al.,2017**).

### I.1 ENTEROBACTERIACEAE

Ce sont des bacilles qui font partie de la flore gastro-intestinale normale de l'hôte. Ce sont d'ailleurs les bactéries les plus fréquemment isolées dans les prélèvements cliniques (**Bilavsky et al., 2010**).

Chez l'homme, les entérobactéries sont responsables d'environ 50% des infections nosocomiales et plus particulièrement les entérobactéries suivants : *Enterobacter spp*, *Klebsiella spp*, *Escherichia coli*, *Proteus spp*, *Providencia spp* et *Serratia marcescens* (**Prescott et al., 2013 ; Prescott et al.,2003**).

Selon la classification de la 2ème édition de Bergy's manuel (2004) (**Tableau I**) :

**Tableau I : Taxonomie des entérobactéries**

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>

Ils comprennent de nombreux genres bactériens répondant à la définition suivante :

- Bacilles à Gram négatif
- Ne possédant pas d'oxydase
- Aérobie anaérobie facultatif
- Fermentant le glucose
- Réduisant les nitrates en nitrites
- Poussant sur milieu ordinaire (La culture est rapide : quelques heures à 30 et 37 °C)

Leurs caractères biochimiques sont résumés dans le **Tableau II** (Voir annexe)

Permet les *Enterobacteriaceae* on distingue :

- ✚ Des espèces à fort potentiel pathogène, considérées comme des pathogènes stricts. Elles sont caractérisées par leurs facteurs de virulence (capacité d'adhésion aux cellules de la muqueuse, capacité d'invasion, capacité de toxinogénèse). Leur présence dans l'organisme (intestin) est anormale et se traduit par des syndromes digestifs (diarrhées).
- ✚ Des espèces occasionnellement pathogènes, qui correspondent aux espèces commensales de notre organisme ou à des bactéries de l'environnement. Elles jouent un rôle pathogène à l'occasion de la rupture d'une barrière immunologique, lors d'une diminution des résistances de l'organisme ou lors d'un déséquilibre de la flore commensale (antibiothérapie). (A GORO, 2021 ; Prescott *et al.*, 2013 ; Prescott *et al.*, 2003).

Elles peuvent causer une variété d'infections et sont considérés actuellement comme des bactéries pathogènes opportunistes les plus importants à l'origine d'infections nosocomiales et communautaires, en particulier chez les personnes immunodéprimées (Podschun et Ullmann, 1998).

### I.2. BACILLES A GRAM NEGATIF NON FERMENTAIRE

Les bacilles Gram négatif non fermentaires sont ubiquitaires, ayant peu d'exigences nutritives survivent et se multiplient dans les milieux humides, notamment dans l'environnement hospitalier, et peuvent aussi contaminer des solutions antiseptiques. Ces bactéries sont responsables d'infections nosocomiales d'origine exogène et endogène chez des patients le plus souvent immunodéprimés (Barclay *et al.*, 1996).

*Acinetobacter baumannii*(*A.baumannii*) représente plus de 90% des isolats cliniques dans le monde entier. Considérée comme ubiquitaire et peut être isolée à partir d'échantillons humains, animaux et environnementaux. (Uwingabiye, 2018).En environnement hospitalier, les milieux d'isolement d'*A.baumannii* sont variables : le matériel d'assistance respiratoire (respirateurs, humidificateurs d'air), dans les chambres des malades (matelas, thermomètres, laryngoscope, fenêtres, tables de chevet), sur les objets humides (lavabo, savons), dans l'air, sur le sol des services et sur le personnel soignant (Rivière, 2017).

Longtemps considéré comme un représentant de la famille des *Neisseriaceae*, le genre

## Partie bibliographique

*Acinetobacter* est actuellement inclus dans la famille des *Moraxellaceae*.

**Tableau III : Taxonomie de genre *Acinetobacter* sp**

<b>Domain</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Phylum</b>	<i>Proteobacteriae</i>
<b>Classe</b>	<i>Gammaproteobacteria</i>
<b>Ordre</b>	<i>Pseudomonadales</i>
<b>Famille</b>	<i>Moraxellaceae</i>

(Dougharriet *al.*, 2011).

*A. baumannii* se cultive sur milieux usuels. C'est la seule espèce capable de croître à 44 ou 45 °C (Avril *et al.*, 2000 ; Flandrois, 1997).

Tous les membres de ce genre sont des aérobies stricts, oxydase négative, catalase positive, à métabolisme respiratoire strict et non fermentaire.

Les caractères biochimiques d'*Acinetobacter baumannii* sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau IV : les caractères biochimiques d *Acinetobacter baumannii***

Tests	Oxydase	Catalase	Nitrate réductase	LDC	ODC	H <sub>2</sub> S	Indole
Résultats	-	+	-	-	-	-	-

(Bouvet et Joly-Guillou, 2000).

*Acinetobacter baumannii* est un pathogène opportuniste responsable d'infections nosocomiales sévères (Baron *et al.*, 1995), dû à la capacité de survie prolongée dans des conditions environnementales variées. (Wendt *et al.*, 1997)

Il est devenu l'un des principaux agents responsables des infections nosocomiales, en particulier dans les unités de soins intensifs (USI) du monde entier (Shimose *et al.*, 2016; Greena *et al.*, 2016).

## II. BIOCIDES

L'hygiène hospitalière est une politique visant à prévenir, lutter et contrôler les infections hospitalières, Elle met en rapport les acteurs (malades, personnel médical et paramédical, personnel administratif et technique, visiteurs et accompagnants) et leur environnement (**Maiga, 2003**).

Essayer d'assurer un environnement sain pendant l'hospitalisation représente un objectif vital de développement durable de ces dernières années, pour tenter de faire face à la préoccupation mondiale des infections nosocomiales. Les surfaces hospitalières peuvent désigner un réservoir d'agents pathogènes, en effet la contribution des surfaces hospitalières contaminées est de plus en plus reconnue comme un facteur important dans l'acquisition d'infections nosocomiales (**Caselli, 2017**). C'est pour cette raison, l'utilisation des biocides est très largement répandue dans les hôpitaux.

### II.1. DEFINITION

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

Les biocides sont largement utilisés au sein des établissements de santé pour différentes applications : la stérilisation des dispositifs médicaux, la désinfection des surfaces et de l'eau, comme antiseptiques cutanés et pour la préservation de diverses formulations (**Maillard, 2005**).

En particulier, ils jouent un rôle important dans le contrôle des infections, aident à prévenir la propagation des organismes infectieux. Lorsqu'ils sont utilisés de manière appropriée, les biocides peuvent également influencer sur l'incidence des infections nosocomiales et réduire la nécessité d'une antibiothérapie (**Murtough et al., 2001**).

### II.2. Notion antiseptique et désinfectant

Les antiseptiques et les désinfectants sont utilisés pour leurs propriétés antiseptiques, désinfectantes et/ou préservatives (**Russell, 2002**).

#### Les antiseptiques

Les antiseptiques sont des biocides ou des produits qui détruisent ou empêchent-la croissance des micro-organismes sur le tissu vivant. Ils sont utilisés pour le traitement des plaies et la préparation de la peau avant une intervention chirurgicale. Ce sont, pour la plupart, les antimicrobiens de surface les moins puissants et les moins toxiques (**Kahrs, 1995**).

## ✚ Les désinfectants

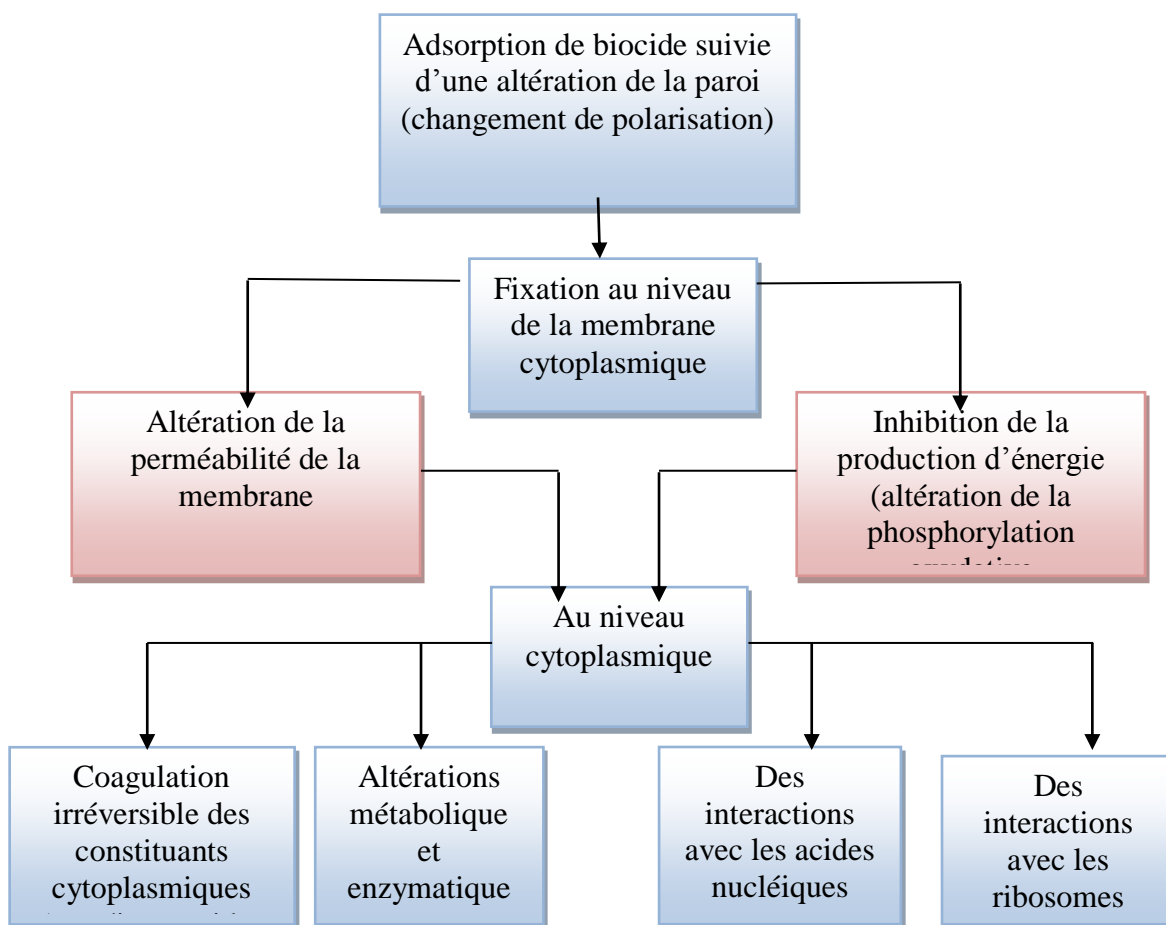
Le terme désinfectant est réservé à l'utilisation d'agents antimicrobiens sur les surfaces inertes. Ces agents appartiennent généralement à la même famille chimique que les antiseptiques (Martin et Gouin, 2000).

La concentration d'un biocide dans un produit est essentielle à son activité antimicrobienne, mais un équilibre doit être trouvé entre l'efficacité et la toxicité (Maillard, 2005).

### II.3. Mécanismes d'action des biocides

Les antiseptiques agissent sur les bactéries plus rapidement et plus brutalement que les antibiotiques (Martin et Gouin, 2000).

Il existe également des similitudes dans les actions de certains antibiotiques et biocides. (Russell, 2002). Selon Martin et Gouin (2000), le mécanisme d'action des biocides comporte plusieurs étapes :



**Figure 1** : Représentation schématique des différentes étapes du mécanisme d'action des biocides (Russell, 2002; Martin et Gouin, 2000).

### II.4. Facteurs agissant sur l'activité antimicrobienne des biocides

Plusieurs facteurs influencent l'activité antimicrobienne pour assurer qu'un biocide est employé correctement, une partie est liée au biocide et l'autre partie dépend des microorganismes (Maillard 2005).

#### Facteurs liés aux biocides

- **Concentration d'un biocide** : C'est peut-être le facteur le plus important pour affecter l'activité antimicrobienne.
- **Temps de contact** : Est également essentiel. La diminution de la durée d'exposition est souvent associée à une diminution l'activité.
- **Charge organique** : Les substances interférentes (salissures, pus, sang, sérosité, selles ...) peuvent entraîner une diminution de l'activité des antiseptiques.
- **Température** : Il est important de comprendre l'effet de la température sur l'activité de biocide. (Maillard, 2005).
- **Utilisation concourante** : Ce sont essentiellement les phénomènes d'antagonisme et de potentialisation rencontrés lors de l'utilisation de divers antiseptiques (Martin et Gouin, 2000).
- **Influence du pH**: le pH font partie des facteurs les plus importants de l'activité des biocides. (Mogoa, 2010).

#### Facteurs liés aux bactéries

- **Présence de biofilm** : Les biofilms constituent un facteur non négligeable dans la résistance aux agents antimicrobiens, ils sont difficiles à éliminer et constituent une source majeure d'infection hospitalière (Amiyare *et al*, 2015).
- **Influence de la membrane** :La membrane est l'une des premières cibles des biocides et, de ce fait, constitue une propriété intrinsèque de la résistance aux biocides (Mogoa, 2010).
- **Type de micro-organismes** : aura une incidence sur le choix de l'agent à utiliser (Maillard, 2005).
- **Taille de la population** : Il faut plus longtemps pour détruire une population importante, que pour une population plus petite (Prescott *et al*, 2003).

### II.5. Classification des biocides

Ces agents antimicrobiens peuvent être classés en deux groupes selon plusieurs paramètres, notamment la structure chimique et le domaine d'application (cliniques et non cliniques) (**Barah, 2013**).

- ❖ **Les produits non létaux mais seulement inhibiteurs de croissance (agissant à faibles concentrations) :** Un effet bactériostatique est observé, empêchant la croissance et la reproduction des bactéries, dépend essentiellement du temps de contact.
- ❖ **Les produits potentiellement létaux (agissant à des fortes concentrations) :** Un effet bactéricide est observé, éliminant les microorganismes. La prolifération des bactéries s'arrête mais elle reprend une fois que les conditions défavorables ont disparues (**Putois, 2012 ; Allion, 2004**). Le **tableau V** (Annexe) résume les caractéristiques de quelques biocides les plus utilisés dans les milieux hospitaliers.

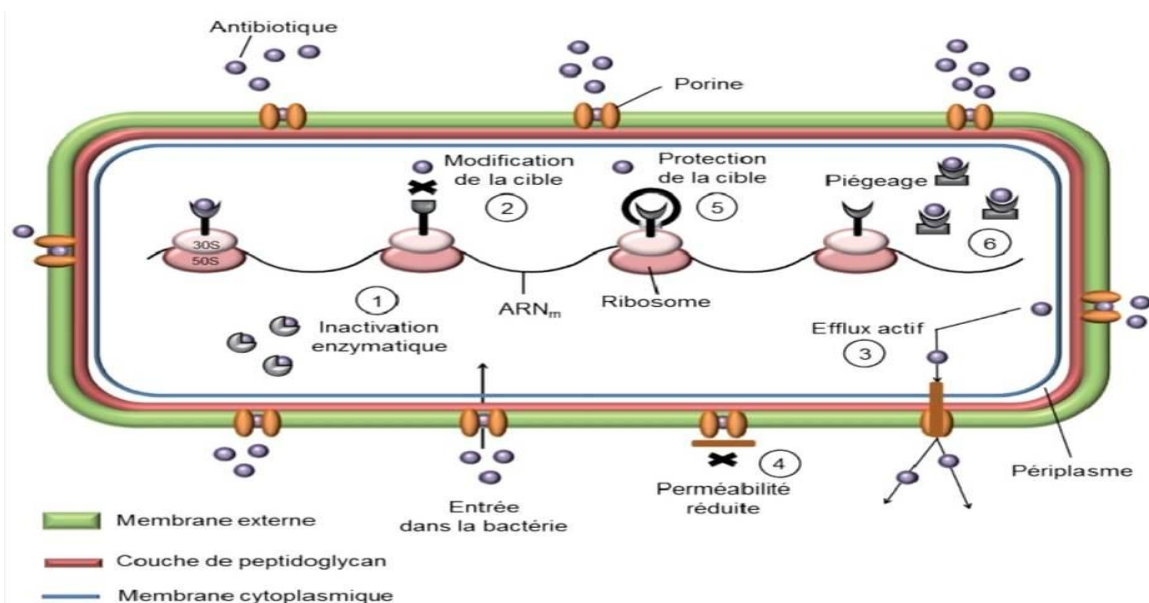
## III. RESISTANCE BACTERIENNES AUX AGENTS ANTIMICROBIENS

### III.1 Mécanisme de résistances aux antibiotiques

#### ✚ Les entérobactéries

Les entérobactéries résistent à l'action des antibiotiques par différents facteurs (**figure 2**) :

- ❖ Inactivation enzymatique de l'antibiotique
- ❖ Modification de la cible de l'antibiotique
- ❖ Efflux actif de l'antibiotique
- ❖ Perméabilité réduite
- ❖ Protection de la cible de l'antibiotique
- ❖ Piégeage de l'antibiotique, et ARNm : acide ribonucléique messager



**Figure 2** : Résumé des mécanismes de résistance aux antibiotiques (Muylaert et Mainil, 2012).

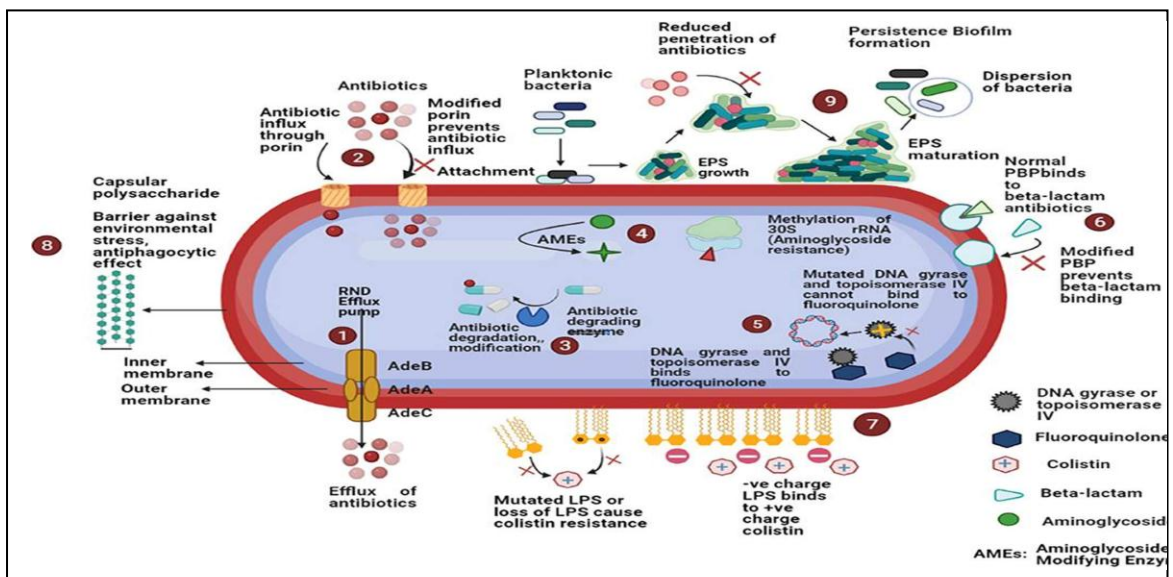
#### ✚ *Acinetobacter baumannii*

A. *baumannii* résiste facilement aux agents antimicrobiens par différents mécanismes(**Figure3**):

- ❖ Augmentation de l'expression des pompes à efflux
- ❖ Expression réduite de la porine (diminution de l'entrée des antibiotiques)
- ❖ Inactivation enzymatique par les b-lactamases.



- ❖ Les enzymes modifiant les aminoglycosides provoquent l'inactivation des antibiotiques
- ❖ Les mutations de la topoisomérase IV et de l'ADN gyrase diminuent la liaison des fluoroquinolones
- ❖ La modification des protéines de liaison à la pénicilline (PBP)
- ❖ La modification des lipopolysaccharides (diminution de la fixation de la colistine)
- ❖ La présence de polysaccharide capsulaire (barrière contre le stress environnemental)
- ❖ La capacité à former un biofilm entraîne une résistance antimicrobienne élevée (Subhasree *et al.*, 2022).



**Figure 3:** Schéma des différents mécanismes de résistance antimicrobienne chez *A. baumannii* (Subhasree *et al.*, 2022)

### III.2 Tolérance bactérienne aux biocides

Les bactéries à Gram négatif sont généralement plus résistantes à l'action biocide que les bactéries à Gram positif. Ceci est principalement attribué à la membrane externe, ce qui nuit à l'absorption de biocides, bien que l'efflux soit considéré comme un mécanisme de plus en plus important (Murrough *et al.*, 2001). La membrane externe des membres de la famille des *Enterobacteriaceae* (et d'autres bactéries à Gram négatif, en particulier *P. aeruginosa*) agit comme une barrière limitant empêchant l'entrée de nombreux types d'agents antibactériens (Ortega Morente *et al.*, 2013). Les mécanismes de résistance ou de tolérance bactérienne aux biocides ont été définis comme intrinsèques et acquis par plusieurs auteurs

dont (Ortega Morente *et al.*, 2013; Maillard, 2007; Murtough *et al.*, 2001; Russell, 1995).

La dégradation enzymatique des biocides a été rapportée comme étant un mécanisme de résistance bactérienne aux biocides chez plusieurs espèces de bacilles à Gram négatif, dont l'hydrolase et la réductase chez *E. coli* et l'aldéhyde déshydrogénase chez *E. coli* et *P. aeruginosa* la catalase, la superoxyde dismutase et l'alkyl hydroxypéroxydases chez *E. coli* (Maillard, 2005).

### III.3 Résistance croisée entre biocides et antibiotiques

Actuellement, un débat est engagé sur la possible émergence de la résistance aux biocides en milieu hospitalier et que cette résistance pourrait être accompagnée de celle des antibiotiques, bien que peu de travaux ont pu confirmer cette co-résistance (Wand *et al.*, 2017; Webber 2015). Des études génétiques et bactériologiques ont révélé l'implication de biocides en tant que sélectionneurs et / ou inducteurs de mécanismes impliqués dans l'émergence de souches à sensibilité réduite aux biocides et aux antibiotiques (Regli et Pages, 2012; Fraise, 2002).

Les modes d'action des antibiotiques et de biocides partagent de nombreuses similitudes en dépit de différences dans leur activité, par exemple leur cible, leur comportement et leurs caractéristiques cliniques (Regli et Pages, 2012).

En ce qui concerne les bactéries à Gram négatif, de nombreux rapports font état d'une résistance croisée biocide-antibiotique (Poole, 2002).

# *Partie expérimentale*

## I. MATERIEL ET METHODES

La présente étude a été réalisée au laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida, durant une période s'étalant du mois de février jusqu'au mois de juin 2023.

### I.1 Matériel

#### ❖ Matériel biologique

Les prélèvements ont été effectués durant la période qui s'étale du mois de Novembre 2021 jusqu'au mois de Janvier 2022 au niveau du service de réanimation à l'hôpital Frantz Fanon, CHU Blida.

Après culture et isolement des bactéries Gram négatives, les prélèvements sont conservés dans les milieux de conservation à -20°C.

La souche *E.coli* ATCC 25922 est utilisée comme témoin négatif.

#### ❖ Matériel non biologique

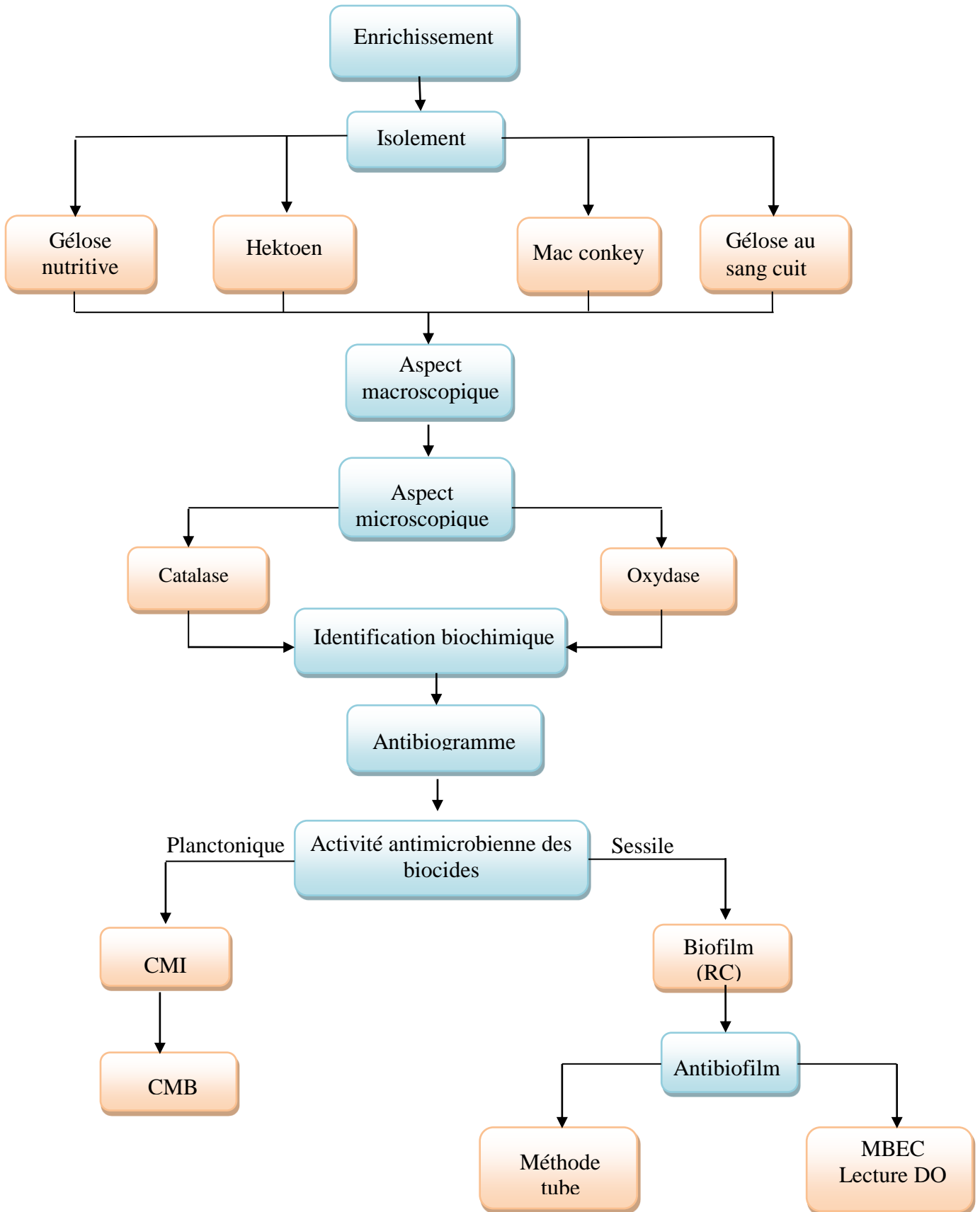
Représenté essentiellement par les milieux de cultures, les réactifs, les colorants, les biocides (Chlorure de didécyldiméthylammonium (DDAC), chlorhexidine (CHX), glutaraldéhyde (GLU)) et les appareillages (**Voir annexe**).

### I.2 Méthodes

#### I.2.1. Isolement et purification

Après enrichissement des prélèvements dans du bouillon BHIB + glucose pendant 24h à 37°C, les bactéries ont été isolées sur 4 milieux de cultures : gélose nutritive, gélose Hektoen, gélose Mac Conkey et gélose au sang cuit, puis l'incubation est effectuée à 37°C pendant 24 heures. Afin de confirmer la pureté des souches, nous avons effectué des repiquages successifs sur les mêmes milieux.

La figure n° 4 résume les principales étapes du protocole expérimental réalisé au cours de cette étude.



**Figure 04:** Schéma illustrant les principales étapes du protocole expérimental réalisé dans cette étude.

## I.2.2. Identification bactérienne

### ✚ Observation macroscopique et microscopique

Permet d'apprécier l'aspect des colonies, la couleur, la taille, la forme, la consistance et leurs capacités à fermenter les glucides. La seconde, elle permet d'apprécier la morphologie des bactéries, leur mode de regroupements (chainettes, diplocoques, tétrades).

### ✚ Caractères enzymatiques

- **Test de catalase :** C'est une enzyme décomposant l'eau oxygénée en eau et en oxygène gazeux. La méthode consiste à prélever une colonie sur l'extrémité d'une pipette Pasteur, que l'on plonge ensuite dans un millilitre d'eau oxygénée.

Lecture : Le dégagement de bulles gazeuses signe la présence de l'enzyme.

- **Test de l'oxydase :** Ce test permet de mettre en évidence la production, d'une enzyme l'oxydase par la bactérie étudiée,

Lecture : Dans le cas des entérobactéries, les bactéries sont non productrices d'oxydases, le test doit être négatif.

### ✚ Caractères biochimiques

L'identification des souches à Gram négatif a porté sur des tests biochimiques, en utilisant les galeries API 20E et NE.

Le système d'identification API 20E est utilisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et d'autres bacilles Gram négatifs. La galerie API 20E contient 20 microtubes de substrat déshydraté.

#### ❖ Préparation de la galerie

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

#### ❖ Inoculation de la galerie

- Préparer un inoculum bien homogène dans de l'eau physiologique stérile, à partir de colonies de morphologie identique provenant d'une culture jeune de 18 à 24 heures.
- Introduire l'inoculum dans les tubes de la galerie à l'aide d'une pipette.
- Remplir la totalité des tubes et cupules des tests CIT, VP et GEL.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des 3 tests soulignés ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, urée afin de créer l'anaérobiose.
- Refermer la boîte et incuber à 30°C pendant 24 heures.

### ❖ Lecture et interprétation de la galerie

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture
- L'identification est obtenue à partir du profil numérique.

### I.2.3. Antibiogramme

L'antibiogramme consiste à déterminer la sensibilité et la résistance aux antibiotiques d'une bactérie à l'origine d'un processus infectieux. Cette technique consiste à utiliser des disques d'antibiotiques différents par méthode de diffusion sur gélose de Mueller-Hinton et interprété après mesure des diamètres d'inhibition selon les recommandations du (*Clinical and laboratory standard institute*) **CLSI (2020)**.

Pour ce test, nous avons utilisé les antibiotiques et leurs charges (**Tableau VI**, Voir annexe)

### ❖ Préparation de l'inoculum

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

### ❖ Ensemencement des boîtes

Les boîtes sont ensemencées par écouvillonnage en frottant l'écouvillon sur la surface du milieu en stries serrées l'opération est répétée trois fois, en tournant la boîte de 60° afin d'avoir une culture en tapis homogène.

### ❖ Application des disques d'antibiotique

Les disques d'antibiotiques (ATB) ont été déposés sur les boîtes de Pétri, à l'aide d'une pince stérile. Pour chaque boîte de 90 mm de diamètre, un nombre ne dépassant pas 6 disques a été déposé. Les disques d'ATB ont été espacés de 24 mm, centre à centre.

### ❖ Incubation

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

### ❖ Lecture

Les diamètres des zones d'inhibition provoquées par les disques d'antibiotique sont mesurés avec précision à l'aide d'un pied à coulisse et comparés aux valeurs critiques du

CLSI afin de les classer dans l'une des trois catégories sensible S, résistant R ou intermédiaire I.

### **I.2.4 Etude de l'efficacité antibactérienne des biocides**

Afin de déterminer l'efficacité des biocides vis-à-vis des bactéries multirésistantes, nous avons suivi le protocole décrit par **Lijia Ni *et al.*,(2022)** avec quelques modifications selon les conditions du travail, représenté par la méthode de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Ce protocole repose sur la dilution en bouillon selon les directives du CLSI (CLSI, 2020), suivi d'un test complémentaire de détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) des biocides qui ont permis de démontrer la dilution la plus élevée pour une croissance bactéricide.

Les CMIs ont été déterminées par la technique de micro-dilutions et ont concerné les produits suivants : (Chlorure de didécyltriméthylammonium (DDAC), chlorhexidine (CHX), glutaraldéhyde (GLU) les plus utilisés en milieu hospitalier destinée au nettoyage et à la désinfection des surfaces, des structures externes des équipements et des dispositifs médicaux.

#### **➤ Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu liquide**

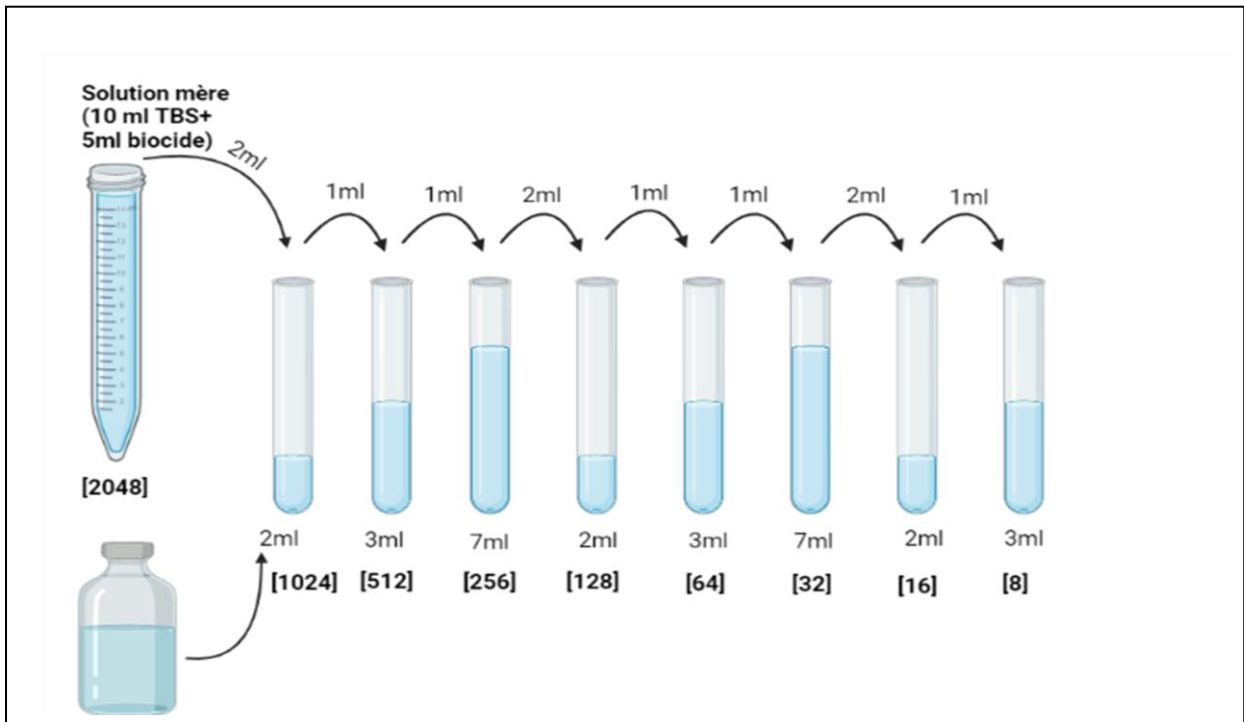
La concentration minimale inhibitrice(CMI) est la plus faible concentration de la substance pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu après un temps d'incubation de 18 à 24 h. Sa détermination a été faite par observation du trouble induit par la croissance des germes étudiés dans chaque puits. Elle consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations décroissantes de biocides selon les étapes suivantes :

#### **❖ Préparation de l'inoculum**

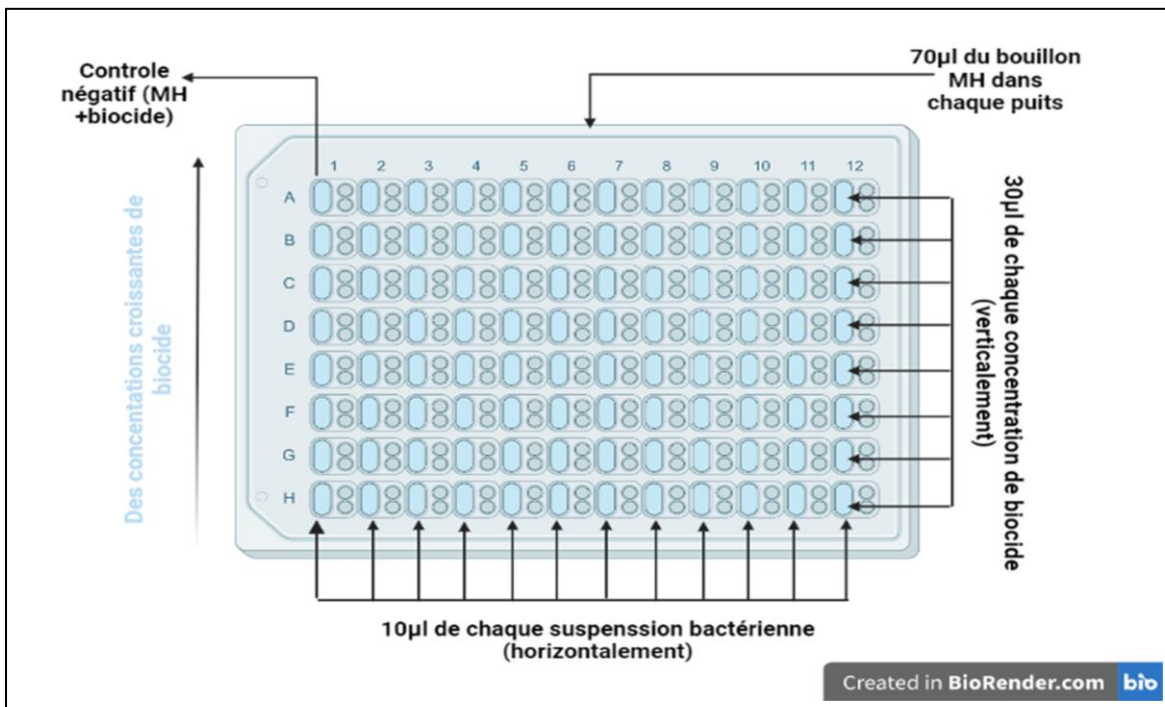
#### **❖ Préparation d'une gamme de dilution de biocide**

A partir de la solution mère, on prépare 8 dilutions avec de la solution tampon TBS comme suit : (Figure 5)





**Figure 05:** Représentation schématique d'une gamme de dilution de biocide.



**Figure 06:** Représentation schématique de la technique des micro-dilutions (CMI) des biocides vis-à-vis des bactéries multirésistantes.

## ❖ Lecture

### ➤ Observation macroscopique

La lecture se fait selon le même procédé utilisé pour l'activité antibactérienne.

### ➤ Observation microscopique

- **Etat frais** : se fait entre lame et lamelle, prendre une goutte du puits le plus claire qui correspond à la CMI et du puits trouble (concentration 08) afin de mieux comparer l'activité antibactérienne du biocide.

#### ➤ Détermination de concentration minimale bactéricide (CMB)

La concentration minimale bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en biocide capable de tuer 99,9% de l'inoculum bactérienne initial (soit moins de 0,01% de survivants).

#### ✚ Technique

Réaliser à partir des puits de CMI, puis ensemercer chacun des puits par un milieu solide gélose nutritif (GN) un volume de 10µl à l'aide d'une pipette Pasteur par la technique de râteau et laisser un témoin positif à partir du puits trouble (08) afin d'observer l'effet bactéricide puis incuber les boîtes dans l'étuve à 37°C pendant 24h (**Merghni et al., 2018**) ; (**Ben Abdallah et al., 2020**).

## ❖ Lecture

Après incubation le nombre des colonies apparu sur chacune des boîtes est compté et comparées avec le nombre des colonies observées sur les boîtes témoins positifs.

Les valeurs CMB et CMI permettent de caractériser le type d'activité d'un biocide donné :

- CMB = CMI (activité bactéricide)
- CMB > CMI (activité bactériostatique)

### I.2.5 Evaluation de la formation de biofilm *in vitro*

Cette partie est consacrée à évaluer le potentiel de formation du biofilm par méthodes quantitatives et qualitatives de la formation du biofilm.

#### ✚ Méthode tube (TM)

C'est une technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm

#### ❖ Technique

A partir d'une boîte de culture 18-24 heures, ensemencer une colonie dans 1 ml de BHIB supplémenté de 0.5ml de glucose puis incubé à 37°C pendant 48 h. Les tubes ont été vidés et remplis avec les concentrations des biocides qui correspondent à la CMI de chaque souche bactérienne pendant 20min, ensuite les tubes ont été lavés avec du tampon TBS (pH=7,4) puis séchés.

Chaque tube a été ensuite coloré par le cristal violet, pendant 15 minutes. L'excès de colorant a été enlevé et les tubes ont été lavés avec de l'eau distillée, puis séchés en position renversée.

### ❖ Lecture

La formation du biofilm est considérée comme positive quand un film visible double et recouvre le mur et le bas du tube. La formation d'un anneau à l'interface liquide n'est pas indicative de la formation du biofilm. La lecture quantitative de la formation du biofilm est notée dans le tableau suivant :

**Tableau VII : Lecture quantitative de formation de biofilm**

0	Absent de biofilms
+	biofilm modéré
+++	Biofilm fort

(Stepanovic *et al.*, 2000).

### ✚ Méthode du Rouge Congo Agar

La capacité des bactéries à produire un «slime», un polysaccharide formant une couche diffuse facilement détachable de la paroi bactérienne est testée sur milieu solide au Rouge Congo (Mariana *et al.*, 2009). Le colorant rouge congo interagit directement avec ces polysaccharides bactériens et donnent des colonies noires sur ce milieu. Nous avons suivi les étapes suivantes :

- A partir d'une souche pure, une suspension bactérienne a été préparée de 0.5Mc
- Un ensemencement est réalisé sur gélose rouge Congo à l'aide d'une pipette Pasteur stérile
- Les boîtes de pétri sont par la suite incubées à 37°C pendant 24 heures.

### ❖ Lecture

- Colonie noire avec un anneau clair au centre : bactéries possédant une forte production de slime (présence de biofilm)
- Colonies rouges : bactéries non productrices de slime (absence de biofilm).

### ✚ Méthode de concentration minimale d'éradication de biofilm sur microplaque (MBEC)

Ce test de *concentration minimum d'éradication de biofilm (MBEC)* permet de quantifier l'habilité de molécules antimicrobiennes à détruire un biofilm qui se forment sur des surfaces abiotiques, nous avons suivi le protocole décrit par **YuOkae et al., (2022)**.

#### ❖ Enrichissement

L'enrichissement des souches bactériennes est réalisé en mettant une colonie pure et jeune dans des tubes contenant 1ml de BHIB + 0.5ml de glucose et incubé pendant 24h à 37°C.

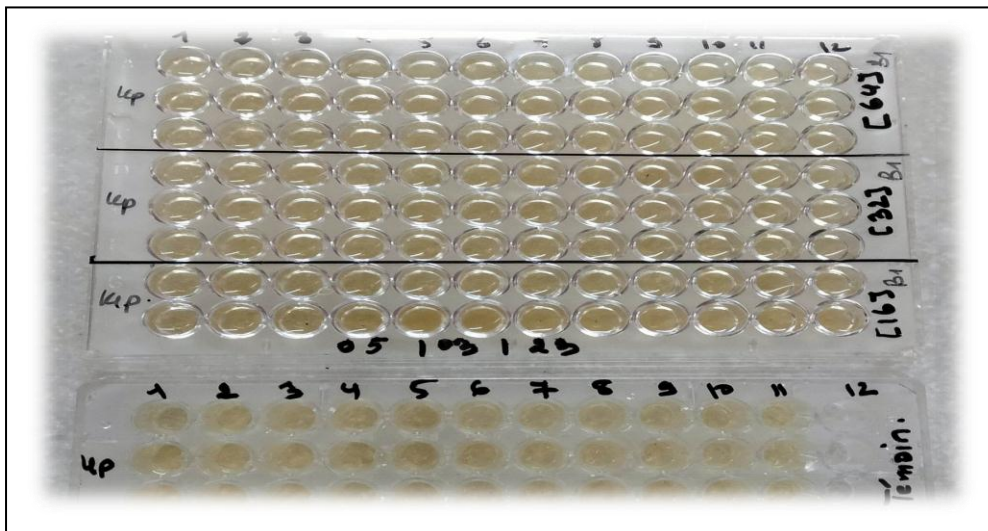
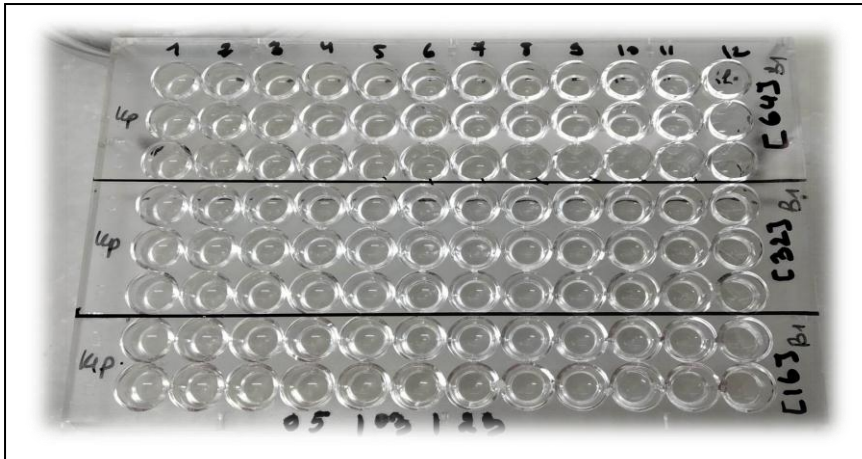


Figure 07 : Puits de microplaques (photo originale)



**Figure 08:**Microplaque après l'ajout des trois concentrations de biocides (photo originale).

- ❖ Coloration par le cristal violet
- ❖ Lecture

La classification des résultats obtenus est basée sur la densité optique (DO) du témoin positif selon **Christensen *et al.*, (1985)**, les souches ont été classées comme suit :

$DO \leq DO(\text{Témoin})$  : non formatrice du biofilm.

- ✚ Calcul de la concentration minimale d'éradication de biofilm

# *Résultats et discussion*

## II. RESULTATS ET DISCUSSION

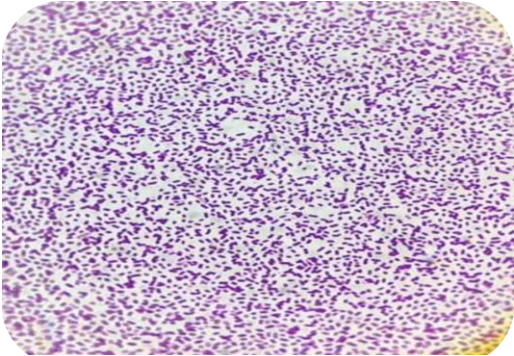
Les principaux résultats sont présentés dans cette partie.

### II.1 Résultats de l'identification




Après isolement et purification des souches bactériennes sur les différents milieux utilisés, les isolats bactériens ont montré divers aspects culturaux, permettant de suspecter leur appartenance à un groupe bactérien ou à un autre *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* ou autre groupe bactérien.

L'aspect des colonies, l'observation microscopique, les caractères enzymatiques et biochimiques sont résumés dans les tableaux VIII, IX, X.




**Tableau VIII : Résultats de l'identification de la souche 1**

Aspect macroscopique	Gélose Nutritive	Gélose Hektoen	Gélose Mac Conkey
Aspect microscopique	 <p>Des bacilles de longueur variable colorés en rose (Gram -) (GX100)</p>		

## Résultats et discussion

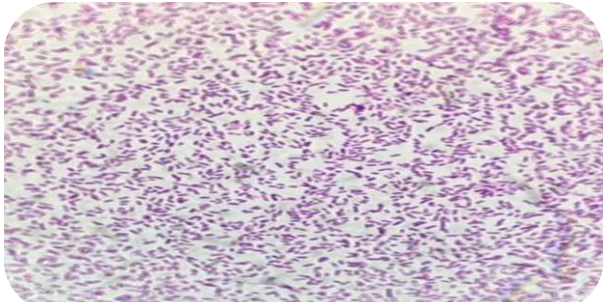



<p><b>Test d'orientation</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>Oxydase</b></p>  <p style="text-align: center;">Réaction négative (absence de coloration au-delà de 60 secondes.)</p>	<p style="text-align: center;"><b>Catalase</b></p>  <p style="text-align: center;">Réaction négative (absence de la formation des bulles)</p>																																																					
<p><b>Test biochimiques</b></p>	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>Test</th> <th>ONPG</th> <th>ADH</th> <th>LDC</th> <th>ODC</th> <th>CIT</th> <th>H<sub>2</sub>S</th> <th>URE</th> <th>TDA</th> <th>IND</th> <th>VP</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Résultat</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>+</td> </tr> <tr> <th>Test</th> <th>GEL</th> <th>GLU</th> <th>MAN</th> <th>INO</th> <th>SOR</th> <th>RHA</th> <th>SAC</th> <th>MEL</th> <th>AMY</th> <th>ARA</th> </tr> <tr> <td>Résultat</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table> 											Test	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	Résultat	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	Test	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	Résultat	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Test	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP																																													
Résultat	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+																																													
Test	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA																																													
Résultat	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																													

**Tableau IX : Résultat de l'identification de la souche 2**

<p><b>Aspect macroscopique</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>Gélose Nutritive</b></p>  <p style="text-align: center;">Colonie rond, légèrement plat avec des bords irréguliers</p>	<p style="text-align: center;"><b>Gélose Hektoen</b></p>  <p style="text-align: center;">Colonie de couleur saumon, elles sont rond irisées</p>	<p style="text-align: center;"><b>Gélose Mac Conkey</b></p>  <p style="text-align: center;">Colonies sont rosée (fermentation de lactose) légèrement bombées</p>
------------------------------------	--	---	---

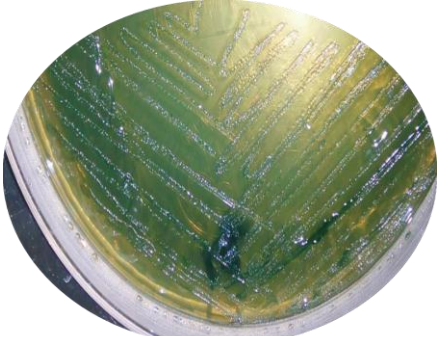

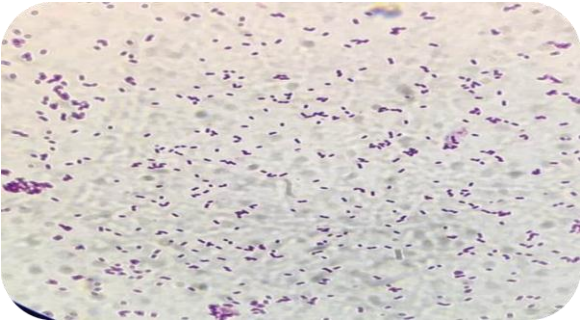




## Résultats et discussion

<p><b>Aspect microscopique</b></p>	 <p>Des bacilles colorés en rose (Gram -) (GX100)</p>																																																					
<p><b>Test d'orientation</b></p>	<p><b>Oxydase</b></p>  <p>Réaction négative (absence de coloration au-delà de 60 secondes.)</p>	<p><b>Catalase</b></p>  <p>Réaction négative (absence de la formation des bulles)</p>																																																				
<p><b>Test biochimiques</b></p>	<table border="1" data-bbox="336 1160 1525 1384"> <thead> <tr> <th>Test</th> <th>ONPG</th> <th>ADH</th> <th>LDC</th> <th>ODC</th> <th>CIT</th> <th>H<sub>2</sub>S</th> <th>URE</th> <th>TDA</th> <th>IND</th> <th>VP</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Résultat</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>+</td> </tr> <tr> <th>Test</th> <th>GEL</th> <th>GLU</th> <th>MAN</th> <th>INO</th> <th>SOR</th> <th>RHA</th> <th>SAC</th> <th>MEL</th> <th>AMY</th> <th>ARA</th> </tr> <tr> <td>Résultat</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table> 										Test	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	Résultat	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	Test	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	Résultat	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+
Test	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP																																												
Résultat	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+																																												
Test	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA																																												
Résultat	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+																																												

# Résultats et discussion

**Tableau X : Résultat de l'identification de la souche 3**

<p><b>Aspect macroscopique</b></p>	<p><b>Gélose Hektoen</b></p>  <p>Colonies petites vertes, convexes à bord régulière translucides d'une odeur désagréable</p>	<p><b>Gélose au sang cuit</b></p>  <p>Colonies blanchâtres bombées muqueuses</p>																																																				
<p><b>Aspect microscopique</b></p>	 <p>Des bacilles ainsi que des coccobacilles colorés en rose (Gram -) (<b>GX100</b>)</p>																																																					
<p><b>Test d'orientation</b></p>	<p><b>Oxydase</b></p>  <p>Réaction négative (absence de coloration au-delà de 60 secondes.)</p>	<p><b>Catalase</b></p>  <p>Réaction positive (la formation de bulles)</p>																																																				
<p><b>Test biochimiques</b></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Test</th> <th>ONPG</th> <th>ADH</th> <th>LDC</th> <th>ODC</th> <th>CIT</th> <th>H<sub>2</sub>S</th> <th>URE</th> <th>TDA</th> <th>IND</th> <th>VP</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Résultat</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <th>Test</th> <th>GEL</th> <th>GLU</th> <th>MAN</th> <th>INO</th> <th>SOR</th> <th>RHA</th> <th>SAC</th> <th>MEL</th> <th>AMY</th> <th>ARA</th> </tr> <tr> <td>Résultat</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table>										Test	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	Résultat	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Test	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	Résultat	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
Test	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP																																												
Résultat	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-																																												
Test	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA																																												
Résultat	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+																																												

## Résultats et discussion



Selon les caractères macroscopiques et l'identification biochimique, nous avons conclu que :

- ✓ Souche 1 : *Klebsiella pneumoniae* (*K.p*) (n=11)
- ✓ Souche 2 : *Enterobacter cloacae* (*E.c*) (n=7)
- ✓ Souche 3 : *Acinetobacter baumannii* (*A.ba*) (n=7)

Dans cette étude, notre choix s'est portée sur les entérobactéries comme *Klebsiella pneumoniae* (*k. pneumoniae*), *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) et de *Acinetobacter baumannii* dus à leur fréquente présence sur les différents instruments et surfaces les plus proches du patient. Ces bactéries sont souvent impliquées dans la survenue de différentes infections nosocomiales.

**Baba-Ahmed et Arlet, (2012)** ont également identifié des souches d'*E.coli*, *K. Pneumoniae* et *Enterobacter cloacae* sur les surfaces du CHU de Tlemcen. La souche *A.baumannii* est essentiellement rencontrée aux services de réanimation. Cette bactérie possède une forte capacité à persister et à échapper aux actions de la désinfection dans l'environnement pendant une longue période et sa présence dans le milieu hospitaliers est souvent liée à des épidémies (**Thom et al., 2011 ; Poirel et Nordmann, 2006**).

### II.2 Résultats de l'antibiogramme

Les résultats de la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques testés selon les diamètres critiques de chaque antibiotique sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau XI : Résultats de l'antibiogramme**

Antibiotiques	<i>K. p</i> (n=11)	<i>E.c</i> (n=7)	Antibiotiques	<i>A. ba</i> (n=7)
Ampicilline	R	R	Ticarcilline	R
Amoxicilline + Acide clavulanique	R	R	Ticarcilline + Acide clavulanique	R
Céfazoline	R	R	Pipéracilline	R
Céfoxline	R	R	Pipéracilline + tazobactam	R
Céfotaxine	R	R	Ceftazidime	R

## Résultats et discussion

Imipénème	S	S	Imipénème	R
Méropénème	S	S	Méropénème	R
Amikacine	R	R	Amikacine	R
Gentamicine	R	R	Gentamicine	R
Acide nalidixique	R	S	Tobramycine	R
Ciprofloxacine	R	S	Ciprofloxacine	R
Fosfomycine	R	R	Lévofloxacine	R
Triméthopriime + Sulfaméthoxazole	R	R		

Selon les résultats de l'antibiogramme présenté dans le tableau XI, les souches de *K. pneumoniae* ont montré une sensibilité à deux antibiotiques (Imipénème et méropénème). Sur les 14 antibiotiques utilisés pour *Enterobacter cloacae*, nous avons obtenu presque le même profil de résistance avec une sensibilité à quatre antibiotiques (Imipénème, méropénème, Acide nalidixique et Ciprofloxacine).

Par contre, *A. baumannii* a montré une multi résistance vis-à-vis de toutes les familles d'antibiotiques testés.

**Lemmen et al., (2004)** ont défini la multi résistance des BGN comme la résistance due à au moins trois des classes d'antibiotiques suivantes : pénicillines, céphalosporines de troisième génération, carbapénèmes, quinolones et aminoglycosides. Cependant selon **Brun-Buisson(2005)**, la majorité des souches résistantes sont isolées de service de réanimation. Ceci est lié à la grande fréquence de prescription d'antibiotique pour traiter des infections hospitalières motivant le transfert en réanimation.

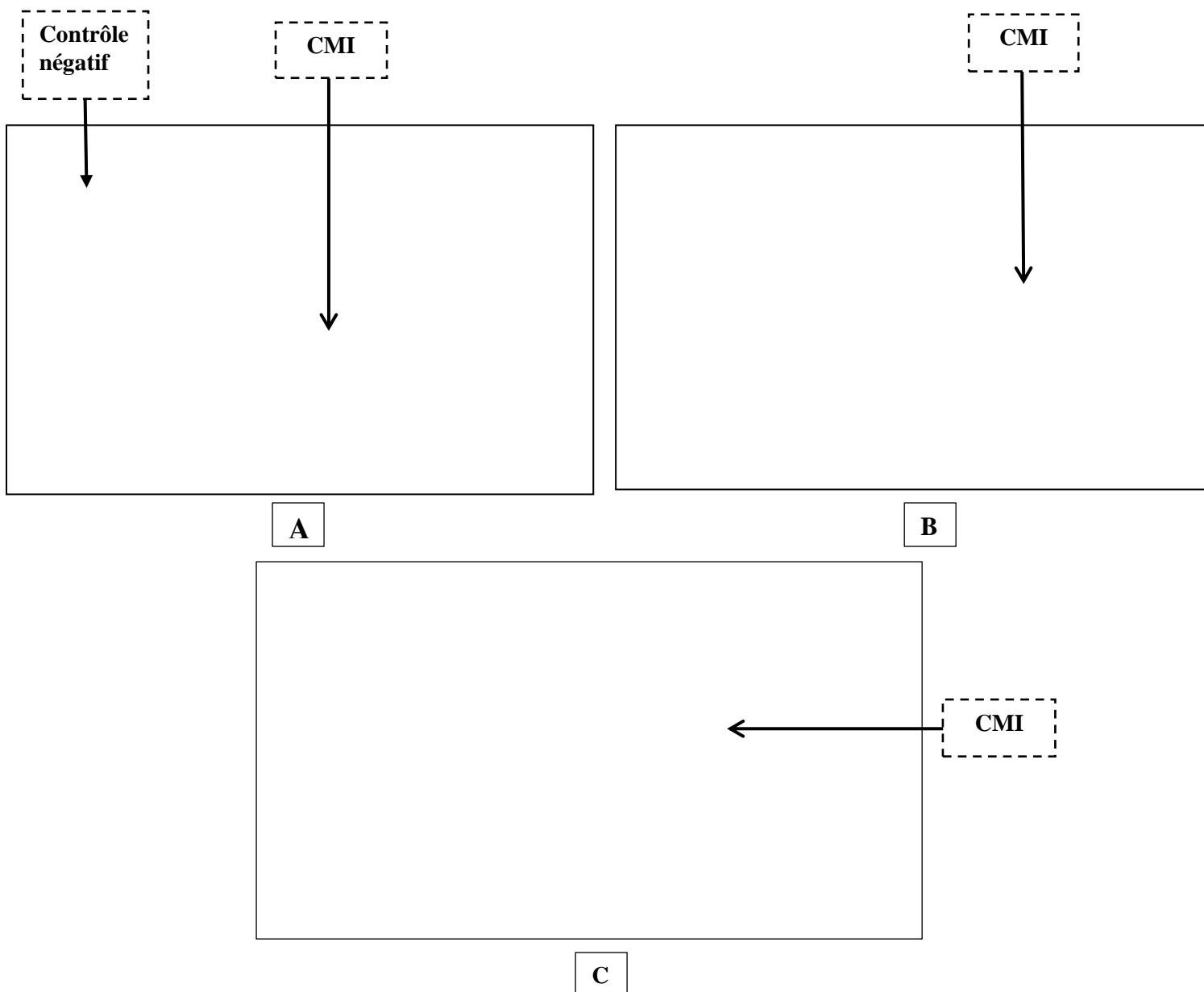
### II.3 Résultats de l'évaluation de l'efficacité antibactérienne des biocides

Trois biocides (Chlorure de didécyltriméthylammonium (DDAC), chlorhexidine (CHX), glutaraldéhyde (GLU) les plus utilisés dans le milieu hospitalier ont servi pour modèle dans cette partie expérimentale.

## II.3.1 Ammoniums quaternaires

### ✚ Détermination des concentrations minimales inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice CMI diffère selon l'espèce bactérienne et le biocide testé (Figure 10). Les résultats sont classés selon les biocides testés respectivement pour chaque souche bactérienne isolée (Tableaux **XII**, **XIII**, **XIV**).



**Figure 10** : Détermination des concentrations minimales inhibitrice d'ammonium quaternaire sur les trois souches bactériennes testées (photos originale)

**A**: CMI de *k. pneumoniae* ; **B**: CMI de *Enterobacter cloacae*; **C**: CMI de *A. baumannii*

## Résultats et discussion

**Tableau XII :** Résultats des concentrations minimales inhibitrices d'ammoniums quaternaires sur les souches de *k. pneumoniae*

Souche <i>k. pneumoniae</i>	<i>K.p1</i>	<i>K.p2</i>	<i>K.p3</i>	<i>K.p4</i>	<i>K.p5</i>	<i>K.p6</i>	<i>K.p7</i>	<i>K.p8</i>	<i>K.p9</i>	<i>K.p10</i>	<i>K.p11</i>
CMI (mg/l)											

**Tableau XIII :** Résultats des concentrations minimales inhibitrices d'ammoniums quaternaires sur les souches d'*Enterobacter cloacae*

Souche <i>E cloacea</i>	<i>E.c1</i>	<i>E.c2</i>	<i>E.c3</i>	<i>E.c4</i>	<i>E.c5</i>	<i>E.c6</i>	<i>E.c7</i>
CMI (mg/l)							

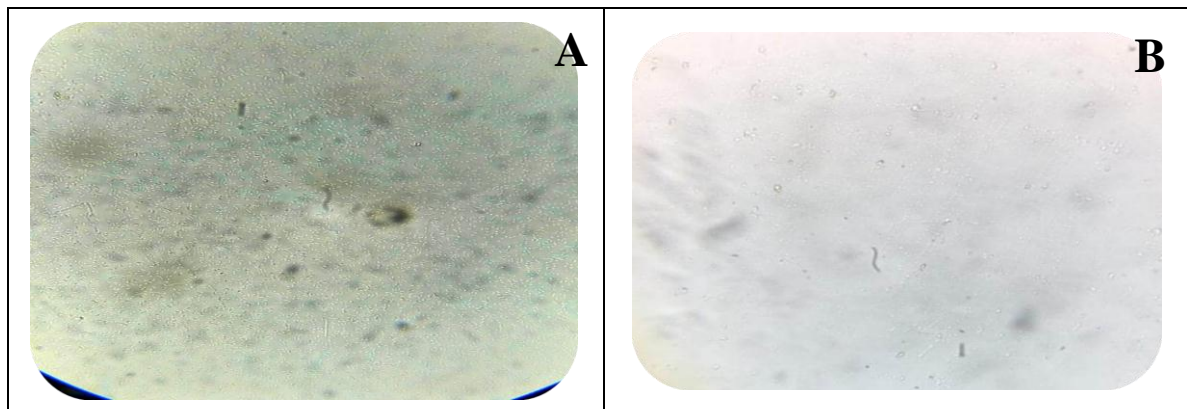
**Tableau XIV :** Résultat des concentrations minimales inhibitrices d'ammoniums quaternaires sur les souches d'*A. baumannii*

Souche <i>A. baumannii</i>	<i>A.ba1</i>	<i>A.ba2</i>	<i>A.ba4</i>	<i>A.ba7</i>	<i>A.ba8</i>	<i>A.ba11</i>	<i>A.ba12</i>
CMI (mg/l)							

### Observation de l'état frais

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 11. D'après l'examen microscopique réalisé, on note la présence de nombreux bacilles mobiles et d'autre immobiles à la concentration 08 des différentes souches bactériennes.

Par contre à la concentration qui correspond à la CMI, aucun bacille n'a pas été signalé.

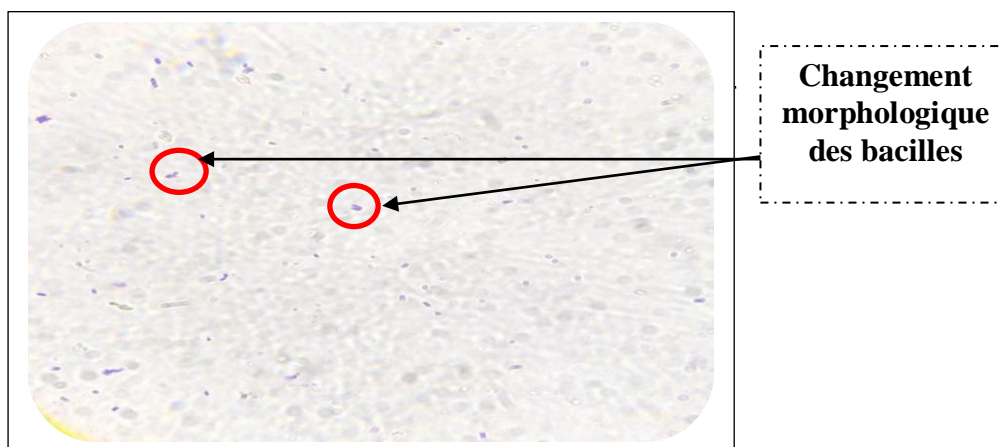


**Figure 11:** Observation microscopique (état frais) après le test CMI d'ammoniums quaternaires (x40) (photos originales)

A : Présence de nombreux bacilles à [8] ; B : Absence des bacilles à [CMI]

### ✚ Observation microscopique après traitement par biocide

Pour voir l'effet antimicrobien des biocides sur les cellules bactériennes, une coloration de Gram a été réalisée, les résultats obtenus sont représentés dans la **figure 12**:



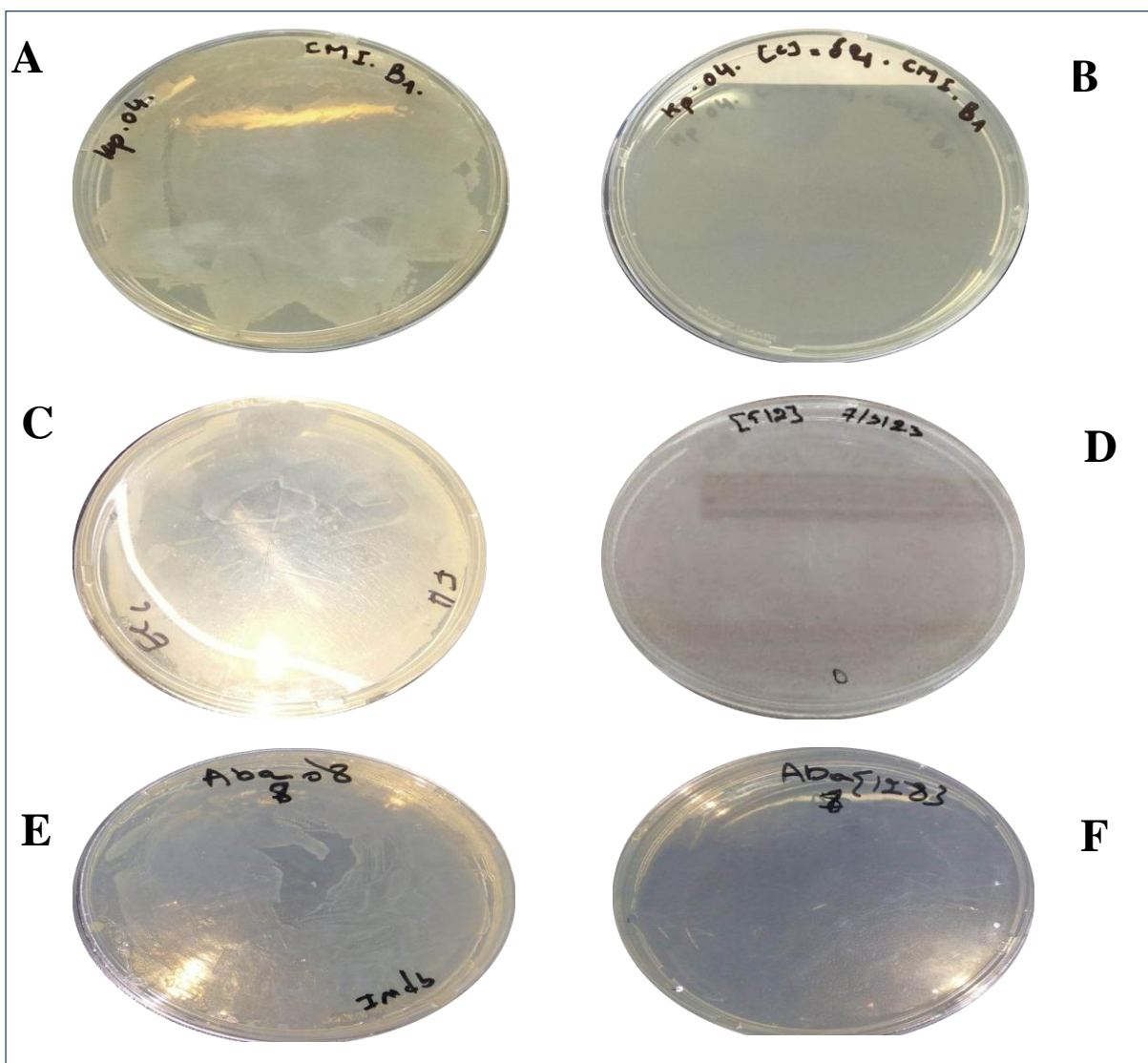
**Figure 12:** Coloration de Gram après contact avec le biocide (X100) (photo originale)

La figure ci-dessus, montre une altération des bacilles après contact avec le biocide.

### ✚ Détermination des concentrations minimales bactéricide CMB

Les dilutions correspondantes aux concentrations minimales bactéricides d'ammonium quaternaire sont différentes selon les souches bactériennes testées. Les résultats ont montré que les souches de *K. pneumoniae* sont tuées à une concentration de 64 mg/l alors que *A. baumannii*, la CMB était à 256mg/l et pour *E. cloacae*, la CMB a atteint une concentration de 512 mg/l.

Les résultats obtenus concernent la concentration minimale bactéricide d'ammonium quaternaire et sont représentés par les figures 13 et 14.

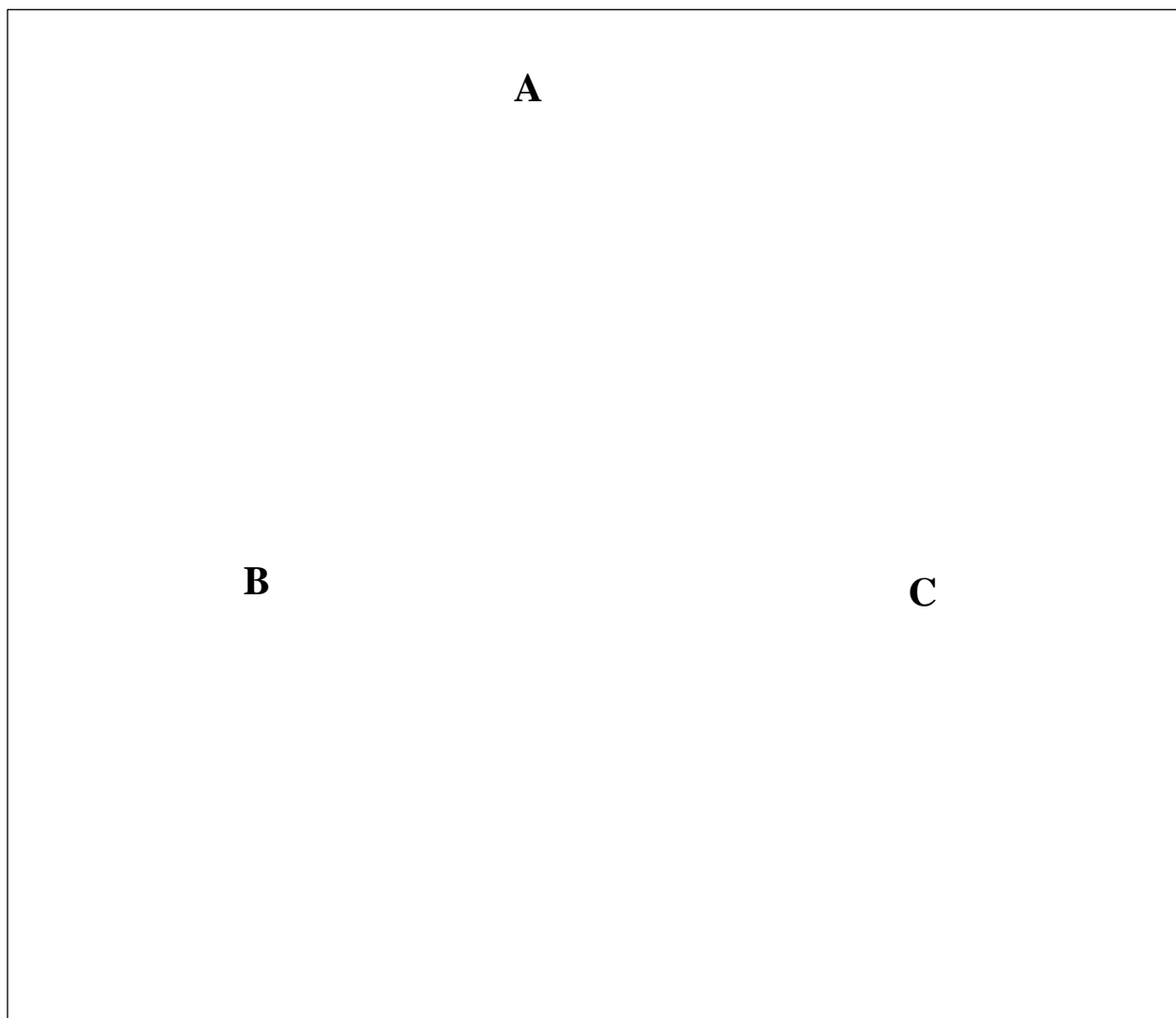


**Figure 13:** Détermination de la CMB d’ammonium quaternaire observée chez les trois souches étudiées. (Photos originales)

**A :** *k. pneumoniae* à [8] ; **B :** *k. pneumoniae* à [64] ; **C :** *E cloacae* à [8] ; **D :** *E cloacae* à [512] ; **E :** *A. baumannii* à [8] ; **F :** *A. baumannii* à [128]

La figure ci-après récapitule les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides respectives d’ammonium quaternaire utilisé dans cette étude. D’après les graphes de la figure 14, il s’est avéré que ce biocide est plus actif sur *k. pneumoniae*.





**Figure 14:** Représentation graphique récapitulatif de la détermination de la CMI et CMB pour l'ammonium quaternaire

**A :** CMI et CMB chez *k. pneumoniae* ; **B :** CMI et CMB chez *Enterobacter cloacae*; **C :** CMI et CMB chez *A. baumannii*

La plus faible concentration minimale inhibitrice et bactéricide est observée chez la souche *k. pneumoniae*. Tandis que la plus forte concentration minimale inhibitrice et bactéricide est notée chez *Enterobacter cloacae*.

Les résultats montrent que, l'ammonium quaternaire (AQ) possède un effet variable sur les différentes souches bactériennes testées. On constate que les CMI étaient faibles pour la majorité des souches de *k. pneumoniae*, comparant aux CMI d'*Enterobacter cloacae* et *A. baumannii*.

## Résultats et discussion

L'Ammoniums quaternaires a un effet plus actif sur *K. pneumoniae* alors que son activité antimicrobienne a réduit les souches *E. cloacae* et *A. baumannii*

D'après **Lijia et al., (2022)**, les valeurs des CMI d'(AQ) vis-à-vis d'une souche d'entérobactéries étaient entre 16-256 mg/l et sont comparables aux résultats de la CMI qui sont plus élevés et varient entre ..... mg/l. La différence dans les résultats obtenus, peut être due à la résistance de certaines espèces bactériennes aux désinfectants.

Il s'est avéré que la diminution de sensibilité aux (AQ) se traduit de façon différente telle qu'une hyperproduction de pompes à efflux, ou une perméabilité diminuée de la membrane (modification des lipopolysaccharides, des phospholipides ou des protéines de la membrane) (**Hegstad et al., 2009**).

Ainsi (AQ) s'avère être plus actif sur *k. pneumoniae*, où les CMB sont égales aux CMI (à l'exception de la souche k.p7), cela veut dire que ce biocide a une activité bactéricide tandis qu'une activité bactériostatique sur la majorité des souches d'*E. cloacae* et d'*A. baumannii* où les CMB sont supérieures aux CMI.

En effet, selon **Russell (2000)**, les désinfectants à base (AQ) sont fréquemment utilisés dans les hôpitaux pour désinfecter et empêcher la propagation des agents pathogènes et cela suggère que l'utilisation extensive de l'ammonium quaternaire pourrait générer une pression sélective et contribuer à l'apparition de microorganismes résistants à la désinfection.

**Bridier et al. (2011)** montre que cette résistance est due d'une façon directe ou indirecte à l'architecture de la paroi bactérienne et sa résistance à l'action des antimicrobiens. En outre, d'après **Russell (1991)**, les différences de composition de l'enveloppe bactérienne entre bactéries à Gram positif et à Gram négatif mais également au sein d'une même espèce bactérienne entraînant une sensibilité variable des micro-organismes aux agents désinfectants.

Selon **Reverdy (1995)**, les ammoniums quaternaires sont généralement plus efficaces sur les Gram positif que les Gram négatif.

## II.3.2 Chlorhexidine

Les principaux résultats obtenus concernant la concentration minimale inhibitrice du Chlorhexidine (CHX) sont représentés dans les tableaux (XV, XVI, XVII) et les figures (15(voir annexes) ,16 ,17) :

**Tableau XV :** Résultat des concentrations minimales inhibitrices de chlorhexidine sur les souches *K. pneumoniae*

Souche <i>k. pneumoniae</i>	<i>K.p1</i>	<i>K.p2</i>	<i>K.p3</i>	<i>K.p4</i>	<i>K.p5</i>	<i>K.p6</i>	<i>K.p7</i>	<i>K.p8</i>	<i>K.p9</i>	<i>K.p10</i>	<i>K.p11</i>
CMI (mg/l)											

**Tableau XVI :** Résultat des concentrations minimales inhibitrices de chlorhexidine sur les souches *Enterobacter cloacae*

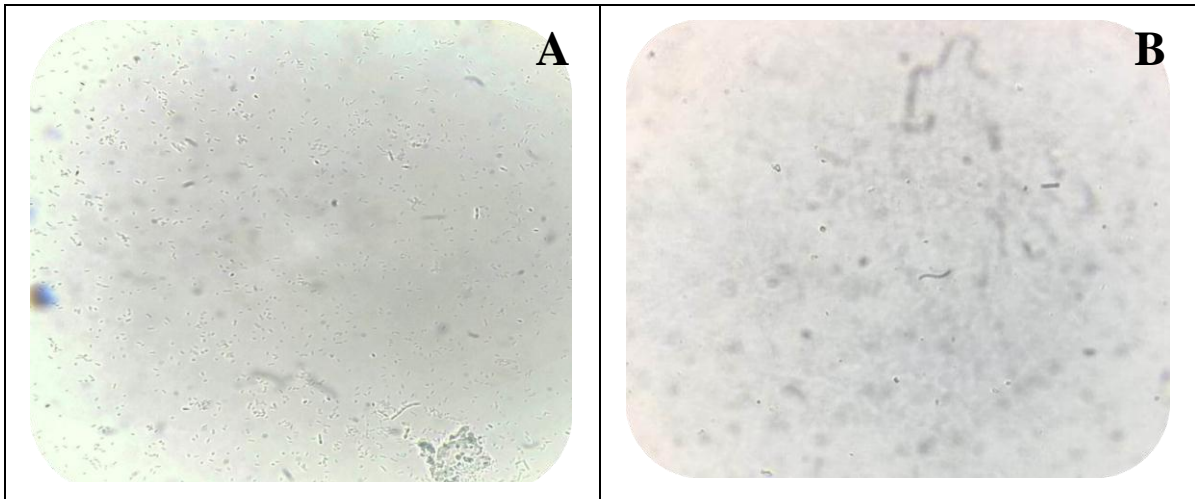
Souche <i>E cloacea</i>	<i>E.c1</i>	<i>E.c2</i>	<i>E.c3</i>	<i>E.c4</i>	<i>E.c5</i>	<i>E.c6</i>	<i>E.c7</i>
CMI (mg/l)							

**Tableau XVII :** Résultat des concentrations minimales inhibitrices de chlorhexidine sur les souches *A. baumannii*

Souche <i>A. baumannii</i>	<i>A.ba1</i>	<i>A.ba2</i>	<i>A.ba4</i>	<i>A.ba7</i>	<i>A.ba8</i>	<i>A.ba11</i>	<i>A.ba12</i>
CMI (mg/l)							

### Résultat de l'état frais

L'examen microscopique après lecture de la CMI du Chlorhexidine sur la souche de *A. Baumannii* à concentration 8 et à concentration qui correspond à la CMI ou aucun bacille n'a été détecté (figure 16).



**Figure 16:** Observation microscopique (état frais) après le test CMI du chlorhexidine (x40)  
(photos originales)

**A :** Nombreux bacille de '*A. Baumannii* [8] ; **B :** Aucune bactérie n'a été signalée [CMI]

### ✚ Détermination des concentrations minimales bactéricide

D'après les résultats obtenus, la concentration minimale bactéricide de chlorhexidine sur les souches *k. pneumoniae* et *A .baumannii* ( mg/l) était supérieure à celle de *E. cloacae* ( mg/l).

La figure 17 résume les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides respectives de chlorhexidine utilisé dans cette étude. Ce biocide s'avère plus actif sur *E. cloacae*.

**A**

**B**

**C**

**Figure 17:** Représentation graphique récapitulatif de la détermination de la CMI et CMB pour le chlorhexidine.

**A :** CMI et CMB chez *k. pneumoniae* ; **B :** CMI et CMB chez *E cloacae* ; **C :** CMI et CMB chez *A. baumannii*

Le deuxième agent antimicrobien testé appartient à la famille des biguanides, c'est également un agent désinfectant qui agit sur la membrane bactériennes (**McDonnel et Russell, 1999**). D'après les résultats ci-dessus, les valeurs des CMI sont comprises entre mg/l pour les trois souches bactériennes testées. On note que les CMI des souches d'*A.baumannii* étaient plus élevées par rapport aux CMI d'autres souches bactériennes testées.

Les valeurs trouvées dans notre étude semblent être inférieures à ceux signalées par **Lijia et al., (2022)** qui ont trouvé que la CMI de (CHX) avec une souche de référence ATCC de *k. pneumoniae* était égale à 1024mg/l.

Ainsi, le rapport CMB/CMI =1 pour toutes les souches d'*E.cloacae* et quelques souches de *A. baumannii*, ce qui explique que la chlorhexidine a un effet bactéricide, alors que toutes les souches de *k. pneumoniae* et quelques souches de *A. baumannii* avaient des valeurs de CMB supérieures à la CMI, ce qui implique que la (CHX) est un bactériostatique contre ces souches.

Selon ces résultats, ce désinfectant montre un effet marqué sur les différentes souches bactériennes. Cette efficacité est probablement due à une altération de la perméabilité de la membrane cellulaire. Il provoque le déplacement de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $\text{Mg}^{2+}$  et la perte de  $\text{K}^{+}$  de la paroi cellulaire à de faibles concentrations, entraînant donc un effet bactériostatique. Par contre à des concentrations élevées, la (CHX) provoque une fuite de tous les principaux composants intracellulaires hors de la cellule, entraînant un effet bactéricide (lyse et mort cellulaire) comme l'ont déjà signalé certains auteurs (**Cieplik et al., 2019 ; Gilbert et Moore, 2005**).

Les résultats obtenus dans cette étude sont semblables à ceux de **Hugo et Russell (1992)** qui montrent que la (CHX) en solution est active sur la majorité des bactéries Gram négatif et positif et les formes végétatives.

Par ailleurs, lorsqu'on compare les valeurs des CMI entre les deux biocides testés précédemment, celles pour la chlorhexidine, se rapprochent à celles de l'ammonium quaternaires. Ce rapprochement, peut être expliqué par la similitude des mécanismes.

Selon **Denyer (1995); Denyer et Stewartb (1998)**, les biguanides ont un mode d'action similaire à celui des ammoniums quaternaires.

## II.3.3 Glutaraldéhyde

### ✚ Détermination des concentrations minimales inhibitrice

Tous les résultats obtenus concernant la concentration minimale inhibitrice de glutaraldéhyde sont représentés dans les tableaux (XVIII, XIX, XX) et les figures suivants :



**Figure 18:** Détermination des concentrations minimales inhibitrice de glutaraldéhyde sur les souches de *k. pneumoniae* (photo originale)

**Tableau XVIII:** Résultat des concentrations minimales inhibitrices de glutaraldéhyde sur les souches *k. pneumoniae*

Souche	<i>K.p1</i>	<i>K.p2</i>	<i>K.p3</i>	<i>K.p4</i>	<i>K.p5</i>	<i>K.p6</i>	<i>K.p7</i>	<i>K.p8</i>	<i>K.p9</i>	<i>K.p10</i>	<i>K.p11</i>
<i>k. pneumoniae</i>											
CMI (mg/l)											

**Tableau XIX :** Résultat des concentrations minimales inhibitrices de glutaraldéhyde sur les souches *E. cloacae*

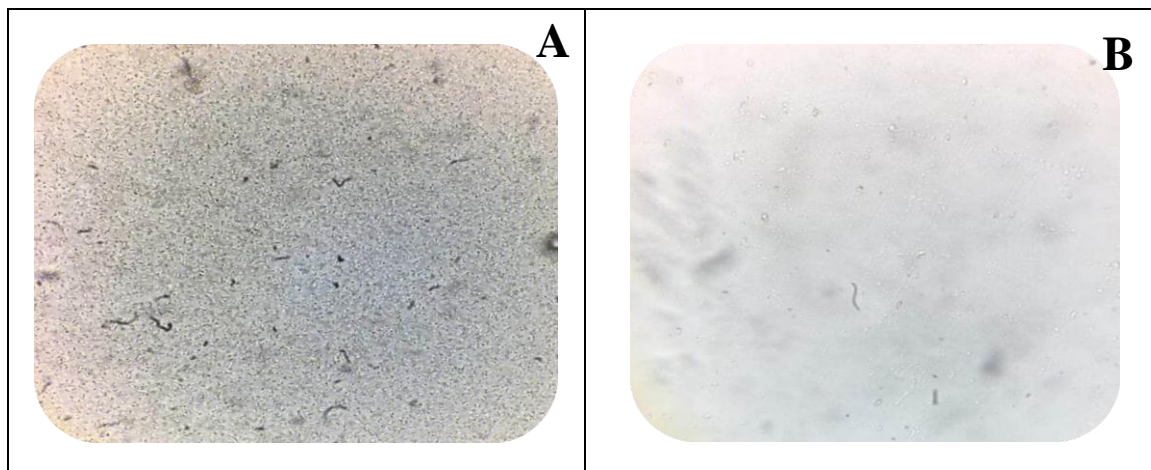
Souche	<i>E.c1</i>	<i>E.c2</i>	<i>E.c3</i>	<i>E.c4</i>	<i>E.c5</i>	<i>E.c6</i>	<i>E.c7</i>
<i>E cloacea</i>							
CMI (mg/l)							

**Tableau XX :** Résultat des concentrations minimales inhibitrices de glutaraldéhyde sur les souches *A. baumannii*

Souche	<i>A.ba1</i>	<i>A.ba2</i>	<i>A.ba4</i>	<i>A.ba7</i>	<i>A.ba8</i>	<i>A.ba11</i>	<i>A.ba12</i>
<i>A. baumannii</i>							
CMI (mg/l)							

### ✚ Résultat de l'état frais

L'examen microscopique après lecture de la CMI du Glutaraldéhyde sur les souches d'*E.cloacae* à concentration 8 et à concentration qui correspond à la CMI pour laquelle aucun bacille n'a été signalé est représenté dans la figure 19.



**Figure 19:** observation microscopique (état frais) après test CMI du Glutaraldéhyde (x40)  
(photos originale)

**A :** Nombreux bacilles d'*E. cloacae* [8] ; **B :** Aucune bactérie n'a été signalée [CMI]

### ✚ Concentration minimale bactéricide

Les résultats de notre étude ont révélé que la CMB de glutaraldéhyde était très élevée chez toutes les souches bactériennes testées et ont atteint une valeur de 1024 mg/l.

La figure ci-après résume les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides respectives de Glutaraldéhyde utilisé dans cette étude. Il s'est avéré que ce biocide est plus actif sur *A.baumannii*.

Le troisième biocide testé est le glutaraldéhyde qui appartient à la famille des aldéhydes. Il est largement utilisé dans les établissements de santé pour leurs propriétés désinfectantes. Il agit principalement en surface et forme des liaisons croisées avec le groupe amino des protéines exposées à la surface bactériennes (**Svetlíkova et al., 2009**).

Les résultats trouvés montrent une augmentation exponentielle des CMI de ce biocide sur les souches bactériennes testés allant jusqu'à mg/l en comparaison avec les CMI trouvées par **Lijia et al., (2022)**. Les valeurs étaient entre mg/l et égales à mg/l pour la souche de référence, cela indique qu'il y a une résistance remarquable à ce biocide.



**A**

**B**

**C**

**Figure 20 :** Représentation graphique récapitulatif de la détermination de la CMI et CMB pour le Glutaraldéhyde.

**A :** CMI et CMB chez *k. pneumoniae* ; **B :** CMI et CMB chez *E cloacae* ; **C :** CMI et CMB chez *A. baumannii*

En effet, les résultats combinent les CMI et les CMB montrent que le Glutaraldéhyde a un effet bactériostatique (% des souches) plus que bactéricide (%) sur les trois espèces bactériennes testées en particulier *A.baumannii*.

**Tsuji et al. (1999)** ont montré que la solution de glutaraldéhyde pouvait éliminer à % de la contamination bactérienne des endoscopes après dix minutes d'exposition. Contrairement à cette étude où la solution désinfectante n'avait pas un grand effet.

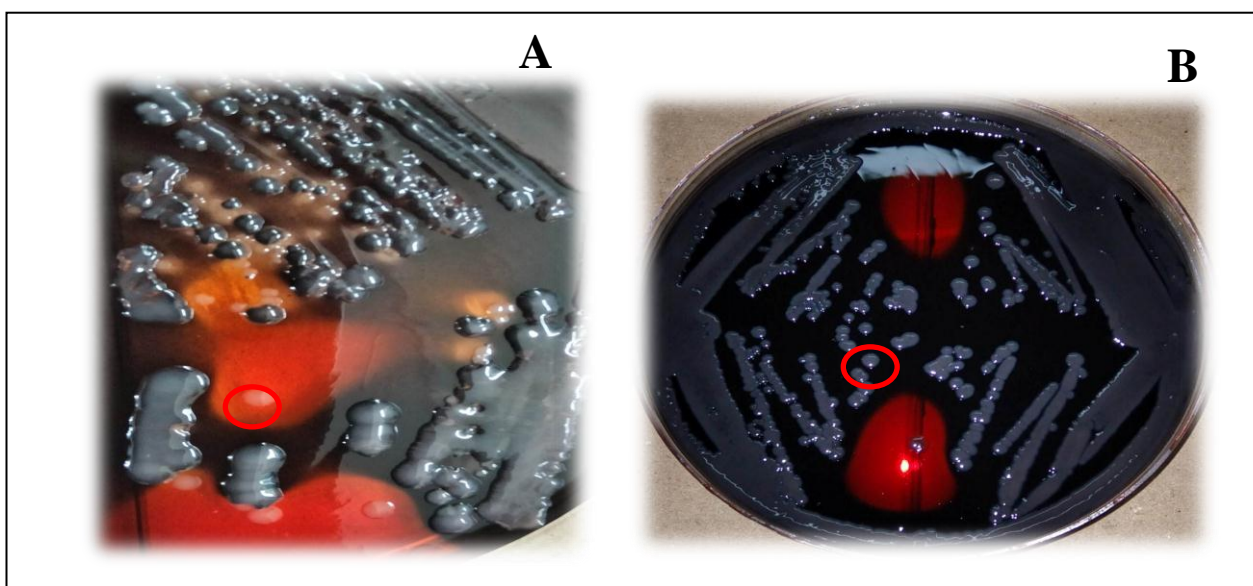
Par ailleurs certaines souches bactériennes sont devenues actuellement résistantes aux antimicrobiens traditionnels suite à l'exposition subséquente aux désinfectants (**Li et al., 2011**).

### II.4 Evaluation de l'efficacité des biocides sur la persistance des bactéries *in vitro*

#### II.4.1 La méthode du Rouge Congo Agar

Les souches isolées ont été testées pour mettre en évidence leur capacité à produire le slime sur milieu rouge Congo.

Les résultats de cette étude ont montré que les souches étudiées sont fortement formatrice de biofilms, présentant des colonies noires avec un cristallin de consistance sèche sur Gélose Rouge Congo. Cet aspect est dû à la production des exo-polysaccharides (EPS) (SLIME) qui réagissent avec le rouge Congo (Figure 21).



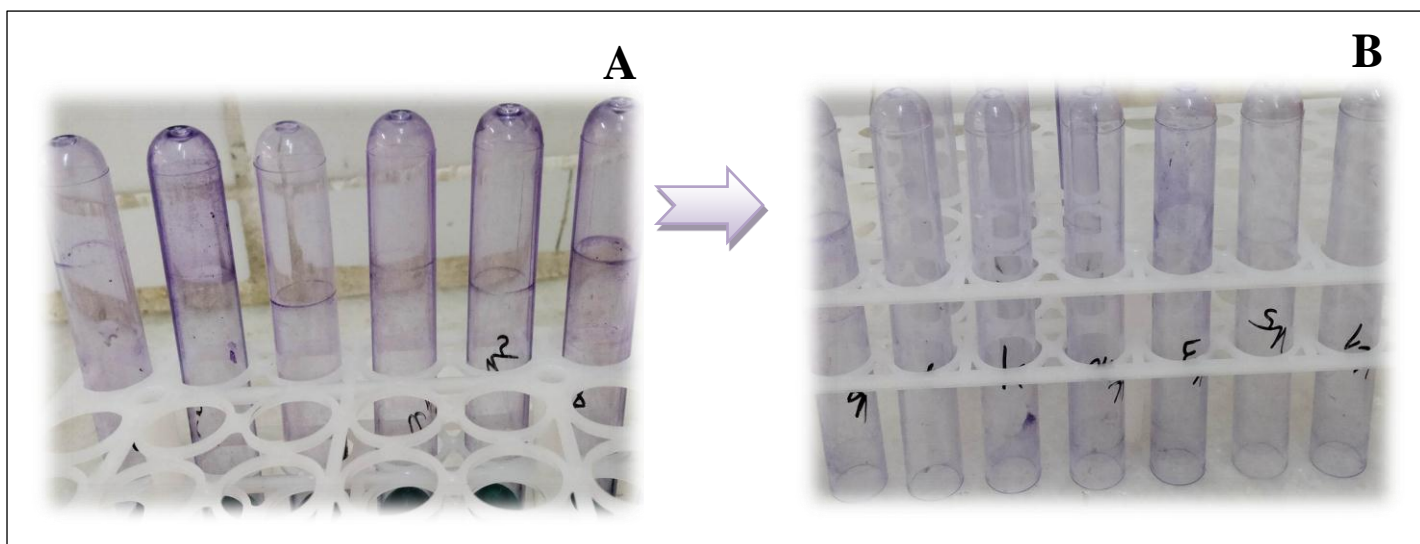
**Figure 21** : Production de slime chez *k. pneumoniae* isolé sur milieu rouge Congo (photos originale)

**A:** Colonies roses *k. pneumoniae* (biofilm-); **B:** Colonies noires *k. pneumoniae* (biofilm+)

Cette technique n'a pas été prise en considération pour voir l'effet de biocide sur les bactéries car selon plusieurs auteurs la méthode de rouge Congo semble être moins fiable pour détecter la formation du biofilm *in vitro*. **Taj et al., (2012)** ont montré que le dépistage par la technique de rouge Congo n'est pas recommandé pour l'étude de la formation de biofilm et que les résultats obtenus par la technique (TM) se sont bien corrélés avec les résultats obtenus par la microscopie électronique.

### II.4.2 La méthode tube (TM)

La méthode TM nous a permis d'évaluer l'efficacité des biocides testés sur les biofilms formés pendant une courte durée après un temps de contact de 20 min. Les résultats sont illustrés dans la figure suivante:



**Figure 22 :** Evaluation d'efficacité de biocide sur le biofilm formé par la méthode TM (photo originale)

**A :** Biofilm avant un contact avec le biocide ; **B :** Biofilm après un contact avec le biocide

Selon la technique (TM) et avant un contact avec le biocide, nous avons remarqué la présence d'un film visible double recouvrant les parois et les fonds des tubes formés par certaines souches qui sont fortement formatrices de biofilm avec certains d'autres qui sont de biofilm modérée, bien que la masse bactérienne est réduite après un contact avec le biocide, cela est dû à une certaine activité antibactérienne de biocide, mais malgré cette activité, les anneaux bactériens formés restent toujours visibles. Cela explique une nette résistance de ces souches bactériennes aux biocides.

Cette résistance pourrait être liée à un temps de contact trop court entre les molécules de biocides et les cellules bactériennes, ainsi qu'à la réactivité des agents antimicrobiens avec les exopolymères bactériens synthétisés suite à l'adhésion bactérienne (samranki *et al.*, 1997).

### **II.4.3 Technique de détermination de la concentration minimale d'éradication de biofilm (MBEC) sur microplaque**

Suivi de cette technique, les biocides étudiés ont été testé pour leur capacité à éradiqué des biofilms bactérienne formé *in vitro*.

Les valeurs des densités optiques (DO) obtenus sont classées dans les tableaux (**XXI, XXII, XXIII**).

## Résultats et discussion

**Tableau XXI :** Détermination de la concentration minimale d'éradication de biofilm (MBEC) après traitement avec les biocides par les souches de *k.pneumoniae*

Souche	Biocide 1		Biocide 2		Biocide 3	
	CMI planctonique	MBEC biofilm	CMI planctonique	MBEC biofilm	CMI planctonique	MBEC biofilm
<i>Kp1</i>	[64]	>[128]	[256]	[256]	[1024]	>[1024]
<i>Kp2</i>	[64]	[64]	[128]	[256]	[512]	[512]
<i>Kp3</i>	[64]	[128]	[128]	[256]	[1024]	[1024]
<i>Kp4</i>	[64]	> [128]	[128]	[256]	[1024]	<[256]
<i>Kp5</i>	[32]	[128]	[128]	[256]	[1024]	[1024]
<i>Kp6</i>	[64]	[64]	[128]	[512]	[512]	[512]
<i>Kp7</i>	< [08]	< [32]	[256]	[256]	[1024]	<[256]
<i>Kp8</i>	[64]	[64]	[128]	[256]	[1024]	[1024]
<i>Kp9</i>	[64]	[128]	[128]	[256]	[1024]	<[256]
<i>Kp10</i>	[64]	[64]	[128]	[256]	[1024]	<[256]
<i>Kp11</i>	[64]	[64]	[128]	[256]	[1024]	[1024]

## Résultats et discussion

**Tableau XXII :** Détermination de la concentration minimale d'éradication de biofilm (MBEC) après traitement avec les biocides par les souches d'*E. cloacae*

Souche	Biocide 1		Biocide 2		Biocide 3	
	CMI	MBEC	CMI	MBEC	CMI	MBEC
	planctonique	biofilm	planctonique	biofilm	planctonique	biofilm
<i>Ec1</i>	[256]	[1024]	[128]	>[256]	[512]	>[1024]
<i>Ec2</i>	[512]	< [256]	[128]	>[256]	[1024]	[512]
<i>Ec3</i>	[256]	<[256]	[128]	>[256]	[512]	[512]
<i>Ec4</i>	[256]	>[1024]	[128]	>[256]	[512]	[512]
<i>Ec5</i>	[256]	[512]	[128]	>[256]	[1024]	[1024]
<i>Ec6</i>	[512]	<[256]	[128]	>[256]	[1024]	[1024]
<i>Ec7</i>	[512]	[512]	[128]	>[256]	[512]	[512]

## Résultats et discussion

**Tableau XXIII :** Détermination de la concentration minimale d'éradication de biofilm (MBEC) après traitement avec les biocides par les souches *A.baumannii*

S <sub>ouche</sub>	Biocide 1		Biocide 2		Biocide 3	
	CMI	MBEC	CMI	MBEC	CMI	MBEC
	planctonique	biofilm	planctonique	biofilm	planctonique	biofilm
<i>Aba 1</i>	[128]	>[1024]	[256]	>[1024]	[512]	>[1024]
<i>Aba 2</i>	[128]	>[1024]	[512]	[1024]	[512]	>[1024]
<i>Aba 4</i>	[128]	[1024]	[512]	[1024]	[512]	>[1024]
<i>Aba 7</i>	[256]	>[1024]	[512]	>[1024]	[512]	>[1024]
<i>Aba 8</i>	[128]	>[1024]	[512]	>[1024]	[512]	>[1024]
<i>Aba11</i>	[256]	>[1024]	[256]	>[1024]	[512]	>[1024]
<i>Aba12</i>	[128]	>[1024]	[256]	>[1024]	[256]	>[1024]

## Résultats et discussion

---



## Résultats et discussion

L'analyse des résultats obtenus pour l'activité antibactérienne des trois biocides a montré que le regroupement des microorganismes sous forme de biofilm s'avère plus particulièrement résistants vis-à-vis de traitements antibactériens, que ce soit des molécules antiseptiques désinfectantes ou antibiotiques comme l'a déjà souligné **Fey (2010)**.

Nous avons remarqué qu'un meilleur produit contre les bactéries en suspension (planctonique) n'est pas forcément le meilleur contre les bactéries structurées en biofilm. En effet, une réduction de l'efficacité est observée. Elle peut s'expliquer par l'impossibilité du biocide à traverser la matrice des bactéries adhérentes. Ainsi **Simoes (2011)** a trouvé que les concentrations antimicrobiennes nécessaires pour inhiber les biofilms bactériens (MBEC) peuvent être 10-1000 fois plus élevées que celles qui sont nécessaires pour inhiber les mêmes bactéries sous forme planctonique (CMI).

L'élimination de la formation du biofilm par les agents antimicrobiens se traduit par une densité optique inférieure à celle de la DO témoin (**Christensen et al., 1985**). Dans certains cas où la DO des souches testées est supérieur aux DO témoin ceci pourrait probablement être expliqué par une protection aux stress extérieurs. Selon **Yannick et al., (2014)**,

L'effet anti-biofilm des biocides a montré des valeurs d'éradication de biofilm différent selon les souches testées. Ainsi les souches de *k.pneumoniae* semblent être toutes de bonnes formatrices de biofilm et hautement adhérentes contrairement aux souches d'*E.cloacae* qui sont modérément formatrice. Ces deux souches nécessitent une valeur MBEC supérieures ou identiques à la CMI pour les trois biocides. Tandis que les souches d'*A.baumannii* étaient modérément formatrices et demandent constamment une valeur MBEC supérieures à [ ] mg/l en comparaison à la CMI d'état libre,..... du désinfectant aux bactéries à l'intérieur du biofilm.

Selon les résultats illustrés par la Figure 24, l'effet anti-biofilm des biocides a montré un taux d'élimination variant. Nous avons remarqué que le taux d'élimination du biofilm augmente après traitement avec (AQ) sur *k .pneumoniae* (%) et *E.cloacae* (%) alors qu'il montre une faible réduction sur *A.baumannii* (%). En ce qui concerne le (CHX), il présente un pourcentage maximum d'éradication de biofilm sur *k .pneumoniae* atteignant (%) et un taux de (%) sur *A.baumannii*. Pour *E.cloacae*, il nous a été impossible de calculer le pourcentage de réduction car les valeurs exactes de MBEC (> []) sont méconnues. En effet un taux de (%) de réduction de biofilm sur *k .pneumoniae* et *A.baumannii* après traitement par le (GLU) a été observé. En revanche, il présente un taux plus élevé (%) sur *E cloacae*.

### Figure 24: Pourcentage de l'éradication du Biofilm

Ces résultats nous permettent de classer les biocides testés en fonction de leur pourcentage de réduction des biofilms préformés du moins efficace au plus efficace. On obtient ainsi la série suivante :

**Glutaraldéhyde < ammoniums quaternaires < chlorhexidine.**

L'explication raisonnable de l'efficacité réduite de ces agents contre les biofilms est la pénétration incomplète dans le biofilm par ces biocides comme l'ont déjà souligné **Huang et al., (1995)**. Ainsi la résistance des bactéries incluses dans le biofilm vis-à-vis des désinfectants est bien connue.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette plus grande résistance: la matrice polymérique qui agit comme une barrière réduisant ou empêchant la diffusion aux agents antimicrobiens, la faible concentration de certains éléments nutritifs et le gradient en oxygène,

certaines cellules du biofilm seront peu actives métaboliquement et pourront même être sous forme dormante. Ces cellules bactériennes dormantes sont d'ailleurs probablement responsables d'une grande partie de la tolérance associée aux biofilms (**Bridier *et al.*, 2011**).

L'exposition répétée à des concentrations du désinfectant peut générer certaines adaptations physiologiques qui repoussent encore plus loin la tolérance ultérieure du biofilm (**Amiyare *et al.*, 2015**).

# *Conclusion*

### CONCLUSION

Cette étude considérée comme préliminaire avait pour but l'évaluation de l'effet antibactérien et antibiofilm de trois biocides : ammonium quaternaire, chlorhexidine et glutaraldéhyde sur des espèces bactériennes *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* et *Acinetobacter baumannii*, les plus fréquemment isolées des infections nosocomiales au niveau de la réanimation.

Elle met en évidence la tolérance des bactéries aux biocides sachant que les nombreuses études ne se sont concentrées que sur la résistance bactérienne aux antibiotiques.

L'antibiogramme a montré que les souches bactériennes isolées sont résistantes ® à la plupart des antibiotiques utilisés selon la standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques.

Le profil de la résistance / sensibilité bactérienne aux biocides réalisé par la méthode de micro-dilution sur microplaque montre que la majorité des souches bactériennes présentent une résistance importante au glutaraldéhyde allant jusqu'à mg/l, Par contre l'ammonium quaternaire présente un effet modéré sur toutes les souches testées, alors qu'une sensibilité importante vis-à-vis de la chlorhexidine a été notée chez toutes les souches testées.

De plus, nous avons remarqué que les trois biocides testés agissent aussi bien sur les entérobactéries que sur les bactéries d'*Acinetobacter baumannii* multirésistantes.

Les résultats obtenus pour les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales d'éradication de biofilm (MBEC), indiquent que les bactéries sous forme de biofilm sont beaucoup plus résistantes aux biocides que la forme planctonique. Il nous paraît clair que l'équilibre bactérien peut être facilement perturbé et peut au contraire favoriser le développement et la résistance de certains germes pathogènes.

Le pourcentage de l'activité des trois biocides contre les biofilms des trois souches testées était le suivant : le glutaraldéhyde ( %), l'ammonium quaternaire ( %) et le chlorhexidine ( %).

Ces résultats traduisent à la fois une possible tolérance de certaines souches testées et une probable inefficacité de ces biocides. Il est donc important que les résistances des biofilms aux agents désinfectants soient prises en compte lors de la planification du processus de nettoyage.

Les résultats de notre étude nous orientent vers des perspectives suivantes :

- ✚ Rechercher les gènes de résistance aux ces agents antimicrobiens,
- ✚ Etudier les mécanismes de la résistance bactérienne aux biocides à l'échelle moléculaire,

Les résultats de cette étude devraient encourager la bonne pratique d'hygiène et une utilisation rationnelle des antimicrobiens afin de prévenir le développement et l'émergence de la résistance dans les services hospitaliers.

*Références  
bibliographiques*

# Référence bibliographique

## (A)

- ✓ **Abdoul-Salam Ouedraogo**, 2016 Prévalence, circulation et caractérisation des bactéries multirésistantes au Burkina Faso. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, Français. NNT :2016MONTT001.
- ✓ **A GORO**, 2021 Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées à Bamako de janvier 2020 à juin 2020. Thèse en pharmacie 2021
- ✓ **Allion A.**, (2004). Environnement des bactéries et sensibilités aux biocides Thèse de doctorat. Ecole doctorale agriculture biologie et santé. 188p.
- ✓ **Amiyare R; Esmail A; Ghanmi Y et Ouhsine M.** (2015). Evaluation de l'effet d'un désinfectant à base de Glutaraldehyde à 2 % sur le biofilm d'*Acinetobacter baumannii*. J Mater EnvironSci 6, 3168-3173.
- ✓ **Ango, P. D., Konan, K. D., Kouamé, K. A., Sai, S. S., Tchimou, A. Y., Adingra, S. C., ... & Boua, N.** (2020). Écologie Microbienne des Surfaces et Dispositifs Médicaux au Service de Réanimation du Centre Hospitalier et Universitaire (CHU) de Treichville. HEALTH SCIENCES AND DISEASE, 21(1).
- ✓ **AVRIL JL., DABERNAT H., DENIS F. et MONTEIL H.** (2000). Bactériologie clinique. Paris : Ellipses, 602p.

## (B)

- ✓ **Baba-Ahmed-kazi-Tani Z., and Arlet G.**, 2014. “actualité de la résistance aux antibiotiqueschez les bacilles à Gram-négatif en Algérie.” Pathologie Biologie 62: 169–78.<https://doi.org/10.1016/j.patbio.2014.01.005>
- ✓ **Barah F.**, 2013. “Non-antibiotic biocides : an updated review,”Formatex 598–607.
- ✓ **Barbusiaux C., Saglio J.F., Chavarot A. et Berer G.** 1993. Arrêté du 15 juin 1993modifiant et complétant l'arrêté du 27 octobre 1975 relatif aux produits de nettoyage du matériel pouvant se trouver en contact avec des denrées alimentaires. Journal Officiel de la République Française, 20 juillet 1993.
- ✓ **Barclay ML, Begg EJ, Chambers ST, Thornley PE, Pattermore PK, Grimwood K.** Adaptive resistance to tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis. J AntimicrobChemother. 1996;37(6):1155- 64.
- ✓ **Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, Murray PR.** Manual of clinical microbiology Graevenitz, AV. *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, and other



## Référence bibliographique

- non-fermentative Gram-negative bacteria. In: Manual of clinical microbiology. Washington DC: American Society for Microbiology; 1995. p. 520–2.
- ✓ **Ben Abdallah, F., Lagha, R., & Gaber, A** (2020). Propriétés d'inhibition et d'éradication du biofilm des huiles essentielles de plantes médicinales contre les isolats de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline Clinical. Produits pharmaceutiques, 13 (11), 369.
  - ✓ **Bilavsky, E., M.J. Schwaber et Y. Carmeli.** « How to stem the tide of carbapenemase producing enterobacteriaceae: proactive versus reactive strategies », Current Opinion in Infectious Diseases, vol. 23, n° 4, août 2010, p. 327-331.
  - ✓ **BOUTARFI Zakaria,** 2021, Étude de la résistance aux antimicrobiens d'une collection de bacilles à Gram négatif isolée du CHU de Tlemcen, thèse de doctorat université de Tlemcen.
  - ✓ **Bouvet, P.J., Joly-Guillou, M.L.,** 2000. Acinetobacter, in: Freney, J., Renaud, F., Hansen, W., Bollet, C. (Eds.), Précis de Bactériologie Clinique. ESKA - Alexandre Lacassagne, Paris, FR, pp. 1239–1258.
  - ✓ **Bridier A., Briandet A., Thomas V., Dubois B., J.,** 2011 Résistance des biofilms bactériens aux désinfectants : un bilan Biofouling. Le Journal de la recherche sur la bioadhésion et le biofilm 27 (2011) 1017-1032. DOI : 10.1080/08927014.2011.626899
  - ✓ **Brun-Buisson C.** (2005) Risques et maîtrise des infections nosocomiales en réanimation : texte d'orientation DRLF/SFAR. Réanimation. 14(6) : 463-471.

(C)

- ✓ **Caselli E., D Accolti M., Soffritti I., Piffanelli M., and Mazzacane S.,** 2018. “Spread of mcr-1–Driven Colistin resistance on hospital surfaces, Italy.” Emerging Infectious Diseases 24 (9) : 1752–53 Doi:10.3201/eid2409.171386.
- ✓ **Cheung, H.-Y., Wong, MM-K., Cheung, S.-H., Liang, LY, Lam, Y.-W. et Chiu, S.-K.** (2012). Actions différentielles de la chlorhexidine sur la paroi cellulaire de *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*. PLoS One 7:e36659. doi: 10.1371/journal.pone.0036659
- ✓ **CHEVRE, N., SUREN. E.,** (2011). Alerte aux micropolluants: pesticides biocides, détergents, médicaments et autres substances chimiques dans l'environnement. Edition universitaire européennes .142p. ISBN : 978-2-88074-938-5 (18.03.2017)

## Référence bibliographique

- ✓ **Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Eachy E.H.** (1985). Adherence of biofilm producing strains of Staphylococci epidermidis to smooth surfaces. *Infection and Immunity*, pp. 318-32.
- ✓ **Cieplik F., Jakubovics NS, Buchalla W., Maisch T., Hellwig E., Al-Ahmad A.,** 2019. Résistance à la chlorhexidine chez les bactéries orales - Y a-t-il lieu de s'inquiéter ? *Frontières en microbiologie*; 10 : 587.
- ✓ Clsi. 2020. "M100-S24 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement an informational supplement for global application developed through the clinical and laboratory standards institute consensus process."

### (D)

- ✓ **Davin-Regli, and Pages J.M.,** 2012. "Cross-resistance between biocides and antimicrobials : an emerging question." *Revue Scientifique et Technique de l'OIE* 31 (1) : 89–104. <http://dx.doi.org/10.20506/rst.31.1.2099>
- ✓ **Debabza M.,** 2015. "Emergence en milieu hospitalier des bacilles gram négatif multirésistants aux antibiotiques : étude bactériologique et moléculaire." these de doctorat université d'Annaba.
- ✓ **Denyer, SP et Stewart, G.** (1998). Mécanismes d'action des désinfectants. *Int. Biodétérioration. Biodegradation* 41, 261–268. doi : 10.1016/S0964-8305(98)00023-7
- ✓ **Denyer S. P.,** 1995. "Mechanisms of action of antibacterial biocides." *International Biodeterioration and Biodegradation* 36 (3–4) : 227–45. [https://doi.org/10.1016/09648305\(96\)00015-7](https://doi.org/10.1016/09648305(96)00015-7)
- ✓ **Doughari, H.J., Ndakidemi, P.A., Human, I.S., Benade, S.,** 2011. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An overview. *Microbes Environ.* 26, 101–112. doi:10.1264/jsme2.ME10179

### (E)

- ✓ **Elisabetta Caselli,** 2017, Hygiène : stratégies microbiennes pour réduire les agents pathogènes et la résistance aux médicaments en milieu clinique <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12755>

## Référence bibliographique

### (F)

- ✓ **Fey, P. D.** (2010). Modality of bacterial growth presents unique targets: how do we treat biofilm mediated infections ? *Curropin Microbiol ,Antimicrobiales /Genomics* 13, 610-615.
- ✓ **FLANDROIS JP.** (1997). *Bactériologie Médicale*. Presses Universitaires de Lyon. 309p.
- ✓ **Fraise A.P.,** 2002. “Biocide abuse and antimicrobial resistance — a cause for concern ?” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2)11–12.  
<https://doi.org/10.1093/jac/49.1.11>

### (G)

- ✓ **Gilbert P., Moore L.,** 2005. Antiseptiques cationiques : diversité d'action sous une épithète commune. *Journal de microbiologie appliquée*; 99 :703–715. doi : 10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x.
- ✓ **Greene C, Vadlamudi G, Newton D, Foxman B, Xi C,** 2016, L'influence de la formation de biofilm et de la résistance multidrogue sur la survie environnementale des isolats cliniques et environnementaux d'*Acinetobacter baumannii*. *Am J Infect Control*. 2016; 44 (5):e65–e71.

### (H)

- ✓ **Hegstad, K., Langsrud, S., Lunestad, B. T., AamdalScheie, A., Sunde, M., Yazdankhah, S. P.,** (2009) Does the Wide Use of Quaternary Ammonium Compounds Enhance the Selection and Spread of Antimicrobial Resistance and Thus Threaten Our Health? *Microbial Drug Resistance* 16 : 91-104.
- ✓ **Hélène Rivière,** 1998, *Acinetobacter baumannii* sensibilité aux antibiotiques des souches isolées au bloc de réanimation respiratoire, thèse de doctorat université de LIMOGIE faculté de science pharmaceutique.
- ✓ **Huang, C.T., Yu, F.P., McFeters, G.A., Stewart, P.S.,** 1995. Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2252–2256.
- ✓ **Hubbard A.T. M., Coates A.R. M., et Harvey R. D.,** 2017. “Comparing the action of HT61 and chlorhexidine on natural and model *Staphylococcus aureus* membranes” *The Journal of Antibiotics* 70 (10): 1020–25. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.90>

## Référence bibliographique

- ✓ **Hugo W.B. and Russell A.D.** 1992. Types of antimicrobial agents. In : Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilisation. A.D. Russell, W.B. Hugo et G.A. Ayliffe, Eds Blackwell Scientific Publications, 7-88.

(J)

- ✓ **Jennings M.C., Minbiole K.P.C. and Wuest W. M.,** 2016. “Quaternary ammonium compounds: an antimicrobial mainstay and platform for innovation to address bacterial resistance.” *ACS Infectious Diseases* 1 (7): 288–303. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00047>
- ✓ **Jones C.G.,** 2000. “Chlorhexidine : Is It Still the Gold Standard ?” *Periodontol* 2000. 15:55-62 Doi: 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00105.x

(K)

- ✓ **KASSAMA M., et HAMADI S.** (2013). Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries isolées à l'établissement hospitalier spécialisé de Constantine. Constantine: Université Constantine 1; 62p.
- ✓ **Kahrs R F.** (1995). Principes généraux de la désinfection. *Revs citech Off int Epiz* 14 (1), 123-142.
- ✓ **Kathuria D., Bankar A. A., and Bharatam P. V.,** 2018. “What’s in a structure?” the story of biguanides.” *Journal of Molecular Structure* 1152: 61–78 <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.08.100>
- ✓ **Kaye K.S., and Pogue J. M.,** 2015. “Infections caused by resistant Gram-Negative bacteria: epidemiology and management.” *Pharmacotherapy* 35 (10): 949–962. <https://doi.org/10.1002/phar.1636>
- ✓ **Knetsch M. L W., et Koole L.H.,** 2011. “New strategies in the development of antimicrobial coatings : the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles.” *Polymers* 3 (1) : 340–66. <https://doi.org/10.3390/polym3010340>

(L)

- ✓ **Lemmen SW, Häfner H, Zolldann D, Stanzel S, Lütticken R.,** 2004 Distribution of multiresistant Gram-negative versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment. *Journal of Hospital Infection*; 56:191-197.

## Référence bibliographique

- ✓ **Iena Ortega Morente, Miguel Angel Fernández-Fuentes, Maria José Grande Burgos, HikmateAbriouel, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez** , 2013, Biocide tolerance in bacteria, *International Journal of Food Microbiology* 162 (2013) 13–25, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.028>
- ✓ **Lijia Ni, Zhixian Zhang 1, RuiShen, Xiaoqiang Liu, Xuexue Li, Baiji Chen, Xiquan Wu, Hongyu Li, XiaoyingXie, et Songyin Huang**, 2022, DisinfectionStrategies for Carbapenem-ResistantKlebsiella pneumoniae in a Healthcare Facility. *Antibioti*, 11, 736.<https://doi.org/10.3390/antibiotics11060736>
- ✓ **Li P., Poon Y. F., Li W., Zhu H. Y., Yeap S. H., Cao Y., Kang E. T.** (2011). A polycationic antimicrobial and biocompatible hydrogel with microbe membrane suctioning ability. *Nature materials*, 10(2), 149-156.

(M)

- ✓ **Maiga Boulkassim**.2003. Pratiques d'hygiène hospitalière dans les structures sanitaires : Hôpital Gabriel Touré, Hôpital Régional de Sikasso, CNOS, Centre de Santé Référence de la Commune IV de Bamako. Pharmacie. Faculté de Médecine de Pharmacie et D'OdontoStomatologie.67p.
- ✓ **Maillard J.Y.**, 2007. “Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment:should it be of genuine concern?” *Journal of Hospital Infection* 65: 60–72.[https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(07\)60018-8](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(07)60018-8)
- ✓ **Maillard J Y.** (2005). Antimicrobial biocides in the healthcare environment: efficacy, usage,policies, andperceivedproblems. *Therapeutics and ClinicalRiskManagementl*, 307- 320.
- ✓ **Maillard J.Y.**, 2002. “Bacterial target sites for biocide action,” *J ApplMicrobiol* 92: 16–27. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.3.x>
- ✓ **Mariana N S, Salman S A, Neela V, Zamberi S.** 2009. Evaluation of modified Congo red agar fordetection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*.*African Journal of Microbiology Resaerch* 3:330-338.
- ✓ **Martin C et Gouin F.** (2000). *infection et antibiothérapie en réanimation et enchirurgie*. 2éditions.Groupe liaisons SA, ISBN:27184.0998.3.
- ✓ **McDonnell G. and Russell A.D.** 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, pp 147-179.

## Référence bibliographique

- ✓ **Merghni, A., Noumia E., Haddeda,c O., Dridia N., Panward H., Ceylane O., Mastouria,c M., et Snoussi M.,** (2018),Assessment of the antibiofilm and antiquorum sensing activities of Eucalyptus globulus essential oil and its main component 1,8-cineole against methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains. MicrobialPathogenesis 118 (2018) 74–80
- ✓ **Merghni, A., Marzouki, H., Hentati, H., Aouni, M., etMastouri, M** (2016). Antibacterial andantibiofilm activities of Laurusnobilis L. essential oil against Staphylococcus aureus strains associated with oral infections. Current Research in Translational Medicine, 64(1), 29-34.
- ✓ **MOGOA, E.,** (2010). Etude du mécanisme d'action de biocides oxydants sur acanthamoebacastellanii.Thèse de doctorat. Université de Poitiers.207p.
- ✓ **Murtough S. M., Hiom S. J., M. Palmer and A. D. Russell.** 2001. “Biocide rotationin the healthcare setting : is there a case for policy implementation ?” Journal of Hospital Infection 48 (1) 1–6. <https://doi.org/10.1053/jhin.2001.0950>
- ✓ **Muylaert A., Mainil J.G.** 2012. Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». Ann. Méd. Vét, 156 : 109-123

(O)

- ✓ **Okae Y, Nishitani K, Sakamoto A, Kawai T, Tomizawa T, Saito M, Kuroda Y and Matsuda S** (2022)Estimation of Minimum BiofilmEradication Concentration (MBEC) onIn Vivo Biofilm on Orthopedic Implantsin a Rodent Femoral Infection Model.Front. Cell. Infect. Microbiol. 12:896978.doi: 10.3389/fcimb.2022.896978
- ✓ [Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. ClinMicrobiol Rev1998;11:589–603](#)

(P)

- ✓ **Poirel L, Nordmann P,** 2006. Résistance aux  $\beta$ -lactamines chez Acinetobacter baumannii : évolution et émergence de nouveaux mécanismes. Antibiotiques. Edition Masson. 8 (2) : 100- 107
- ✓ **Poole K.,** 2002. “Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance.” Journal of Applied Microbiology. 92(1) 55-64. <https://doi.org/10.1046/j.1365- 2672.92.5s1.8.x>
- ✓ **Prescott W. Sherwood.Woolverton.**2013. Microbiologie .4e Édition.pp:536,539.

## Référence bibliographique

- ✓ **Prescott.Harley. Klein** .2003. MICROBIOLOGIE 2 ème édition,Boeck: paris.pp:506-509
- ✓ **PUTOIS, T.,** (2012). “Etude du traitement de désinfection des eaux de refroidissement par le couplage H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV: Application à une tour aéro-réfrigérantes.” Thèse de doctorat, UNIVESITE DE GRENOBLE.211p.

### (R)

- ✓ **RAHAL, K.,** (2013).Les antibiotiques. Office des publications universitaire, Alger, 2013, 135p. ISNB:978.9961.0.1705.0
- ✓ **Reverdy M.E.** 1995. Les ammoniums quaternaires. Antiseptie et désinfection, Fleurette J. et Freney J. et ReverdyM.E ; eds ; Editions Eska, 174-198.
- ✓ **Ruppé É., Woerther P.L., and Barbier F.,** 2015. “Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram - negative bacilli.” Annals of Intensive Care 51 (2): 1–15.<https://doi.org/10.1186/s13613-015-0061-0>
- ✓ **Russell A D.** (2002). Antibiotic and biocide resistance in bacteria:comments andconclusions. J ournal of Applied Microbiology Symposium Supplement, 92 171 S-173 S.
- ✓ **Russell A.D.,** 2000. “Do biocides select for antibiotic resistance ?”The Journal ofPharmacy and Pharmacology 52 : 227–33., <https://doi.org/10.1211/0022357001773742>
- ✓ **Russell A.D.,** 1995. “Mechanisms of bacterial resistance to biocides.” International Biodeterioration& Biodegradation 36 (3–4): 247–65. [https://doi.org/10.1016/09648305\(95\)00056-9](https://doi.org/10.1016/09648305(95)00056-9)
- ✓ **Russel A.D.** 1991.Principles of Antimicrobial Activity. In: Desinfection, Sterilization and Preservation. BlockS.S ;ed ; Lea and Febiger, pp 29-58.

### (S)

- ✓ **Samranki M.M., Roques C. and Michel G.** 1997. Influence of trophic conditions on exopolysaccharides production: bacterial biofilm susceptibility to chlorine and monochloramine. Canadian Journal ofMicrobiology, 43, pp 751-758
- ✓ **Shamsizadeh Z., Nikaeen M., NasrEsfahani B., Mirhoseini S. H., Hatamzadeh M., and Hassanzadeh A.,** 2017. “Detection of antibiotic resistant Acinetobacter baumannii in various hospital environments : potential sources for transmission of

## Référence bibliographique

- Acinetobacter infections.” Environmental Health and Preventive Medicine 22 (44): 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12199-017-0653-4>
- ✓ **Shimose LA, Masuda E, Sfeir M, et al.** 2016 Acinetobacter baumannii résistant aux carbapénèmes : contamination concomitante de l'air et des surfaces environnementales. Infect Control HospEpidemiol. 2016 ; 37 (7):777–781.
  - ✓ **Simoes M. (2011).** Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms. Current medicinal chemistry. 18(14): 2129-2145.
  - ✓ **Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B.S., Vabic-Vlahovic M. (2000).** A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiological Methods. 40: 175–179
  - ✓ **Subhasree Roy, GoutamChowdhury, Asish K Mukhopadhyay, ShantaDutta ,SulagnaBasu, 2022,** Convergence de la formation de biofilm et de la résistance aux antibiotiques dans l'infection à Acinetobacter baumannii, Sect. Maladies infectieuses – Surveillance, prévention et traitement Volume9 <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.793615>
  - ✓ **Svetlíkova Z., Škovierová H., Niederweis M., Gaillard J.L., McDonnell G., and Jackson M., 2009.** “Role of porins in the susceptibility of Mycobacterium smegmatis and Mycobacterium chelonae to aldehyde-based disinfectants and drugs ” Antimicrobial Agents and Chemotherapy 53 (9) : 4015–18. Doi : 10.1128/AAC.00590-09
- (T)
- ✓ **Taj Y., Essa F., Aziz F. Kazmi S. U. (2012).** Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Journal of infection in developing countries. 6(5).
  - ✓ **Thom K.A., Johnson J. K., Lee M.S., and Anthony D., 2011.** “Environmental contamination due to multidrug-resistant Acinetobacter baumannii surrounding colonized or infected patient.” Am J Infect Control 39 (09) 711–15. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2010.09.005>
  - ✓ **TouriaE; Abdouelouhab E; Alban Z; Mouhcine M et Sakina E. (2010).** Activitéantibactérienne des antiseptiques utilisés à l'Hôpital militaire d'instruction Mohamed V de Rabat. Ann Biot Clin 68, 421- 7.



## Référence bibliographique

- ✓ **Tsuji S., Kawano S., Oshita M., Ohmae A., Shinomura Y., Miyazaki Y., Maeda T.** (1999). Endoscope disinfection using acid electrolytic water. *Endoscopy*, 31(07), 528-535.

### (U)

- ✓ **UWINGABIYE J.** (2018). *Acinetobacter baumannii* : comparaison phénotypique et moléculaire des isolats colonisant et/ou infectant les patients et ceux contaminant l'environnement hospitalier. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V. Faculté de Médecine et de Pharmacie. Rabat. 16, 28, 50, 129p

### (W)

- ✓ **Wand M.E., Bock L.J., Bonney L. C., and Sutton J.M.,** 2017. “ Mechanisms of increased resistance to chlorhexidine and cross-resistance to colistin following exposure of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to chlorhexidine ” *Antimicrob Agents Chemother* 61 (1) : 1–12. Doi : 10.1128/AAC.01162-16
- ✓ **Webber M.A., Whitehead R. N., Mount M., Loman N.J., Pallen M.J., and Piddock L. J. V.,** 2015. “Parallel evolutionary pathways to antibiotic resistance selected by biocide exposure.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70 (□ 2241–48). <https://doi.org/10.1093/jac/dkv109>
- ✓ **Weingarten R.A., Johnson R.C., Conlan S., Ramsburg A. M., Dekker J. P., Lau A. F., Khil P., et al.** 2018. “Crossm genomic analysis of hospital plumbing reveals diverse reservoir of bacterial plasmids conferring carbapenem resistance.” *mBio* 9 (1) : 1–16. Doi : 10.1128/mBio.02011-17
- ✓ **Wendt C, Dietze B, Dietz E, et al.** 1995 Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, 35 (6), pp.1394-1397.

### (Y)

- ✓ **Yannick D.N. Tremblay, Skander Hathroubi, et Mario Jacques,** 2014. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique; 78(2): 110–116. French.

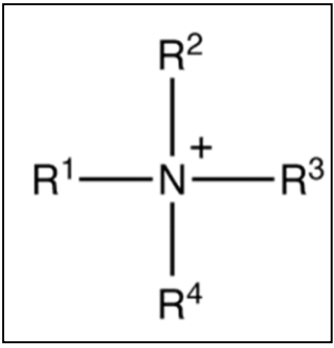
# *Annexes*

✚ **Tableau II: Caractères d'indentification des genres le plus fréquemment rencontrés des *Enterobacteriaceae***

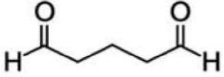
	<i>E. coli</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Serratia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Providencia</i>	<i>Yersinia</i>
Glucose		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-	+
Indole	+	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+	-/+
VP (Acétine)	-	-	+	+	+	-	-	-	-	*
Citrate	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	+	-
Mobilité	+	+	+	-	+	+	-	+	+	*
Urée	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
TDA	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
H <sub>2</sub> S	-	+/-	-	-	-	+	-	+/-	-	-

(Kassama et Hamadis, 2013).

✚ **Tableau V : Quelques biocides utilisés dans les milieux hospitaliers.**

Biocide	Mode d'action	Formule moléculaire
<p><b>Les ammoniums quaternaires (QAC)</b></p>	<p>Ces molécules présentent une activité nettement accrue contre les bactéries à Gram positif. Alors que les bactéries à Gram positif possèdent une seule membrane cellulaire phospholipidique et une paroi cellulaire plus épaisse composée de peptidoglycane, les bactéries à Gram négatif sont encapsulées par deux membranes cellulaires et une couche assez mince de peptidoglycane. C'est en raison de la présence de cette seconde membrane que les QAC</p>	 $  \begin{array}{c}  R^2 \\    \\  R^1 - N^+ - R^3 \\    \\  R^4  \end{array}  $

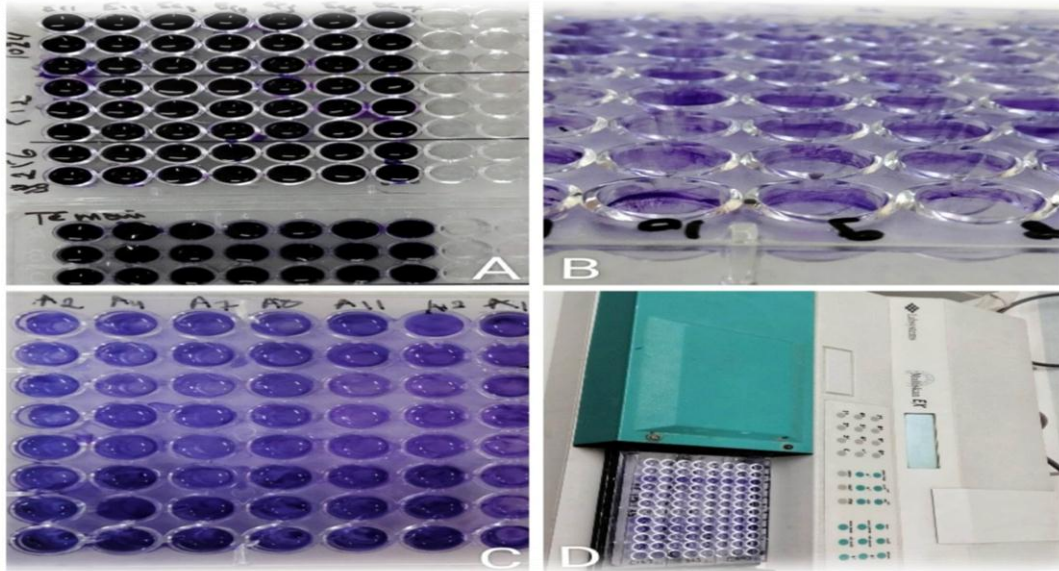
	<p>ont tendance à présenter une activité réduite sur les Gram négatives (<b>Jennings et al., 2016</b>).</p> <p>L'efficacité bactéricide est également dépendante du pH, leur maximum d'activité se situe à pH neutre et sont inactives aux <math>\text{pH} \leq 3,5</math>. (<b>Barbusiaux et al., 1993</b>). Dans les hôpitaux, ils sont souvent utilisés en solution alcoolique (<b>Allion, 2004</b>).</p>	<p>(<b>Knetsch et Koole, 2011</b>).</p>
<p><b>Biguanides</b>  <b>Ex : chlorhexidine</b>  <b>(CHX)</b></p>	<p>La chlorhexidine (CHX) est l'un des biguanides dont le mode d'action est particulièrement bien documenté (Maillard, 2002). Cette molécule cationique attirée rapidement sur la surface cellulaire bactérienne chargée négativement, à une adsorption spécifique et forte avec les composés contenant du phosphate. Cela altère l'intégrité de la membrane cellulaire bactérienne et attire la chlorhexidine vers la membrane cellulaire interne. La chlorhexidine se lie aux phospholipides dans la membrane interne, entraînant une augmentation de la perméabilité de la membrane interne et des fuites de composants de faible poids moléculaire, tels que les ions potassium (<b>Jones., 2000</b>). À des concentrations plus élevées, la CHX est bactéricide et provoque la précipitation et la coagulation du cytoplasme (<b>Hubbard et al 2017 ; Maillard, 2002</b>). La membrane externe des bactéries Gram-négatives peut agir comme une barrière de perméabilité pour la CHX et limiter son efficacité antibactérienne. (<b>Cheung et al., 2012</b>)</p>	<div data-bbox="1166 1099 1522 1464" data-label="Chemical-Block"> </div> <p>(<b>Kathuria et al , 2018</b>).</p>

<p><b>Les aldéhydes</b> <b>Ex: glutaraldéhydes</b> <b>(GLU)</b></p>	<p>Cet agent antibactérien inhibe les systèmes enzymatiques et de transport transmembranaire entraînant ainsi la mort cellulaire ; il dénature également les acides nucléiques par alkylation. Son activité est optimale à pH alcalin (<b>McDonnell et Russell, 1999</b>). Il est à noter que la présence de matières organiques diminue son efficacité bactéricide. Leur point faible réside dans leur forte toxicité, leur action lente et leur difficulté d'élimination par rinçage (<b>Allion, 2004</b>).</p>	<div style="text-align: center;"> <p>glutaraldehyde</p>  </div> <p>(<b>Svetlíkova et al., 2009</b>)</p>
---	---	--

✚ **Tableau VI: Listes des antibiotiques utilisés pour l'évaluation de l'antibiorésistance**

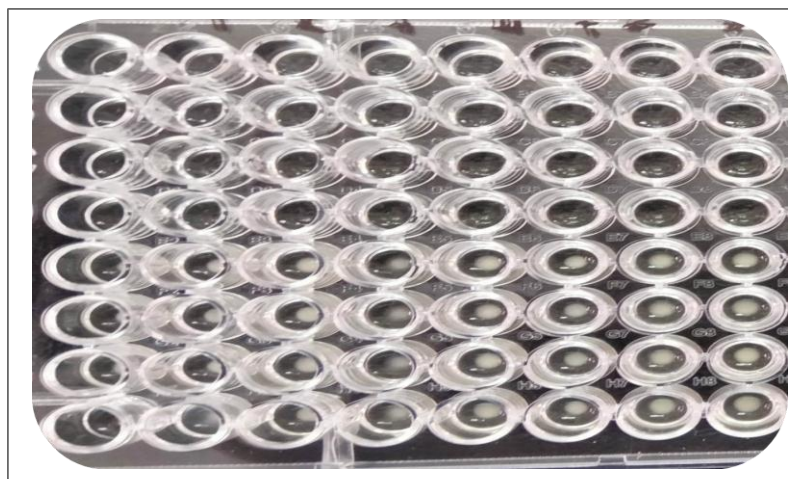
Entérobactéries			Acinetobacter		
Antibiotique	Code	Charge du disque	Antibiotique	Code	Charge du disque
<b>Ampicilline</b>	(AMP)	10µg	<b>Ticarcilline</b>	(TIC)	75µg
<b>Amoxicilline + Acide clavulanique</b>	(AMC)	20 / 10µg	<b>Ticarcilline + Acide clavulanique</b>	(TIC)	75/10µg
<b>Céfazoline</b>	(CZ)	30µg	<b>Pipéracilline</b>	(PI)	100µg
<b>Céfoxline</b>	(CX)	30µg	<b>Pipéracilline + tazobactam</b>	(TZP)	100/10µg
<b>Céfotaxine</b>	(CTX)	30µg	<b>Ceftazidime</b>	(CAZ)	30µg
<b>imipénème</b>	(IMP)	10µg	<b>Imipénème</b>	(IMP)	10µg
<b>méropénème</b>	(MRP)	10µg	<b>Méropénème</b>	(MRP)	10µg
<b>Amikacine</b>	(AK)	30µg	<b>Amikacine</b>	(AK)	30µg
<b>Gentamicine</b>	(GN)	10µg	<b>Gentamicine</b>	(GN)	10µg
<b>Acide nalidixique</b>	(AN)	30µg	<b>Tobramycine</b>	(TOB)	10µg
<b>Ciprofloxacine</b>	(CIP)	5µg	<b>Ciprofloxacine</b>	(CIP)	
<b>Chlorophénicol</b>	(C)	30µg	<b>Lévofloxacine</b>	(LEV)	5µg
<b>Fosfomycine</b>	(FOS)	200µg			

<b>Triméthoprim + Sulfaméthoxazole</b>	(SXT)	1,25 / 23,75µg			
--	-------	-------------------	--	--	--

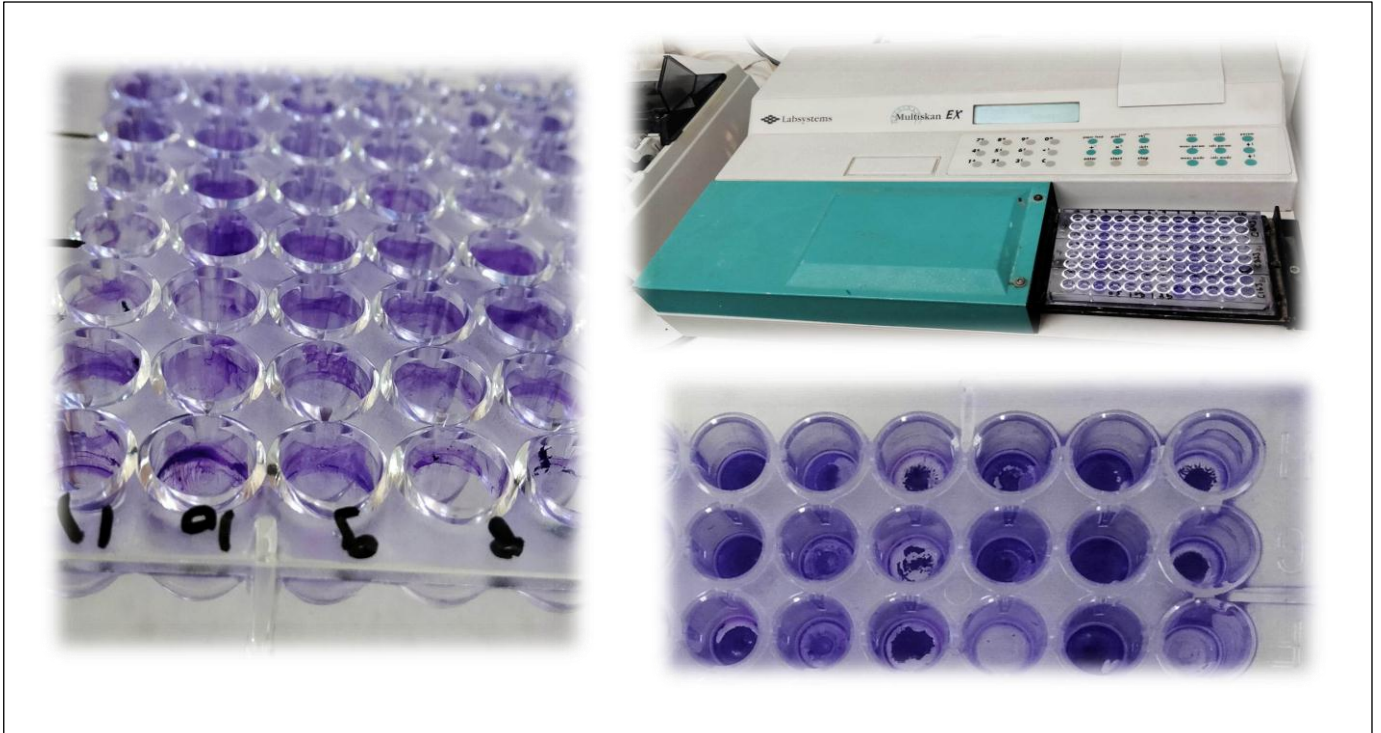


**Figure 09:** Evaluation de la densité optique du biofilm par lecteur ELISA (photo originale)

**A :** Coloration par cristal violet ; **B :** Rinçage par l'eau distillé stérile ; **C :** Récupération de biofilm par l'acide acétique ; **D :** Lecture de microplaque par technique ELISA (mesure la DO)



**Figure 15:** Détermination des concentrations minimales inhibitrice de chlorhexidine sur les souches d'*E.coliace* (photo originale)



**Figure 23 :** Aspect des biofilms sur microplaque et lecture de (DO) (photos originales)

**Matériel:**

**✚ Verreries**

- Api20<sup>E</sup>/ Api20<sup>NE</sup>
- Microplaque
- Boite pétrie
- Ecouillons
- Lames et lamelles
- Pied à coulisse
- Pipette pasteur stérile
- Portoir
- Tubes à essai stérile
- Tubes sec

 **Appareillage utilisé :**

- Etuve
- Bec benzène
- Bain marie
- Four pasteur
- Microscope optique (**micros AUSTRIA**)
- Autoclave
- Spectrophotomètre (**Multiskan EX**)

 **Milieux de culture utilisée**


Composition g/l :

 **BHIB**

Digestion enzymatique de tissus animaux	<b>10.0</b>
Infusion De Cerveille De Veau Déshydratée	<b>12.5</b>
Infusion de coeur de boeuf déshydraté	<b>5.0</b>
Glucose	<b>2.0</b>
Chlorure de sodium	<b>5.0</b>
Hydrogénophosphatedisodique, anhydre	<b>2.5</b>

 **Gélose nutritive**


Peptone	<b>10.0</b>
Extrait de viande	<b>5.0</b>
Chlorure de sodium	<b>5.0</b>
Agar	<b>10.0</b>
PH	<b>7.3</b>

 **Milieu Hektoen**

Peptonepepsiquedeviance	<b>15</b>
Extrait de viande	<b>3</b>
Extrait de levure	<b>3</b>
Chlorure de sodium	<b>5</b>
Sels biliaires	<b>4</b>
Lactose	<b>12</b>




Salicine	2
Saccharose	12
Fuchsine acide	0.1
Bleu de Bromothymol	0.065
Agar	18
PH	7.3

 **Mac conkey**

peptonepancréatiquedegélatine	17
peptone pancréatique decaséine	1.8
peptonepeptiquedeviande	1.5
Lactose	10
chlorurede sodium	5
Selsbiliaires	1.5
Rougeneutre	0.03
Violetdegentiane	0.001
Agar	13.5
Ph	7.2

 **Mueller-Hinton bouillon**

Extrait de viande	2.1
Hydrolysate acide de caséine	17.5
Amidon soluble	1.5
Ph	7.4

 **Gélose au sang cuit**

Peptone de caséine	7.5
Peptone de viande	7.5
Amidon de maïs	1.0
Phosphate dipotassique	4.0
Chlorure de sodium	5.0
Hémoglobine	10.0
Supplément vitaminique comme le polyvitex	10.0ml
Agar	10.0

PH	7.2
----	-----

**Rouge congo**

BHIB	37.0
Saccharose	50.0
Gélose	10.0
Rougecongo	0.8

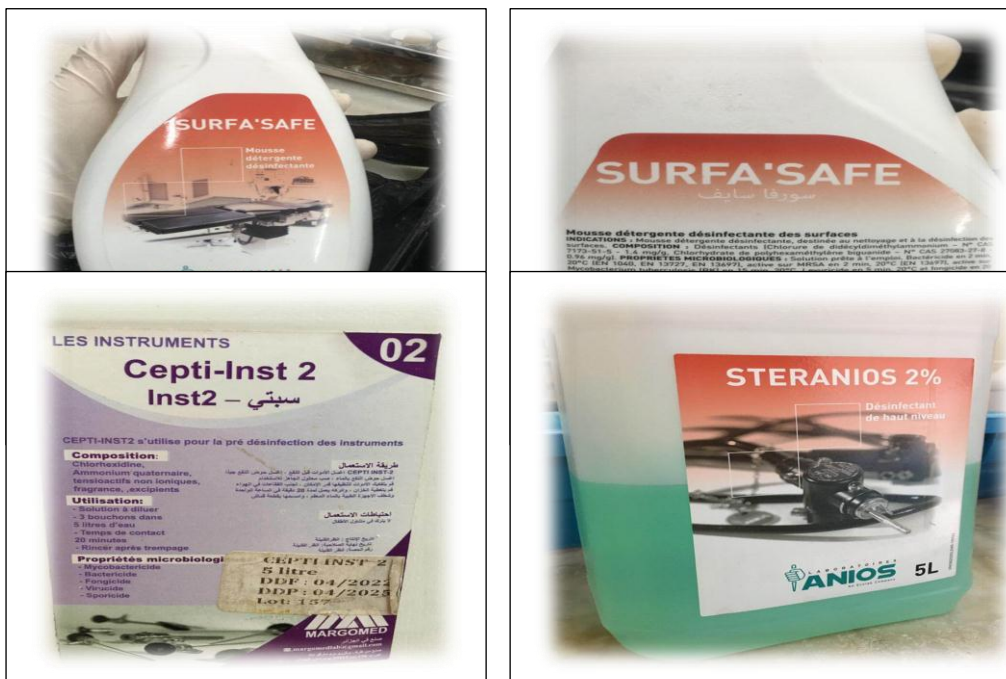
**Solution tampons utilisée**

Composition g/l :

- **TBS (Tris Buffered Saline)**

Chlorure de sodium	8
Chlorure de potassium	0.2
Phosphate de sodium dibasique	1.44
Phosphate de potassium monobasique	0.245

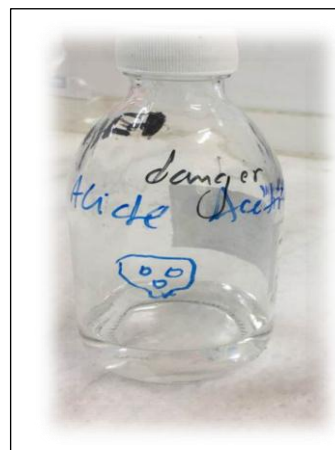
**Les biocides utilisés**



(Photos originale).

## ✚ Réactifs et colorants utilisé

- Violet de Gentiane
- Lugol
- Alcool 90°
- Fuschine
- Huile de vaseline stérile
- Huile à immersion
- L'eau oxygénée
- L'eau physiologique
- Disque d'oxydase
- Disques d'antibiotiques
- Acide acétique



(Photos originale).

