République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de L'enseignement Supérieure et de La Recherche Scientifique

Université Dr. Yahia Farès Médéa

Faculté des Sciences

Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En Sciences de la nature et de la vie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Par :

BOUDEKHANI Abir **SEGHIR Fatiha** **AMIER Yasmine**

Etude du pouvoir de formation des biofilms et de l'antibiorésistance des bactéries impliquées dans les infections nosocomiales au niveau de l'hôpital de Médéa

Soutenue publiquement le : **20 / 06 /2023**

Devant le jury composé de :

Dr. Belkacem Imane	MCB	Université de Médéa	Promotrice
Dr. Siouda Wafae	MCA	Université de Médéa	Examinatrice
Dr. Bouzidi Amel	MCA	Université de Médéa	Président

Année universitaire : 2022-2023

Remerciement

En préambule à ce mémoire nous remercions ALLAH qui nous a aidé et nous a donné la patience et le courage durant ces langues mois d'étude.

Ces remerciements vont tout d'abord au corps professoral et administratif de L'UNIVERSITE pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts et une grande technique pédagogique pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

Nous souhaitons adresser encore nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année.

Nous tenons à remercier très sincèrement Madame BELKACEM Imane qui, en tant qu'encadrant de notre mémoire, s'est toujours montrée à notre écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire. Ainsi nous lui devons beaucoup pour sa contribution, son aide et ses conseils en consacrant presque tout son temps pour que ce projet de fin d'étude réussisse à son optimum.

Enfin, nous remercions les membres de jury et toute personne qui a participé de près ou de loin pour l'accomplissement de ce modestetravail.





DEDICACE

Je tiens à remercier en premier lieu dieu le tout puissant qui m'a donné le courage et la patience et qui a éclairé mon chemin pour achever ce travail.

Je dédie ce mémoire à ...

A ma très chère mère : Meriem

Vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Votre prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Vous avez fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur étude et leur vie.

A mon très cher père : Djamel

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.

Grâce à votre bienveillance, à votre encouragement et à votre générosité, j'ai pu terminer mes études dans l'enthousiasme.

A mes grands-parents maternels : Mouloud et Rabia

Merci pour votre soutien continu, vos encouragements et votre appréciation pour mon travail.

A mes grands-parents paternels : Abdelkader et Meriem

Je demande à Dieu de tes placers parmi les gens du paradis, et si vous étiez en vie, beaucoup de choses auraient changé.

A mes chères sœurs et mon chère frère : Yasmine, Alae, Ilyess

Je t'aime et te souhaite du succès dans ta vie, et que le bonheur t'accompagne toujours.

A ma chère cousine : Meriem

Tu étais ma grande sœur et tu le seras toujours. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

A toute ma famille: Avec toute mon affection et mon respect

A ma chère amie : MENDASI Fatima

Je demande à Dieu de tes placers parmi les gens du paradis, j'aimerais que tu sois avec moi et que nous puissions célébrer ensemble.

A ma chère amie : BEDOUHEN Wassila

J'espère que nous serons ensemble le jour de la cérémonie de remise des diplômes et raviver de vieux souvenirs.

A mon binôme : Amier Yasmine et Boudekhani Abir

En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

A ma promotion de Microbiologie appliquée 2018 : Je leur souhaite la réussite et le bonheur.

FIFI



DEDICACE

J'ai le grand plaisir dédié ce mémoire…

A la très chère mère, qui me donne toujours l'espoir de vivre et qui n'a jamais cessé de prier pour moi.

A mon très cher père, pour ses encouragements, son soutien, surtout pour son amour et son sacrifice afin qui rien n'entrave le déroulement de mes études.

A mes très chers frères Mohamed et Raouf

Et a mes belles sœurs Fatima, Khadija, Meriem, samara

A tout mes familles Madani et Amier

A tout mes amies

En fin, je remercie mon binôme fifi et Abir qui a contribuée à la réalisation de ce modeste travail.

Yasmine

Dédicace

Avec l'aide de Dieu le tout puissant clément et miséricordieux, j'ai pu accomplir ce travail que je dédie

En premier lieu, à moi, qui a surmonté tons de difficultés, je ne peux pas décrire a quel point je suis fière de mon parcours et de la personne que je suis aujourd'hui.

Aux bijoux de ma vie mes parents. Maman, source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études. Tu m'as aidé à concrétiser mon rêve sans ne jamais manquer de rien. Papa, de tous les pères, tu es le meilleur. J'ai toujours bénéficié de ton affection et ta générosité. Que ce modeste travail, qui n'est que le couronnement de tes sacrifices, soit un témoignage de toute mon estime et de ma reconnaissance.

En ce jour, j'espère réaliser l'un de vos rêves. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes respects, ma reconnaissance. À ma seule et unique chère sœur Ihssene , mes chers frères Ilyes et Merrouane, que Dieu vous garde, guide votre route et vous aide à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers. Mes tentes Assia, Safia… A mes chères collègues mon trinôme Fifi et Yasmine, je vous remercie pour votre aide et efforts, à Ines, Naila, rania, à mes amies pour leur encouragement durant mon parcours sur tout dans cette dernière année. Amina, Zola, Dounia, Fadoua, Imen, Nada. Je vous souhaite le bonheur.

Abir

LISTE DES TABLEAUX

Tableau1	Paramètres utilisés dans l'évaluation de formation de biofilm par la méthode de (TCP)	**63**
Tableau2	Les pourcentages des prélèvements de pus	**73**
Tableau3	Les pourcentages des prélèvements de coprocultures	**74**
Tableau4	Les pourcentages des prélèvements urinaires	**74**
Tableau5	Résultats d'observation macroscopique des souches isolées	**75**
Tableau6	Résultat de coloration de Gram des souches	**78**
Tableau7	Résultats du test catalase et oxydase	**79**
Tableau8	Résultats des tests biochimiques d'*E. coli*	**81**
Tableau9	Résultats d'enrichissement enzymatique	**82**
Tableau10	Lecture d'Api 20^{E} d'E. coli	**83**
Tableau11	Lecture d'Api Staph	**84**
Tableau12	Lecture d'Api de Pasteurella spp	**85**
Tableau13	Résultats de la prédominance des souches résistantes selon espèce	**86**
Tableau14	Résultats de la prédominance des souches résistantes par différents service	**87**
Tableau15	Les pourcentages des souches isolées de 30 prélèvements	**91**
Tableau16	Le pourcentage de la formation de biofilm de 5 souches sur gélose de Rouge Congo	**92**
Tableau17	Résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'Eucalyptus	**95**

LISTES DES FIGURES

Figure 1	Centre hospitalier Comminges Pyrénées – infection nosocomial OMS 2021	07
Figure 2	Mode de transmission des maladies nosocomiales	09
Figure 3	Prévention des maladies nosocomiales	15
Figure 4	Le premier antibiotique (Arsphénamine)	18
Figure 5	Mécanismes d'actions des antibiotiques	19
Figure 6	Beta -lactamines (pénicillines céphalosporines)	20
Figure 7	Les antibiotiques de la famille des tétracyclines	21
Figure 8	Streptomycine le premier aminoglycoside	22
Figure 9	Structure de base des quinolones	22
Figure 10	Macrolides antibactériens(Erythromycine) et Macrolides antifongique et antiprotozoaires (Amphotéricine B)	23
Figure 11	Ansamycines naphténiques (Rifamycine SV) et Ansamycines benzéniques (Maytansine)	24
Figure 12	Les premiers antibiotiques peptidiques	24
Figure 13	Les antibiotiques de la famille des dalbaheptides	25
Figure 14	Différentes classes des antibiotiques antitumoraux	26
Figure 15	Autres classes d'antibiotiques	27
Figure 16	Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques.	30
Figure 17	Microorganismes de biofilm observé par Leeuwenhoek	37
Figure 18	Microscopie électronique à balayage des biofilms mature (48 h) (A) C.glabrata (B) C. parapsilosis (Grossissement300)	38
Figure 19	La matrice d'un biofilm homogène	39
Figure 20	La matrice d'un biofilm hétérogène	39
Figure 21	Le cycle de formation de biofilm	39
Figure 22	Principales infections associées aux biofilms.	45
Figure 23	Ensemencement par beurrage	52
Figure 24	Ensemencement incliné en pente	52
Figure 25	Ensemencement sur milieu liquide	53
Figure 26	KitR13 de couleur Gram (Crystal violet, Safranine ou Fuchsine) et	54

LISTES DES FIGURES

	lamelles	
Figure 27	Réalisation du test coagulase	57
Figure 28	API20E	58
Figure 29	API20NE	60
Figure 30	API Staph	61
Figure 31	Réalisation de l'antibiogramme (disques d'antibiotiques des entérobactéries) avant l'incubation	62
Figure 32	Microplaque en polystyrène de 96 puits	63
Figure 33	Stérilisation des microplaques dans une UV (Telstar)	64
Figure 34	Préparation des suspensions	64
Figure 35	Mesure de la DO (par cuve)	65
Figure 36	Spectrophotomètre	65
Figure 37	Les différentes concentrations des sucres mélangés dans BHIB	65
Figure 38	Micropipette de 100uL	66
Figure 39	La disposition des paramètres	66
Figure 40	Etuve de séchage	67
Figure 41	Remplissage de cristal violet	67
Figure 42	Lavage de cristal violet avec l'eau distillée	67
Figure 43	Solubilisations avec Ethanol	67
Figure 44	Coulage des boite pétri Rouge Congo	68
Figure 45	Lecteur des microplaques ELISA (MP69UV)	68
Figure 46	Réalisation l aromatogramme à gauche disque imprégnées de l'huile d'Eucalyptus et à droit disque vierge (Témoin)	69
Figure 47	Suspension bactérienne mesure en densitomètre ayant 0.5 MF	70
Figure 48	Etuve d'incubation	70
Figure 49	Les dilutions de l'huile Eucalyptus dans les puits d'une microplaque	70
Figure 50	Huile d'Eucalyptus +la suspension bactérienne	71
Figure 51	Fixation de biofilm par cristal violet	71
Figure 52	Répartition des prélèvements des pus selon sexe	73
Figure 53	Répartition des prélèvements des coprocultures selon sexe	74

LISTES DES FIGURES

Figure 54	Répartition des prélèvements urinaires selon le sexe	75
Figure 55	Aspect d Aeromonas hydrophila sur milieu Hektoen	76
Figure 56	Aspect de pasteurella spp sur milieu Hektoen et sur milieu Cétrimide	76
Figure 57	Aspect d E. coli sur milieu Hektoen	76
Figure 58	Aspect d Aeromonas hydrophila sur Mac-Conkey et sur gélose au sang	77
Figure 59	Aspect de staphylococcus epidermidis sur milieu Chapman	77
Figure 60	Cocci Gram+ (staphylococcus epidermidis)	78
Figure 61	Bacille Gram- (E. coli)	78
Figure 62	Bacille Gram+ (Enterobacter cloacae serratiamarcescens	79
Figure 63	Réaction de la catalase positive	79
Figure 64	Réaction de la catalase négative	79
Figure 65	Résultats de la coagulase négative de staphylococcus eperdimis	80
Figure 66	Test biochimique	81
Figure 67	Résultats de la mini galerie classique de pasteurella spp, staphylococcus eperdimis, E. coli	82
Figure 68	Résultats Api20 d'Enterobacter cloacae serratia marcescens	83
Figure 69	Résultats Api20E d'E.coli	84
Figure 70	Résultats d'Api Staph	84
Figure 71	Api 20 NE de Pasteurella spp	85
Figure 72	Résultats de l'antibiogramme d'Aeromonas hydrophila	86
Figure 73	Résultats de l'antibiogramme de Staphylococcus epidermidis	86
Figure 74	Répartition des souches résistantes par espèce	87
Figure 75	Répartition de souches résistantes par différents services de l'hôpital de Médéa	88
Figure 76	Représentation graphique de l'antibiogramme de Staphylococcus epidermidis	89
Figure 77	Représentation graphique de l'antibiogramme de Pasteurella spp	89
Figure 78	Comparaison de la résistance d'E. coli et d'Aeromonas hydrophila	90
Figure 79	Représentation graphique de l'antibiogramme d'Enterobacter cloacae serratia marcescens	90
Figure 80	Le taux des 5 souches isolées selon 30 prélèvements	91

LISTES DES FIGURES

Figure 81	Phénotype de production et de non production de slim	92
Figure 82	Fréquence de différents aspects macroscopique des souches testées à la formation de slim	92
Figure 83	Evaluation de la production de biofilm par la méthode TCP	93
Figure 84	Evaluation de la production de biofilm par les différentes températures	94
Figure 85	Inhibition de la formation de biofilm par l'huile d'Eucalyptus	95
Figure 86	Aromatogramme d'E. coli	96
Figure 87	Aromatogramme de Pasteurella spp	96

LISTE DES ABREVIATIONS

ABR: Acinobacter baumannii multirésistants
ADH : Arginine
ADN : Acide désoxyribonucléique
AHL : Acyl Homosérine lactones
AI : Autoinducteures
AMP: Principaux peptides antimicrobiens
AMPc: Adénosine monophosphate cyclique
AMPs: Advanced mobile phone service
API Staph : Analytique profile index Staph (Staph : staphylocoque)
API 20E : Analytique profile index 20^{E} (E : Entérobactéries)
API 20NE : Analytique profile index 20 NE (NE : Pseudomonas)
ARN: Acide ribonucléique
ARNr: Acide ribonucléique Ribosomal
ARNt: Acide ribonucléique transférase
BGN: Bactéries gramme negative
BHIB : Bouillon cœur cervelle
BHRe: Bactéries Hautement résistantes émergentes
BMR: Batteries multirésistance
BN : Bouillon nutritive
CAI : Cholerae autoinducer
CA-SFM : Société Française de Microbiologie a créé un comité de l'Antibiogramme
CCI : Chirurgie infantile
CHF : Chirurgie femme
CHH : Chirurgie homme
CIT : Citrate de sodium
CLED: Cystine Lactose Electrolyte
CLIN: Comité de lute contre infection nosocomiales
CLSI: Clinical Laboratory Improvement service
CMI : Concentration minimale inhibitrice
CO2 : dioxyde de carbone
CRA: Congo Red Agar
CTINILS: comité technique des infections nosocomial et des infections liées aux soins
CV : Cristel violet
DM: dispositif médicaux
DO : Densité optique
DSF : Diffusible signaling Factor
EBLSE: Entérobactéries productrices de bêtalactamase à spectre étendue
ECBU : Examen Cytobactériologique des urines
ELISA : Enzyme-linked immuno Assay
EPC: Entérobactéries productrices de carbapénèmases
EPS : Substance polymère extracellulaire
ERG: Entérocoque résistant aux glycopeptides
ERV: Enterococcus faecalis résistant à la Vancomycine

LISTE DES ABREVIATIONS

ESC : Esculine Citrate de fer
EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
EXT : Externe
GEL : Gélatine de Kohn
Glu : Glucose
GN : Gélose nutritive
GSF : Gélose ay sang frais
GYN : Gynécologie
GyrA: Gyrase A
H11N9: Virus de la grippe A
H2O2: Peroxyde d'hydrogène
H2S: Thiosulfate de sodium
HD : Hémodialyse
HSV-1: Virus de l'herpès labial
HUG: Hospitaux Universitaire de Genève
IAS: infections associée aux soins
ICU: Intensive Care unite
IN: Infections nosocomiales
IND : Tryptophane
INF : Infection
ISO: infections de site opératoire
JAMA: Journal of the Américain medical Association
LAI : Legionella autoinducer
LDC : Lysine Déca
MAT : Micro angiopathie thrombothirurgie femme
MBEC : Minimal biofilm eradication concentration
MDR: Medical Device Regulation
MF : McFarland
MH : Médicine homme
MH: Muller Hinton
MT : Méthode de tube
N2 : Azote
NIT 1 : Nitrite 1
NIT2 : Nitrite **2**
NO2 : Réduction des nitrates en nitrites
NO3 : Potassium nitrate
ODC : Ornithine décarboxylase
OMS: organisation mondiale de la santé
ONCO : Oncologie
ONCO : Oncologie
ONPG: Ortho-Nitro-phényl-Galactoside
OPHT : Ophtalogie
ORL: Oto-rhino-laryngologie
P.N: pneumonies nosocomiale

LISTE DES ABREVIATIONS

PAC : Acide phénylacétique
PAL : Phosphatase alcaline
PAR: Pseudomonas aeruginosa multirésistants
PBP: Penicillin-binding proteins
PBP2: penicillin binding protein 2
PBS : Phosphate Buffer saline
PBS : Tampon phosphate salin
PED : Pédiatre
PGA ou PNAG: Polyglucosamine
PH: Potentiel d'hydrogène
PIA : Polysaccharide intercellulaire Adhésion
PNAVM: pneumopathie nosocomial acquise sous ventilation mécanique
PNPG : 4-nitrophenyl + BD -galacto pyranoside
QQ : Quorum Quenching
QQE : Quorum quenching enzyme
QS : Quorum sensing
QSI : Quorum sensing inhibiteurs
Sac: Saccarose
SARM: Staphylococcus aureus résistant à la Méthicilline
SV: Seul ventilatoire
TATFAR: Transatlantic Task Force on Antimicrobial
TCP : Méthode de plaque de culture de tissus
TDA : Tryptophane désaminase
TRP : L-tryptophane
TRPS: Test Resource Plan
TSI : Triple Suger Iron
UE: Union européenne
UFC : Unité Formant colonie
UMC : Urgence médio chirurgical
URE: Urée
VF: Viande foie
VP : Pyruvate de sodium
WMC: Witten. Medical center
ZN : Zinc

RESUME

Les infections nosocomiales sont un problème majeur de santé publique, mais elles sont encore mal connues et mal prises en charge au sein du système de santé. Ces derniers peuvent survenir lorsque des bactéries forment des biofilms à la surface de certains dispositifs médicaux. Malgré les précautions prises, les biofilms sont difficiles à éliminer en raison de leur résistance caractéristique aux antibiotiques à forte dose. Notre étude est menée au laboratoire de Bactériologie de l'hôpital Mohamed Boudiaf Médéa, sur une période de 4 mois (Janvier à Avril 2023).

Le but de notre étude était d'identifier différentes souches microbiennes présentes dans des échantillons provenant de patients admis à l'hôpital de Médéa. Nous avons également examiné leur antibiorésistance et sensibilité aux agents antimicrobiens, leur sensibilité aux huiles essentielles pour la prévention et/ou le traitement des infections nosocomiales et leur capacité à former des biofilms.

L'identification phénotypique a révélé la présence des entérobactéries [*E. coli* (70%), *Aeromonas hydrophila* (3%) et *Enterobacter cloacae serratia marcescens* (3%)], des Pseudomonadaceae [*Pasteurella spp* (10%)] et des Staphylococcaceae [Staphylococcus *epidermidis* (13%)].

L'évaluation et l'interprétation des résultats indiquent que toutes les souches testées ont acquis une résistance à un ou plusieurs des antibiotiques testés. Quant aux huiles essentielles, nous avons constaté qu'elles ont des effets positifs contre les bactéries formant des biofilms : *Aeromonas hydrophila* et *Pasteurella spp* ayant une forte formation de biofilm, *Staphylococcus epidermidis* ayant une formation modérée de biofilm, *E.coli* et *Enterobacter cloacae serratia marcescens* ayant une faible formation de biofilm.

Ces résultats suggèrent que l'environnement hospitalier est un terrain fertile pour les microbes humains potentiellement pathogènes qui contribuent aux infections nosocomiales et à la formation de biofilms qui présentent des risques pour la santé publique.

Mots clés : Biofilm, antibiorésistance, infections nosocomiales, activité antimicrobienne, huiles essentielles

ABSTRACT

Hospital-acquired infections are a major public health problem, but they are still poorly understood and poorly managed within the healthcare system. These can occur when bacteria form biofilms on the surface of certain medical devices. Despite the precautions taken, biofilms are difficult to eliminate because of their characteristic resistance to high-dose antibiotics.

Our study was carried out in the Bacteriology Laboratory of the Mohamed Boudiaf Hospital in Médéa, over a period of 4 months (January to April 2023). The aim of our study was to identify different microbial strains present in samples from patients admitted to Médéa hospital. We also examined their antibiotics resistance and sensitivity to antimicrobial agents, their sensitivity to essential oils for the prevention and/or treatment of nosocomial infections and their ability to form biofilms.

Phenotypic identification revealed the presence of [*E. coli* (70%), *Aeromonas hydrophila* (3%) et *Enterobacter cloacae serratia marcescens* (3%)], Pseudomonadaceae [*Pasteurella spp* (10%)] and Staphylococcaceae [Staphylococcus *epidermidis* (13%)].

Evaluation and interpretation of the results indicate that all the strains tested have acquired resistance to one or more of the antibiotics tested. As for the essential oils, we found that they had positive effects against bacteria forming biofilms. : *Aeromonas hydrophila* and *Pasteurella spp* forming a high amount of bioflm, *Staphylococcus epidermidis* forming an average amout of biofilm, *E.coli* et *Enterobacter cloacae serratia marcescens* forming a weak amount of biofilm.

These results suggest that the hospital environment is a breeding ground for potentially pathogenic human microbes that contribute to nosocomial infections and the formation of biofilms that pose public health risks.

Key words: Biofilm, antibiotic resistance, nosocomial infections, antimicrobial activity, essential oils

ملخص

تعد عدوى المستشفيات مشكلة صحية عامة رئيسية، لكنها لا تزال غير مفهومة جيدًا داخل النظام الصحي. يمكن أن تحدث هذه عندما تشكل البكتيريا أغشية حيوية على سطح بعض الأجهزة الطبية. على الرغم من الاحتياطات المتخذة ، يصعب التخلص من الأغشية الحيوية بسبب مقاومتها المميزة لجرعات عالية من المضادات الحيوية. أجريت دراستنا في مختبر الجراثيم بمستشفى محمد بوضياف المدية ، على مدى 4 أشهر (من يناير إلى أبريل 2023).

كان الهدف من دراستنا هو تحديد السلالات الميكروبية المختلفة الموجودة في عينات من المرضى الذين تم إدخالهم إلى مستشفى المدية. قمنا أيضًا بفحص مقاومتها للمضادات الحيوية وحساسيتها للعوامل المضادة للميكروبات، وحساسيتها للزيوت الأساسية للوقاية و / أو علاج عدوى المستشفيات وقدرتها على تكوين الأغشية الحيوية.

كشف تحديد النمط الظاهري عن وجود بكتيريا Enterobacteriaceae [E. coli (70٪ ، Aeromonas hydrophila (3) و 3) ٪(Enterobacter cloacae serratia marcescens (3٪ ، Pseudomonadaceae [Pasteurella spp (10٪(والمكورات العنقودية Staphylococcus epidermidis (13٪([

يشير تقييم وتفسير النتائج إلى أن جميع السلالات المختبرة قد اكتسبت مقاومة لواحد أو أكثر من المضادات الحيوية المختبرة. أما بالنسبة للزيوت الأساسية ، فقد وجدنا أن لها آثارًا إيجابية ضد البكتيريا المكونة للأغشية الحيوية: Aeromonas hydrophila و Pasteurella spp تتميز بتكوين غشاء حيوي قوي ، Staphylococcus epidermidis تتميز بتكوين غشاء حيوي معتدل ، E.coli و Enterobacter cloacae serratia marcescens تتميز بتكوين غشاء حيوي منخفض

تشير هذه النتاج إلى أن بيئة المستشفى هي أرض خصبة للميكروبات البشرية التي يحتمل أن تكون مُمرضة والتي تساهم في التهابات المستشفيات وتشكيل الأغشية الحيوية التي تشكل مخاطر على الصحة العامة

الكلمات المفتاحية: الغشاء الحيوي ، مقاومة المضادات الحيوية ، التهابات المستشفيات ، نشاط مضادات الميكروبات ، الزيوت الأساسية

SOMMAIRE

Remerciement	
Dédicaces	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Synthèse bibliographique	
Introduction : ……	1
Chapitre I : Généralité sur infections nosocomiales	
1. Historique……	**5**
2. Présentation de l'infection nosocomiale……	**6**
2.1. Définition……	**6**
3. Classification des infections nosocomiales…….	**7**
3.1. Les infections urinaires ……	**7**
3.2 Les infections du site opératoire……..	**8**
3.2.1 Infections superficielles…….	**8**
3.2.1. Infection profonde du site opératoire……	**8**
3.2.2. Infection de l'organe ou du site ou de l'espèce……	**8**
3.3. Les pneumopathies……..	**8**
3.4. Les Septicémies…….	**8**
4. Transmission…….	**8**
4.1. Les voies de transmission…….	**9**
4.1.1. Voie endogène =Auto - infection……..……	**9**
4.1.2. Voie exogène =Hétéro- infection……..……	**9**
5. Les factures favorisants les infections nosocomiales……..……	**9**
5.1. Facteur lié à l'état du patient……	**10**
5.2. Facteur lié à un processus aigue……..……	**10**
5.3. Facture lié à une intervention invasive……..	**10**
5.4. Facteur lié aux traitements	**10**
6.Caracteres de certaines bactéries d'importance clinique……..	**10**
6.1. Bacilles à Gram négative……..	**11**
6.1. *Entérobactérie*…….	**11**
6.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*……	**12**
6.2. Les Cocci a gram positif……..	**12**
6.2.1. *Staphylococcus aureus*……	**12**
6.2.2. *Enterococcus factum*……	**12**
7. Incidence et fréquence des infections nosocomiales……..	**13**
8. Les stratégies pour minimiser les infections nosocomiales……	**14**
8.1. Organisation mondiale de la santé OMS…….……	**14**
8.2. La méthode KAIZEN…….	**14**

8.3. Revêtement colorant photo dynamique……	**15**
9. La relation entre le biofilm et les infections nosocomiales…….	**15**
Chapitre II : Études d'antibiorésistance des bactéries	
1. Généralité sur les antibiotiques……	**18**
1.1. Historique……	**18**
1.2. Qu'est-ce qu'un antibiotique ?.....	**18**
1.3. Mécanismes d'action des antibiotiques……	**19**
1.4. Principales classes des antibiotiques…….	**19**
1.4.1. Antibiotiques Beta-lactamines……	**19**
1.4.2. Les tétracyclines……..	**20**
1.4.3. Les aminosides (Aminoglycosides)…….	**21**
1.4.4. Les quinolones……	**22**
1.4.5. Les macrolides……	**22**
1.4.6. Les vancomycines……	**23**
1.4.7. Les antibiotiques peptidiques…….	**24**
1.4.8. Les antibiotiques glycopeptides……	**24**
1.4. 9. Les antibiotiques antitumoraux……	**25**
1.9.10. Les antibiotiques Divers……	**26**
1.5. La chimiothérapie…….	**27**
2. La résistance bactérienne aux antibiotiques ……	**27**
2.1. Définition de la résistance bactérienne aux antibiotiques……	**27**
2.2. Les causes de la résistance bactérienne aux antibiotiques……	**28**
2.3. L'origine de la résistance bactérienne aux antibiotiques…….	**28**
2.3.1. Resistance naturelle……	**28**
2.3.2. Résistance acquise…….	**29**
2.4. Mécanisme de résistance aux antibiotiques……	**29**
2.4.1. Inhibition d'antibiotiques……	**30**
2.4.2. Modification des cibles des antibiotiques……	**30**
2.4.3. Empêchement de l'entrée d'antibiotiques…….	**31**
2.5. Bases génétiques de la résistance…….	**31**
2.5.1. Mutations chromosomiques……...	**31**
2.5.2. Hypermutation……	**31**
2.5.3. Transfert des gènes……	**31**
2.6. Les bactéries multirésistance aux antibiotiques…….	**31**
2.6.1. Les Bactéries multirésistance concernées…….	**32**
2.6.2. Les bactéries multirésistance émergents……	**33**
2.7. Lutte centre résistance aux antibiotiques……	**33**
2.7.1. Nouveaux médicament……	**33**
2.7.1.1. Inhibiteur de détection de quorum…….	**33**
2.7.2. Produits biologique…….	**33**
2.7.2.1. Peptides antimicrobiens……	**33**
2.7.2.2. Bactériophage……	**34**

Chapitre III : Étude de pouvoir de formation de biofilm	
1.1. Historique……	**37**
2. Définiton…….	**37**
3. Cycle de formation de biofilm…….	**39**
3.1. Adhésion réversible……	**40**
3.2. Adhésion irréversible……	**40**
3.3. Formation de micro colonies……	**40**
3.4. Maturation de biofilm……	**40**
3.5. Détachement et dispersion de biofilm…….	**41**
4.Les caractéristiques du biofilm……	**41**
5. Facture favorisant la formation d'un biofilm…….....	**42**
6. Facteur de différenciations**……...**	**42**
6.1. Lequorumsensing…….....	**42**
6.2. Les molécules de quorum sensing…….…….	**43**
6.3. Comment interférer avec le quorum seings ? le quorum quenching…….	**43**
7. Le biofilm une communauté bactérienne multi-espèces…….	**43**
8. Modèles de Laboratoire pour l'étude des biofilms…….	**44**
9. Conséquence médicale de développement des biofilms…….	**45**
10. Résistance des biofilms à divers agents antimicrobiens……..	**46**
11. Inhibition de la formation des biofilms par les huiles essentielles…….	**47**
11.1. Huiles essentielles……	**47**
11.2. Huiles d'Eucalyptus globuleux……	**47**
11.2.1. Source……	**47**
11.2.2. Mode d'action…….	**47**
11.2.2.1. Activité antibactérienne……	**47**
11.2.2.2. Activité antivirale……	**48**
11.2.2.3. Activité antifongique…….	**48**
Approche méthodologique	
1. Objectif ……	**49**
1.1. Objectifs principal……	**49**
1.1. Objectifs spécifique…….	**49**
2. Modalité pratiques……	**49**
2.1. Lieu d'étude …….	**49**
2.2. Prélèvements……	**49**
3. Isolement des souches bactériennes……...	**50**
3.1. Présentation des milieux de culture…….	**50**
3.1.1. gélose nutritive……	**50**
3.1.2. Gélose au sang…….	**50**
3.1.3. Gélose Hektoen……..…….	**50**
3.1.4. Gélose Chapman……..…….	**50**
3.1.5. Gélose Cétrimide……..…….	**50**
3.1.6. Gélose MacConkey……...……	**50**
3.1.7. Gélose Muller Hinton ……..…….	**51**

3.1.8. Gélose au Rouge Congo…….	**51**
3.1.9. Bouillons nutritifs……	**51**
3.1.10. BHIB…….	**51**
3.1.11. Tampon PBS …….	**52**
4. Les techniques d'ensemencement…….	**52**
4.1. Ensemencement sur un milieu solide …….	**52**
4.1.1. La technique de 4 quadrants……	**52**
4.1.2. Technique du Beurrage …….	**52**
4.1.3. Ensemencement incliné en pente …….	**53**
4.1.4. Ensemencement en culot…….	**53**
4.1.5. Ensemencement en culot + pente……	**53**
4.2. Ensemencement sur un milieu liquide …….	**53**
5. Identefecation…….	**54**
5.1. Identification macroscopique…….	**54**
5.2. Identification microscopique…….	**54**
5.2.1. Coloration de Gram…….	**54**
5.2.2. Examen direct à l'état frais…….	**54**
4.3. Identification biochimique ……	**55**
6.3.1 Identification par enzymes respiratoires……	**55**
6.3.1.1. Test catalase…….	**55**
6.3.1.2. Test oxydase ……	**55**
6.3.2. Recherche des Entérobactéries ……	**56**
6.3.3. Recherche des Staphylocoques…….	**56**
6.3.4 Recherche des Pseudomonas……	**58**
6.3.5. Identification par galerie Api20 NE Api20 E Api STAPH …….	**58**
7. Antibiogramme……	**62**
8. Evaluation de la formation de biofilm …….	**63**
8.1. La technique des microplaques en titration……	**63**
8.2. La technique de Rouge de Congo…….	**69**
9. Aromatogramme de l'huile d'Eucalyptus……	**69**
9.1. La méthode gélosé des disques…….	**70**
9.2. Inhibition de la formation du biofilm par l'huile essentielle de l'Eucalyptus…….	**70**
Résultats	
1. Répartition des patients selon le sexe	**74**
1.1. Les prélèvements de pus…….	**74**
1.2. Les prélèvements de coproculture (selles)……	**74**
1.3. Les prélèvements urinaires ECBU……	**75**
2. Identification des souches……	**76**
2.1. Identification macroscopique……..	**76**
2.2. Identification microscopique……	**78**
3. Recherche des enzymes respiratoires (Test catalase et oxydase)……	**80**

3.1. Test catalase……..	**80**
3.3. Test coagulase…….	**81**
4. Identification biochimique……..	**81**
4.1. Tests biochimiques……..	**81**
4.2. Enrichissement Enzymatiques (urée +Test réductase I et II…….	**82**
4.3. Lecture des galeries biochimiques……	**83**
5. Antibiogramme……	**86**
5.1. Prédominance des souches résistantes selon espèce…….	**87**
5.2. Prédominance des souches résistantes selon différentes service…….	**88**
5.3. Prédominance des souches résistantes aux différents antibiotiques...	**89**
6. Répartition des souches isolées de 30 prélèvements……	**91**
7. L'évaluation de la formation de biofilm……..	**92**
7.1. Evaluation de la production de slim par la méthode au Rouge Congo	**92**
7.2. Réparation des 5 souches sur gélose Rouge Congo……..	**93**
7.3. Evaluation de la formation de biofilm par la technique de plaque culture de tissue (TCP)……	**93**
7.4. Evaluation de la formation de biofilm selon l'effet des sucres additionnés……..	**94**
7.5. Etude de la formation de biofilm en fonction de température…….	**95**
7.6. Inhibition de la formation de biofilm de l'huile essentielle d'Eucalyptus……	**95**
8. Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'Eucalyptus…	**96**
7. Discussion	**98**
8. Conclusion	**100**
9. Références bibliographiques	
10. Annexe	

Introduction

Introduction :

Les infections nosocomiales (IN) sont une réalité alarmante pour toute structure de santé. Ils posent un problème de santé publique important **(S. Jaffel et all. 2017).**

La situation est rendue encore plus alarmante par le fait que ces infections sont causées par des bactéries résistantes et des levures invasives, entraînent souvent une maladie prolongée, une mortalité accrue et des coûts de traitement accrus. Prise en charge des patients **(Chouchene I, Bouafia N, Ben Cheikh A, et al.1015, Rabi F. 2012).**

Les antibiotiques sont une découverte thérapeutique importante pour la santé humaine. Leur utilisation a longtemps réduit la mortalité et la morbidité globale. Cependant, le mésusage et l'utilisation accrue de ces antimicrobiens ont conduit à l'émergence de certaines formes de résistance des souches microbiennes qui contrecarrent l'efficacité de l'antibiotique **[Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, et al (2005).**

Les bactéries pathogènes peuvent développer des programmes de résistance spécifiques contre des antibiotiques spécifiques grâce à leur flexibilité génétique et leur plasticité. En effet, certaines souches peuvent rétablir simultanément plusieurs résistances à plusieurs antibiotiques, donnant naissance à des souches dites multirésistantes aux antibiotiques.

Les bactéries pathogènes qui posent un réel problème pour la santé humaine comprennent les Enterobacteriaceae, les Pseudomonadaceae et les Acinetobacteraceae, qui sont presque résistantes à tous les antibiotiques prescrits **[Chaudhary AS (2016)].**

On estime qu'environ 65 % de toutes les infections bactériennes sont associées à des biofilms bactériens. Cela inclut à la fois les infections liées à l'appareil et non liées à l'appareil.

Globalement**,** les biofilms jouent un rôle écologique important (**Ramey BE, Koutsoudis M, Von Bodman SB, Fuqua C. 2004).** D'une part, leur développement a de nombreuses implications négatives pour les procédés industriels et la médecine humaine, car la formation de biofilms bactériens et fongiques sur les prothèses et les cathéters contribue au développement d'infections liées à la santé **(Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999, Kilb B, Lange B, Schaule G, *et al. 2003*).**

Face à ce problème, de nombreuses recherches ont été menées pour développer des molécules alternatives efficaces contre ces infections. Les plantes médicinales et aromatiques sont des sources importantes de molécules bioactives qui peuvent être utilisées pour traiter les infections **[Talbaoui A, Jamaly N, Aneb M (2012) et Griffin SG, Wyllie SG, Markham JL (1999)].** En effet, les plantes et leurs dérivés, comme les huiles essentielles (HE), sont utilisés en médecine populaire depuis l'Antiquité.

Ces plantes sont connues pour leurs propriétés pharmacologiques **[Bouyahya A, Abrini J, Bakri Y, et al (2016) et Bouyahya A, Bensaid M, Bakri Y, et al (2016)]** et sont largement utilisées pour la conservation des aliments **[Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, et al (2008)].** Les huiles essentielles contient divers métabolites secondaires qui peuvent inhiber ou retarder la croissance microbienne **[De Martino L, de Feo V, Nazzaro F (2009)].** Les composants bioactifs des huiles essentielles ont des effets antibactériens spécifiques.

Synthèse bibliographique

Chapitre I :

Généralités sur les infections nosocomiales

1. Historique :

Les infections dites « nosocomiales » (du grec nosos : maladie et komein : prendre soin de …) existent depuis que l'on a regroupé géographiquement les malades pour tenter de leur porter assistance. Pendant de nombreux siècles, les notions d'infection communautaire et d'infection nosocomiale n'ont pas nécessité de discriminations sémantiques. Les premiers hôpitaux étaient organisés en salles communes et il existait une grande promiscuité dans les établissements de soin ce qui augmentait la probabilité pour les malades de contracter une infection nosocomiale.

Dans ces premiers hôpitaux, ce sont les germes communautaires qui décimaient les malades hospitalisés : variole, choléra, tuberculose, typhoïde, peste etc.… Cette situation va perdurer jusqu'au début du 19ème siècle où des progrès médicaux et architecturaux vont permettre de limiter le développement des infections hospitalières.

Sur le plan médical, en 1846, l'obstétricien Hongrois Semmelweis observe que les fièvres puerpérales sont 4 fois moins fréquentes si les accouchements sont effectués par des sages femmes, plutôt que par des étudiants en médecine. Il émet alors l'hypothèse que ces derniers qui pratiquent également des autopsies pendant leur journée de travail contaminent les parturientes par le biais de leurs mains. En imposant de façon systématique un lavage des mains aux étudiants, il réussit à faire passer la mortalité par fièvre puerpérale de 11,4% à moins de 1%. Quelques années plus tard, Joseph Lister dans un essai historique jette les bases de l 'asepsie chirurgicale pendant que Louis Pasteur et Robert Koch ouvrent l'ère de la microbiologie moderne. Tout cela va non seulement permettre de mieux comprendre la sémiologie, le mode de transmission, l'incubation, et la durée de contagiosité des principales bactéries pathogènes mais aussi de mettre en œuvre les mesures de prévention adaptées : isolement, asepsie, antisepsie, stérilisation, désinfection, vaccination et antibioprophylaxie. Avec la découverte des antibiotiques, le monde médical va croire pendant quelques années à l'utopie d'un monde sans infection mais la découverte de staphylocoques résistant à la pénicilline va vite sonner le glas de cette utopie.

Sur le plan architectural, au sein de chaque établissement médical des structures vont être construites pour permettre l'isolement des malades atteints de maladies infectieuses à forte contagiosité. C'est ainsi qu'en 1854 le premier hôpital pavillonnaire Lariboisière est construit à Paris. Quelques années plus tard, en 1945 des sanatoriums sont construits pour abriter les tuberculeux. Les hôpitaux modernes arrivent ensuite et sont de plus en plus organisés chacun se dotant de structures ou de programmes de prévention et de lutte contre les infections nosocomiales.

Semmelweis est aujourd'hui considéré comme l'inventeur de la lutte contre les infections nosocomiales. Son procédé de recueil systématique, d'analyse des données et d'institution des mesures de contrôle est encore utilisé de nos jours. De plus, sa découverte que les mains des soignants étaient le vecteur de transmission des germes d'un patient à un autre est toujours d'actualité. Les épidémies provenaient pour une grande part d'une méconnaissance complète des mesures d'hygiène et d'une transmission d'un malade à l'autre par les mains du personnel soignant(Le Rat, C.2010).

En 1874, Louis Pasteur déclarait, devant l'Académie des Sciences : « Si j'avais l'honneur

d'être un chirurgien, jamais je n'introduirais dans le corps de l'homme un instrument quelconque sans l'avoir fait passer dans l'eau bouillante ou mieux encore dans la flamme » (Ellenberg, E. 2005).

2. Présentation de l'infection nosocomiale :

Les infections nosocomiales sont des infections contractées dans un établissement de santé . Cette définition est devenue moins adaptée aux pratiques actuelles de soins. Elle a donc été actualisée en 2006 par le comité technique des infections nosocomiales et des infections liées aux soins (CTINILS) et a été intégrée de façon plus générale au sein des infections associées aux soins (IAS).

Une infection est dite associée aux soins si elle survient au cours ou au décours d'une prise en charge (diagnostique, thérapeutique, palliative, préventive ou éducative) d'un patient, et si elle n'était ni présente, ni en incubation au début de la prise en charge. Lorsque l'état infectieux au début de la prise en charge n'est pas connu précisément, un délai d'au moins 48 heures ou un délai supérieur à la période d'incubation est couramment accepté pour définir une IAS. Toutefois, il est recommandé d'apprécier dans chaque cas la probabilité de l'association entre la prise en charge et l'infection. Pour les infections du site opératoire, sont considérées comme nosocomiales les infections survenues dans les 30 jours suivant l'intervention ou dans l'année qui suit l'intervention si mise en place d'une prothèse ou d'un implant.

Les infections nosocomiales s'accompagnent d'une morbidité, d'une mortalité élevée et d'un surcoût du traitement difficile à chiffrer mais réel. Elles constituent un véritable problème médical et peut être un indicateur de la qualité des soins.

Les infections nosocomiales constituent un fléau mondial et un sérieux problème de santé publique et donc un sujet de préoccupation de la santé publique pour lequel l'impact en matière de morbidité et des dépenses de santé est aussi important que celui en matière de mortalité (**CHERAFA et al, 2017**).

Une enquête de prévalence réalisé par l'OMS dans 55 hôpitaux de 14 pays représente quatre régions OMS (Europe , Méditerranée orientale , Asie du sud –est et pacifique occidentale) a montré qu'en moyenne 8.7% des patients hospitalisés étaient touchés par une IN, et plus de 1,4 million de personnes dans le monde souffrent de complications infectieuses acquise à l'hôpital, les fréquences maximales ont été rapportées par l'OMS dans les hôpitaux des régions de la méditerranée orientale et l'Asie du sud –est (11.8% et 10.0% respectivement) et la prévalence atteignait 7.7% en Europe et 9.0% dans la partie occidental… **(Koumedjina Kossi V., 2019).**

Ainsi de nos jours, une possible transmission nosocomiale du nouveau coronavirus 2019 nCoV semble avoir été à l'origine de l'infection chez 41% des patients hospitalisés en janvier 2020 dans un hôpital de Wuhan en Chine, selon une étude rétrospective publiée vendredi dans le JAMA **(Coronavirus 2019-nCoV 2020).**

Définition :

Les infections nosocomiales (IN) aussi appelées « infections hospitalières » sont définies par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme des infections acquises pendant un séjour à l'hôpital et qui n'étaient ni présentes ni en incubation au moment de l'admission du patient « lorsque la situation précise à l'admission n'est pas connue, un délai d'au moins 48

heures après admission (ou un délai supérieur à la période d'incubation lorsque celle-ci est connue) est communément accepté pour distinguer une infection d'acquisition nosocomiale d'une infection communautaire » .

Jusqu'au milieu des années 1980, le risque infectieux nosocomial était sous-estimé. Ce risque a été longtemps négligé, même si la prévalence des infections nosocomiales est plus élevée. La prise de conscience de la réalité de ce phénomène, dans un contexte d'amélioration de la qualité des soins, a conduit à ériger la maîtrise du risque infectieux nosocomial en véritable priorité sanitaire . En 2009, l'OMS estimait que 1,4 millions de personnes étaient malades dans le monde de suite d´infections contractées en milieu hospitalier.

3. Classification des infections nosocomiales:

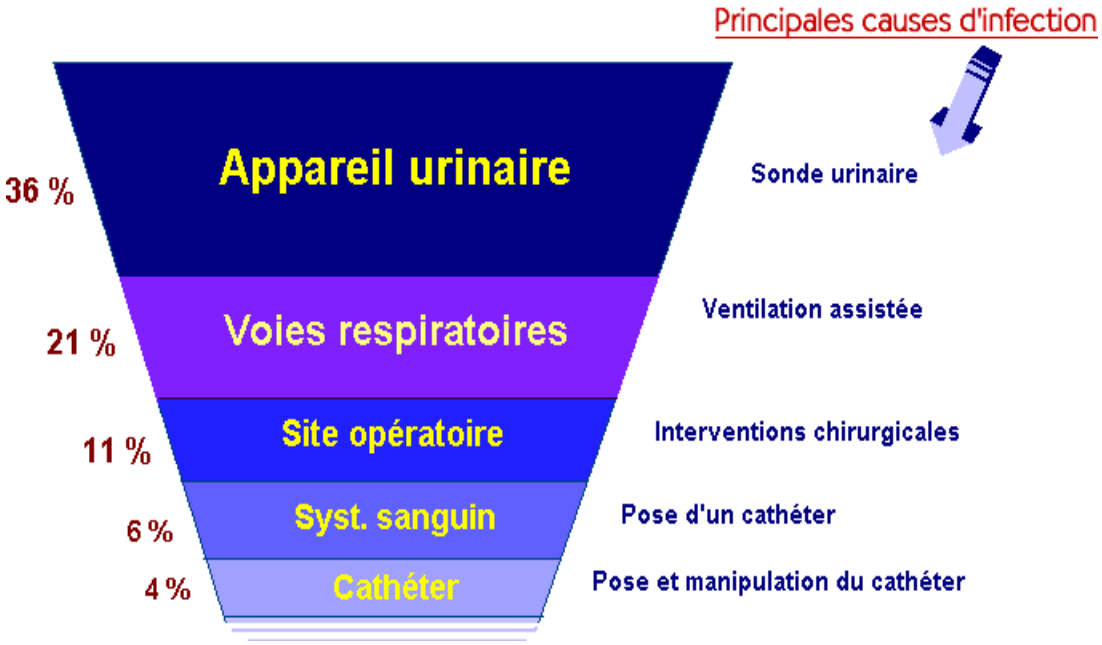


Figure 1 : Centre Hospitalier Comminges Pyrénées - les infections nosocomiales:2021

Les infections urinaires :

Liées à un sondage vésical à demeure définies selon des critères microbiologiques coproculture quantitative positive leur fréquence de survenue varie en fonction de l'origine des patients ; par exemple très fréquentes en réanimation avec une incidence de 30% (Theirry L., 2016), mais elles sont liées à une plus faible morbidité que les autres infections liées aux soins, cependant elles peuvent dans certains cas provoquer une bactériémie potentiellement mortelle **(Madi S., Djema K., 2019).**

Bactéries responsables : - normale (*Escherichia coli*) - acquise à l'hôpital (*Klebsiella* multi résistantes).

Les infections du site opératoire :

Les infections du site opératoire (ISO) représentent 14% des IN, les classant ainsi en 3e position des IN les plus fréquentes, soit une origine endogène (flore cutanée ou flore présente sur le site opératoire ou, dans de rares cas, sang utilisé en préopératoires), soit exogène (air, matériel médical, chirurgiens et autres soignants) (**Madi S., Djema K., 2019).**

On distingue 3 catégories d'infection du site opératoire :

Infection superficielle : survenant dans les 30 jours suivant l'intervention, et affectant la peau (ou les muqueuses), les tissus sous-cutanés.

Infection profonde du site opératoire : survenant dans les trente (30) jours suivant l'intervention, ou dans l'année, s'il y a eu mise en place d'un implant, d'une prothèse ou d'un matériel étranger.

Infection de l'organe ou du site ou de l'espèce qui survient elle aussi dans les trente (30) jours suivant l'intervention, ou dans l'année, s'il y a eu mise en place d'un matériel étranger, impliquant les organes ou espaces (autres que l'incision) ouverts ou manipulés durant l'intervention (CLIN., 1988).

Les pneumopathies :

Celles-ci sont en majorité associées à la mise en place d'une ventilation mécanique, Une pneumonie nosocomiale (P.N) est une infection du parenchyme pulmonaire acquise survenant chez un patient hospitalisé dans un délai d'apparition de 48 à 72h. la pneumopathie nosocomiale acquise sous ventilation mécanique (P.N.A.V.M) s'observe généralement chez les patients sous ventilation artificielle, où leur taux atteint 3% (**Madi S., Djema K., 2019)**. Ce qui constitue un réel fléau au sein des unités de soins intensifs.

Les septicémies :

L'utilisation de DM (dispositifs médicaux) est associée à la plupart des cas de septicémies nosocomiales, que ce soient les dispositifs intra-vasculaires (comme les chambres de perfusion veineuse) ou les cathéters centraux ou périphériques. **(Monnet, T., 2011).**

4. Transmission :

Etant donné la diversité des agents pathogènes (ou potentiellement pathogènes) présents en milieu hospitalier et l'état d'affaiblissement de l'hôte, il faut constamment prêter attention aux voies de transmission (**Tortora G R et al. 2003**). Les principaux modes de propagation des infections nosocomiale bactériennes peuvent se faire par contact cutané, aéroportée, par gouttelettes (postillons), transmission orofécale (aux toilettes), transmission croisée entre malades ou via l'ersonnel, ou encore par contamination d'environnement hospitalier (eau air matériel, aliments…) (**Lafourie L., 2020).** Il existe quatre grands mécanismes de transmission :

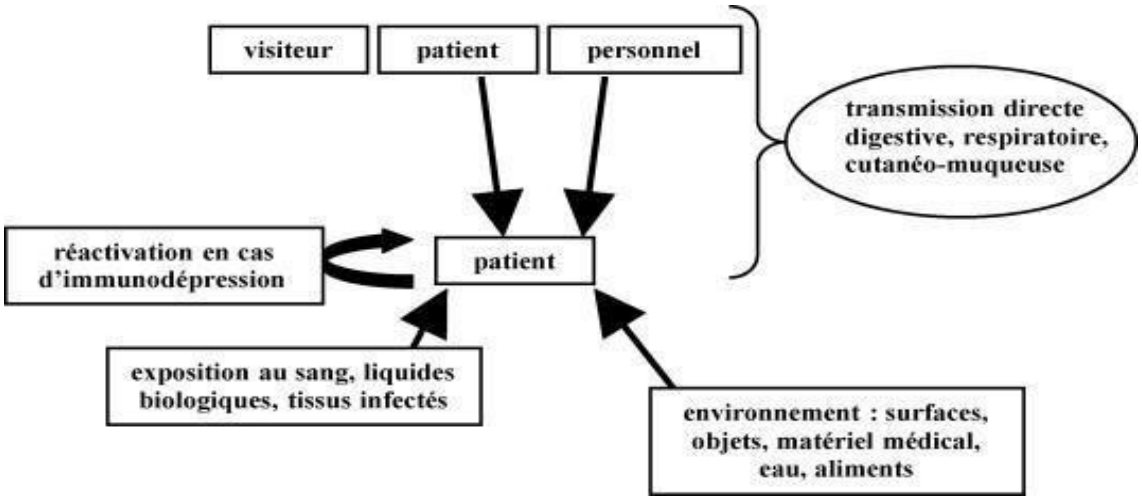


Figure 2 : Modes de transmission des infections nosocomiales

Les voies de transmissions :

Voie endogène = Auto-infections :

C'est lorsque le malade peut s'infecte soit par ses propres germes in situ soit à partir de l'environnement immédiat ou il les dispersés (vêtements, surface de la peau, lit) (**Madi S., Djema K., 2019)**. Les portes d'entrée sont les lésions des muqueuses, les lésions cutanées ; les germes à potentiel infectieux sont les bactéries de la peau, de la surface des muqueuses, les germes intestinaux disséminés sur les téguments **(Othniel H., 2002).** Ces infections sont dues généralement aux germes saprophytes comme certaines bactéries ou levures qui deviennent pathogènes à la suite d'une antibiothérapie à spectre large (administrant un médicament sélectionnant) itérative ou d'un traitement immunosuppresseur ou corticostéroïdes (diminuant la résistance du patient) (**Samou Fosto H S., 2005**).

Voie exogène =Hétéro-infection :

Dans ce cas, l'agent infectieux d'une infection acquise chez un malade peut être transporté chez un autre malade et provoque une infection dite croisée ou hétero-infection. L'agent infectieux est rarement transmis par contact direct ou par voie aérienne, le transfert peut se produire en touchant, en embrassant, en toussant, en éternuant ou dans certains cas par l'intermédiaire des particules de poussières. Le plus souvent le vecteur est le personnelsoignant par ses mains, et ou ses instruments de travail. On parle d'infection manu portée ou d'infection transmise par le matériel d'exploration ou de soin. C'est le mode de contaminationmajeure lors de nombreuses épidémies et probablement le plus sensible aux mesures prophylactiques traditionnelles **(Hygis N., 1998)**

5. Les facteurs favorisants les infections nosocomiales :

L'OMS estimait que 1,4 millions de personnes étaient malades dans le monde de suite d´infections contractées en milieu hospitalier. La fréquence globale des infections nosocomiales mesurée par des études internationales, variée de 5 à 10 % des hospitalisations **(Hamza, R., 2010)**.

Facteur lié à l'état du patient :

Au premier rang de ces facteurs favorisants les infections nosocomiales figure l'affaiblissement des défenses immunitaires (immunodépression) cet affaiblissement peut être lies à des facteurs physiologiques tels que l'âge (nouveau-nés, vieillards), la grossesse ou la malnutrition ou encore à des affections qui peuvent amoindrir le système immunitaire (diabète, cancer, des multiples comorbidités, situation de stress après traumatisme grave, intervention chirurgicale, comas). Le risque est inversement proportionnel à la résistance de l'hôte, Il y a également l'infections nosocomiales induites chez les sujets neutropeniques (leucocytes sanguins inférieur à1000/mm3).

Facteur lié à un processus aigue :

En raison des vulnérabilités qui peuvent être innée (intrinsèque) ou acquise, les individus sont toujours susceptibles aux infections nosocomiales.

Les causes innées comprennent en particulier les immunodéficiences primaires, inclus les maladies d'origine génétique qui affectent le fonctionnement du système immunitaire (déficiences des anticorps, des cellules phagocytaires, etc...).

Ce groupe de facteurs de risque infectieux est constitué par toutes les atteintes du système nerveux central qui abolisse certains réflexes (réflexes nauséeux et épiglottes ou certaines fonctions (mictions).

Facteur lié à une intervention invasive :

Un autre facteur de risque fréquemment rencontré est aux agressions de la barrière anatomique cutanéo-muqueuse ; il peut s'agir d'interventions chirurgicales et de nombreux procédés iatrogènes lésant le revêtement cutanéo-muqueux (endoscopies respiratoires digestives ou génito-urinaires sondes et cathéters...) et permettant l'inoculation directe des bactéries dans la circulation sanguine (cathétérisme vasculaire, injections veineuses, explorations hémodynamique ponctions sternales...)

Facteur lié aux traitements :

L'état de la flore microbienne chez les personnes hospitalisées est également un important facteur de risque cette flore est souvent profondément altérée chez les patients pour de nombreuses raisons ; incluant la malnutrition, le diabète, les toxicomanies (héroïne, alcool) cependant, c'est surtout l'utilisation intensive d'antibiotique à large spectre sur les populations hospitalisées, qui est à l'origine de la sélection de bactéries souvent résistantes à des nombreux antibiotiques et devenues ainsi inaccessible aux traitements antibiotiques habituels.

6. Caractères de certaines bactéries d'importance clinique :

L'agent infectieux est un microorganisme transmissible. Il peut être une bactérie, un virus, un champignon, un parasite ou un prion. Il appartient soit à la flore endogène (microorganismes de l'individu) ou à la flore exogène (Source externe de l'usager).

Les bactéries représentent 90% de l'étiologie des infections hospitalières dont les principaux micro-organismes responsables étaient multi-résistantes aux antibiotiques, avec une prédominance croissante des BGN, y compris la famille des *Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa et Acinetobacter baumannii*

.(**K, Amazian, et al., 2010**).

Les bactéries nosocomiales ont une grande vitalité, leur croissance est possible sur divers milieux de culture sélectifs en utilisant divers substrats, leur Culture est possible en milieu minimum Aérobies strictes ou facultatives et à des températures croissante très variable allant de 4°C à 45°C et possèdent une grande Aptitude d'adhérence par le biais de biofilm **(Menidjel, N., 2017).**

Les bacilles à Gram négatif :

Entérobactéries :

Le nom «*Enterobacteriaceae-entérobactérie*» fait référence à la localisation de cette famille de microorganismes dans le tube digestif et principalement le côlon de l'homme et des animaux, bien qu'ils soient également présents dans l'environnement.

Les entérobactéries sont parmi les souches les plus fréquemment isolées chez les patients hospitalisés, elles sont souvent responsables d'infections urinaires, pulmonaires, de septicémies mais également d'autres infections intra-abdominales. Les entérobactéries incriminées sont : *E. coli, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae, Citrobacter freundii.*

- ***Escherichia coli :***

E. coli, appelée communément « colibacille », Chez l'homme, la colonisation par E. coli est précoce, et peut être responsable d'un nombre varié de pathologie. Toutefois, trois types de syndromes majeurs résultent de l'infection par des souches E. coli pathogènes : les infections urinaires (impliqué dans 80 % des infections urinaires), les infections digestives (diarrhées, infections hépatobiliaires et autres), et les méningites néonatales et septicémies. (**Pozzetto, B., 2009).**

- ***Klebsiella pneumoniae :***

L'espèce type de ce genre est *K. pneumoniae*, c'est une espèce très répandu dans la nature (sol et eau), saprophyte des voies respiratoires supérieures. *K. pneumoniae* est un pathogène à fort potentiel épidémique fréquemment impliqué dans des infections sévères. De nombreuses épidémies nosocomiales causées par cette bactérie ont été décrites : infections suppuratives, urinaires, respiratoires, biliaires qui peuvent être à l'origine de bactériémie et surtout de septicémie de pronostic sévère. (**Pozzetto, B., 2009).**

- ***Enterobacter cloacae :***

Les *Enterobacter* se rencontrent souvent dans le sol et dans l'eau; ils peuvent se loger dans les intestins d'humains et d'animaux et peuvent aussi se trouver dans les eaux usées. Les espèces du genre *Enterobacter*, en particulier *E. cloacae* et *E. aerogenes*, sont des pathogènes responsables d'infections nosocomiales diverses, y compris la bactériémie, les infections des voies respiratoires et urinaires, l'endocardite, les infections intra abdominales et ophtalmiques, l'arthrite septique et les ostéomyélites**.** *E sakazakii* est l'agent d'infections rares mais sévères touchant particulièrement les très jeunes enfants, les personnes âgées et les sujets immunodéprimés. (**Pozzetto, B., 2009).**

- ***Citrobacter freundii* :**

Les *Citrobacter freundii*. Le réservoir de ces bactéries est l'intestin de l'humain et desanimaux, sol, eau, eaux usées et aliments. Les *C. freundii* sont des agents pathogènes hospitalières opportunistes rares qui entraînent normalement des infections des voies urinaires, des bactériémies, des sepsis abdominaux

et des abcès cérébraux ainsi que des pneumonies et d'autres infections néonatales, dont la méningite, le sepsis néonatal, l'infectionarticulaire et la bactériémie. (**Pozzetto, B., 2009).**

***Pseudomonas aeruginosa* :**

P. aeruginosa autrement connue sous le nom de bacille pyocyanique (bacille du "pus bleu"). P. aeruginosa est une bactérie de l'environnement mais peut être commensal du tube digestif, saprophyte des environnements humides. Depuis l'émergence de cette espèce en tant que pathogène opportuniste majeur, de nombreuses épidémies hospitalières ont été décrites, elle est responsable d'infections pulmonaires, des sites opératoire et de bactériémies.

Ce sont des bactéries aérobies strictes qui sont caractérisées par un mode de production énergétique, ne faisant pas intervenir la fermentation. Elles sont ubiquitaires retrouvées dans l'environnement (eaux, sols, air…). *P. aeruginosa* et *A. baumannii* sont des pathogènes opportunistes, souvent isolées dans les laboratoires de microbiologie médicale, notamment dans les unités de soins intensifs (**Bouguenoun W., 2017).**

Les Cocci à Gram positif :

Bien qu'il n'y ait aucune preuve directe, c'est évident que l'environnement des patients colonisés par des bactéries Gram positives sert comme un réservoir potentiel de transmission, les cocci Gram positive sont la cause de 30% des infections associées aux soins.

Staphylococcus aureus :

Appelée aussi staphylocoque doré, elles peuvent survivre longtemps sur des objets inanimés et secs et résistent aussi relativement bien à la chaleur. Elles ont pour habitats : les fosses nasales et les mains d'individus sains.

Cette espèce est un pathogène nosocomial important, elle est responsable d'infections cutanées et muqueuses ainsi que des septicémies, le plus souvent acquises au cours des hospitalisations. *S. aureus* (plus précisément les résistantes à la méticilline) est impliquée dans 30–40% des infections hospitalières. Ces infections sont graves du fait de leur polymorphisme et de la multirésistance des souches (**Bouguenoun W., 2017).**

Enterococcus faecium :

E. faecium est après E. faecalis, une des espèces du genre Enterococcus, la plus fréquemment isolées chez l'homme. Elle fait partie de la flore digestive de l'homme et des animaux et peut par contamination de voisinage coloniser la peau, notamment la région et le vagin.

E. faecium est la responsable de 5% 0 10% des infections à entérocoques. Cette espèce est essentiellement responsable d'infection urinaire et peut causer des suppurations diverses et des bactériémies, d'endocardites évoluant sur un mode subaigüe, sur valves natives ou sur prothèses, et survenant après explorations digestives ou urologique, d'infection intra-abdominale (biliaires…) de suppurations diverses (**LART., 2010 ; Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie Clinique., 1973).**

7. Incidence et fréquence des infections nosocomiales :

L'épidémiologie des infections nosocomiales est bien connue mondialement grâce à plusieurs enquêtes et études réalisées depuis plusieurs années par les personnels de santé, afin de surveiller l'évolution de ces infections.

- le 1er septembre 1971 et le 31 août 1972, la surveillance des infections à l'hôpital général d'Ottawa – Canada a révélé que le taux global d'infection était de 13.5 %, dont 5.6 % étaient d'origine communautaire, tandis que 7.9 % étaient d'origine nosocomiale. Ces chiffres sont comparables à ceux des hôpitaux équivalents aux États-Unis et inférieurs à ceux rapportés par le Boston City Hôpital, mais ils indiquent néanmoins que plus de la moitié des patients infectés à l'hôpital ont été infectés après leur admission. Les infections urinaires représentaient 44.8 % de toutes les infections nosocomiales. Le taux d'infection postopératoire de la plaie était de 3.9 % et ne représentait que 18 % des infections nosocomiales… (**Westwood J C et al., 1974).**

- en 1984, une étude a été effectuer sur l'incidence et le pronostic à court terme des infections bactériennes néonatales chez 3833 nouveau-nés admis en 12 unités de soins intensifs et/ou néonatals en Ile-de-France (région parisienne). Une septicémie était présente dans 3% de la population totale, une méningite purulente dans 6% et une infection urinaire dans 1,4%. Les chercheurs ont constaté une forte incidence de streptocoques du groupe B (26 % des septicémies) et d'*E. coli* (18 % des septicémies)… **(Lejeune C et al., 1986).**

- Entre juillet et décembre 1994, 25 patients atteints de la bactériémie SARM ont été traités à l'hôpital Kuala Lumpur, un hôpital tertiaire en Malaisie. Les sources de leur SARM étaient déférentes parmi les 25 cas 24% ont été enregistré dans les unités de soins intensif généraux, et 19 infections ont été prises en compte nosocomial. Au total, 13 patients (52 %)sont décédés ; 9 de ces décès étaient attribué à la bactériémie du SARM… **(Cheong I et al., 1996).**

- Au cours de la période du 9 au 27 mars 2001, sept nouveau-nés ont développé une bactériémie, et trois ont eu une infection liée au cathéter ombilical (sans bactériémie) dansl'unité de soins intensifs néonatals de l'hôpital Farhat Hached de Sousse (Tunisie). Tous les isolats ont été identifiés comme *Pseudomonas, putida*….

- Entre (2011-2012) dans la région de l'Océanie. Une étude rétrospective menée dans la plus grande unité de soins intensifs des Fidji a révélé que 114 des 663 admissions en unité de soins intensifs chez les adultes avaient une infection nosocomiale confirmée par culture bactériologique. Les sites d'infection les plus courants étaient les voies respiratoires et la circulation sanguine. Les bactéries à Gram négatif étaient les pathogènes isolés les plus courants. Le taux de mortalité chez les personnes ayant un résultat connu était de 33 %… (**Naidu K et al., 2011).**

- Une enquête a été menée pour évaluer les infections nosocomiales dans l'Union européenne entre mai et juillet 2017. Au total, 1062 réponses de quatre sous-régions européennes ont été analysées. Les infections par des bactéries MDR dans leur unité de soins intensifs ont été classées comme un problème majeur par 257 (24.2%), un problème modéré par 360 (33.9%) et un problème mineur par 391 (36.8%) répondants. Les entérobactéries étaient les bactéries les plus fréquemment rencontrées, suivies de *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas aeruginosa* et des entérocoques… (**Lepape A et al., 2020).**

- En 2020 Une étude en Algérie dans laquelle 100 échantillons ont été prélevés sur des surfaces, du petit équipement et des instruments médicaux. Les résultats ont montré que (80%) étaient positifs. Les bactéries les plus isolées étaient : 27.50% pour *Micrococcus spp.* et *Corynebacterium spp.* , 25% *Staphylococcus spp.* , 21.25% *Bacillus spp.* , 20% *Enterococcus spp.* , 10 % *Enterobacter cloacae*, 5 % *Klebsiella pneumoniae* et 3.75 % *Pseudomonas aeruginosa*… **(Baghdadi et al., 2020).**

8. Stratégies pour minimiser les infections nosocomiales :

Afin de lutter contre les infections hospitalières, la première règle d'or établie par Ignaz Semmelweis concernant l'hygiène des mains et les méthodes de nettoyage de désinfection. Le professeur Stephan Harbarth infectiologue HUG déclare dans une interview que seulement 20% ou 30% aux maximums des IN sont à l' origine extérieur donc de 70% jusqu'à 80% des infections nosocomiales sont d'origine endogène.

Les responsable de la santé travaillent en coordination avec l'équipe opérationnel d'hygiène hospitalière et les infirmiers spécialisé en hygiène par un programme annuel de lute contre les infections liées aux soins ce programme comporte des actions de : prévention, formation, surveillance et évaluation.

Organisation mondiale de la santé OMS :

L'OMS a publié dans la 2ème édition prévention des infections nosocomiales quelques protocoles permettant de stopper ou minimiser la transmission d'agents infectieux de patient à un autre durant les activités de soins par le lavage adéquat des mains et le port de gants, et en observant des pratiques et stratégies d'asepsie, d'isolement, de stérilisation, de désinfection et de blanchisserie appropriées :

1- Maitriser les risques infectieux lies a l'environnement.

2- Protéger les patients par l'usage approprie d'anti infectieux a titre prophylactique,par l'alimentation et par les vaccinations.

3- Limiter le risque d'infection endogène par la réduction des gestes invasifs etpar lapromotion d'un usage optimal des anti-infectieux.

4- Surveiller les infections, identifier et maitriser les flambées.

5- Assurer la prévention des infections chez les membres du personnel.

6- Renforcer les pratiques de soins et assurer la formation continue du personnel…(Organisation mondiale de santé. 2002).

La méthode KAIZEN :

Kaizen, qui est la contraction de deux mots japonais, signifie « changement positif » ou « amélioration ». Une méthode efficace pour améliorer la gestion administrative des établissements de santé, comme observé dans plusieurs pays. Elle contribue, en effet, àrenforcer la capacité organisationnelle et à améliorer la capacité individuelle et permet d'organiser l'environnement de travail sûr et efficace et de résoudre autant que possible les problèmes avec logique (**WMC avec TAP : KEISEN., 2020**).

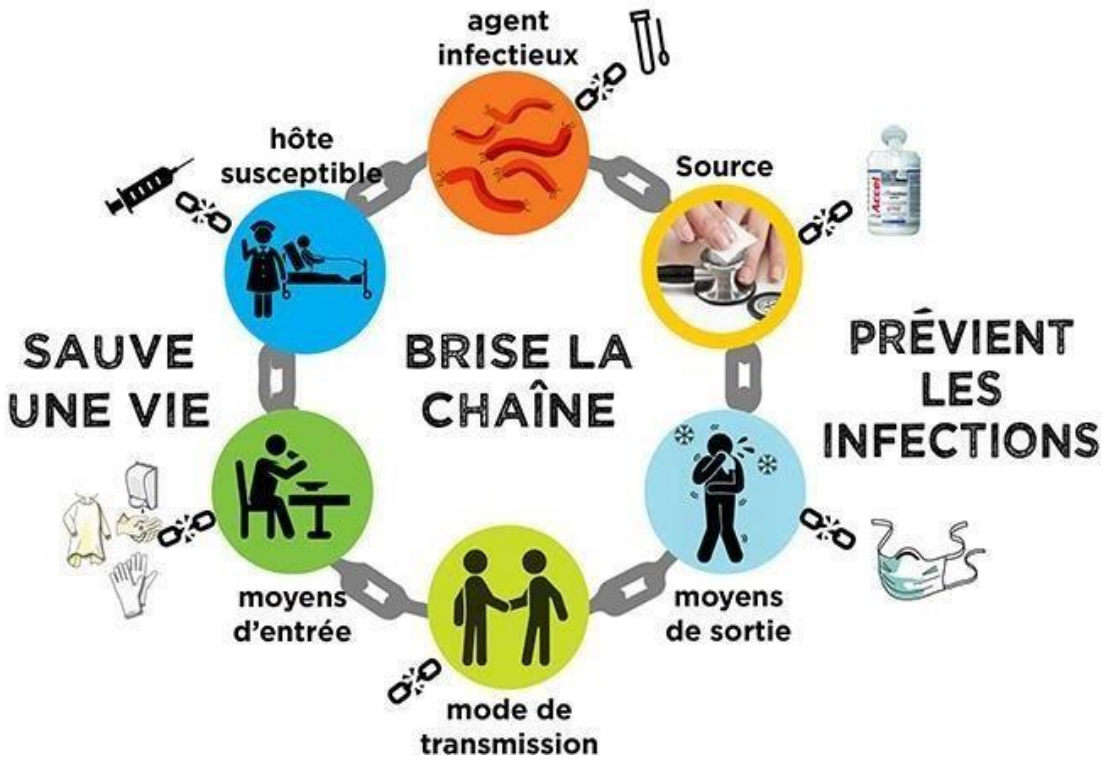


Figure 3 : Prévention des maladies nosocomiales OMS 2020

Revêtement colorant photo-dynamique :

L'idée de base est que le revêtement empêche ou au moins réduit la formation de réservoirs et par conséquent contrôle la propagation des agents pathogènes. Les surfaces sont revêtues d'une solution contenant une molécule de colorant photo dynamique. Il sèche rapidement et laisse une couche mince et durable derrière. Lorsque la surface revêtue est exposée à la lumière, elle génère un oxygène hautement réactif (oxygène singulet) qui tue les bactéries et les virus à la surface.

La technologie a été déjà testée dans deux hôpitaux La comparaison des surfaces revêtues et non revêtues a montré que la charge bactérienne est considérablement plus faible sur les surfaces revêtues.

L'avantage d'un revêtement antimicrobien est qu'il offre une protection permanente sans l'intervention du personnel. Cela signifie également que la désinfection de surface et le revêtement antimicrobien se complètent. Cela valable jusqu' au moins un an. Le revêtement est conçu pour être peint ou appliqué rétroactivement en l'essuyant sur la surface (Désinfection : Antibacterial coating on surface in the ICU., 2021).

9. La relation entre le biofilm et les infections nosocomiales :

Le biofilm formé sur les implants médicaux provoque un certain nombre d'infections microbiennes, et environ 3790 millions de dollars par an sont dépensés dans le monde pour traiter et diagnostiquer les infections des voies urinaires associées aux cathéters liées au biofilm.

Le biofilm formé sur les dispositifs médicaux tels que les cathéters ou les implants entraîne principalement des infections chroniques, car les cellules détachées du biofilm mature entraînent une dissémination et une transmission de l'infection difficiles à éradiquer.

Les infections associées au biofilm ont touché des millions de personnes et causé des décès dans le monde entier. Selon le Center for Disease Control (CDC), environ 65 % des maladies infectieuses chroniques 18 sont dues au biofilm microbien [14]. Les dispositifs médicaux implantés représentent environ 60 à 70 % des infections nosocomiales [15], [16]. Il est largement rapporté que la résistance antimicrobienne du biofilm a causé environ 30 millions de décès et a un impact économique majeur sur les services de santé. Les infections associées aux appareils représentent environ 25,6 % de toutes les infections liées aux soins de santé aux États-Unis

L'émergence d'infections associées au biofilm peut être en partie surmontée par des systèmes d'administration d'antimicrobiens tel qu'un hydrogel libérant un antibiotique qui augmente concentration, pénétration et mise à mort. Cependant, ces systèmes présentent initialement une libération à haute rafale et libération à queue basse qui développent un danger de résistance aux antibiotiques. Une autre stratégie pour contrôler l'infection associée au biofilm est l'utilisation de peptides naturels/synthétiques antimicrobiens. Cependant, leur utilisation a des limites qui persisteront lorsqu'elles seront traitées à grande échelle. La thérapie de phase est également utilisé pour contrôler l'infection du biofilm, mais son mécanisme d'interaction détaillé avec les bactéries et les humains hôte est encore peu clair, ce qui le rend non applicable à grande échelle [19], [20]. Le besoin de

Le développement de nouvelles thérapies antimicrobiennes indique le besoin urgent de stratégies alternatives. **(Pranjali P. Mahamuni-Badiger.2019)**

Chapitre II :
Etude de l'antibiorésistance des bactéries

1. Généralité sur les antibiotiques

Historique :

Le premier antibiotique synthétique, l'arsphénamine **(Fig.4),** a été préparé en 1907 et utilisé pour le traitement de la syphilis **(Alt 1909).** Les médicaments à base d'arsenic avaient un usage limité et étaient toxiques pour les hôtes humains et les bactéries.

Il est bien connu que les produits naturels isolés de micro-organismes sont à l'origine de la plupart des antibiotiques actuellement sur le marché. La découverte du pénicille et son utilisation en clinique dans les années 1940 ont été suivies par la découverte d'un grand nombre d'antibiotiques provenant de microbes, en particulier de membres des actinomycètes et des champignons.

Une autre classe d'antibiotiques, les sulfamides, a été identifiée et commercialisée **(Domagk 1935**). La Seconde Guerre mondiale a mis l'accent sur la pénicilline et la recherche sur les antibiotiques, et au cours des deux décennies suivantes, un certain nombre de classes différentes d'antibiotiques ont été découvertes : Aminoglycosides (**Schatz et al. 1944**), tétracyclines (**Duggar 1948**), macrolides (**McGuire et al. 1952**), glycopeptides (**McCormick et al. 1956**), quinolones (**Lesher et al. 1962**) etc.

En fait, les antibiotiques et les produits naturels sont des termes intimement liés. Le mot antibiotique a été créé à l'origine pour désigner les composés naturels ayant des propriétés antimicrobiennes (**Strohl WR. 2005)**, il est vrai que la plupart des antibiotiques commercialisés, même dans un passé récent, sont basés sur des chémotypes naturels. Ainsi, 70 des 90 antibiotiques commercialisés au cours des années 1982-2002 provenaient de produits naturels (N**ewman DJ, Cragg GM, Snader KM. 2003).**

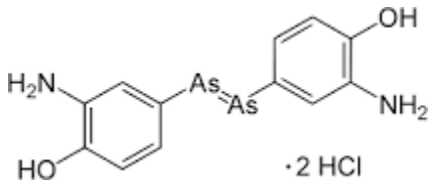


Figure 4: le premier antibiotique (Arsphénamine)

Qu'est-ce qu'un antibiotique ?

En 1947, S. A. Waksman a défini le terme "antibiotique" comme suit : "Un antibiotique est une substance chimique, produite par des micro-organismes, qui a la capacité d'inhiber la croissance et même de détruire les bactéries et autres micro-organismes". Aujourd'hui, le terme "antibiotique" a plusieurs significations : un produit chimique organique d'origine naturelle ou synthétique qui inhibe ou tue les bactéries pathogènes ; ou toute substance antimicrobienne indépendamment de son origine naturelle, semi-synthétique ou synthétique.

Exemples :

- La Pénicilline est produite par un champignon "*penicillium notatum* ".
- Le Chloramphénicol est un antibiotique de synthèse chimique.

Les antibiotiques sont définis par leur :

- activité antibactérienne (spectre d'activité),
- toxicité sélective (mode d'action),
- activité en milieu organique (pharmacocinétique),
- bonne absorption et diffusion dans l'organisme.

Mécanismes d'actions :

Les antibiotiques bloquent la croissance des micro-organismes sensibles en inhibant l'action d'une molécule, généralement une macromolécule, comme une enzyme ou un acide nucléique, essentielle à la multiplication cellulaire. La molécule antibiotique est capable de se lier à un site spécifique sur la macromolécule cible, formant un complexe moléculaire. Pour déterminer le mécanisme d'action d'un antibiotique, il faut identifier la macromolécule cible et sa fonction. Il est généralement plus facile d'identifier la fonction bloquée que la macromolécule particulière impliquée, et c'est pourquoi on parle d'antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi cellulaire, des protéines ou de l'ARN, la réplication de l'ADN ou la fonction membranaire, selon ce qui semble être l'effet principal de l'antibiotique. Certains antibiotiques sont des antimétabolites, agissant comme des inhibiteurs compétitifs. Ceux-ci sont structurellement similaires aux métabolites normaux, tels que les acides aminés ou les coenzymes, et se lient à l'enzyme dont le métabolite est le substrat ou le cofacteur, l'inactivant ainsi. La sélectivité d'action de l'antibiotique est généralement liée à son mécanisme d'action.

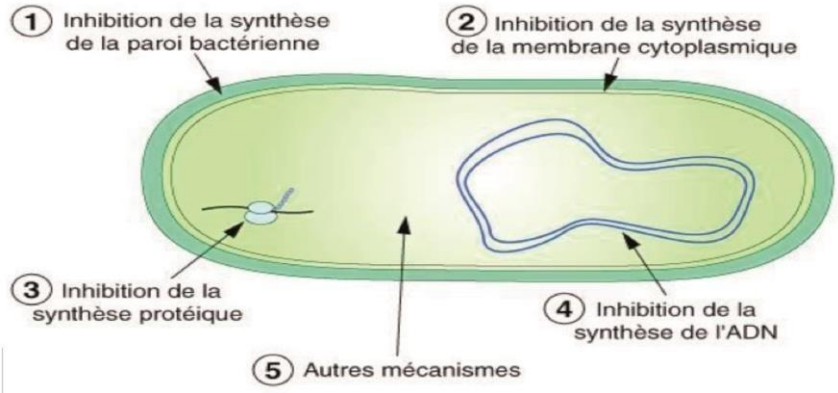


Figure 5 : Mécanismes d'actions des antibiotiques

Principales classes des antibiotiques :

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action. Tout en adoptant la classification des antibiotiques en grandes familles, nous étudierons également le mécanisme d'action ainsi que le spectre d'action des différents antibiotiques.

Antibiotiques ß-lactamines (pénicillines et céphalosporines) :

Les pénicillines ont été les premiers antibiotiques à être utilisés en thérapie et sont considérées comme les médicaments de premier choix pour le traitement de nombreuses infections. Les pénicillines et la céphalosporine, forment le groupe des antibiotiques ß-lactamines, appelés ainsi en raison de la présence dans leur molécule d'un amide cyclique à quatre atomes. Ils ont d'abord été isolés de champignons des genres *Penicillium* et *Cephalosporium*. Il a été démontré que les actinomycètes des genres *Streptomyces* et *Nocardia*, ainsi que certaines bactéries gram-négatives, produisent des antibiotiques ß-lactames. Du point de vue de la biosynthèse, les antibiotiques ß-lactames sont dérivés de la polymérisation d'acides aminés.

Mécanisme d'action des ß lactamines : Les antibiotiques ß-lactamines inhibent la synthèse du peptidoglycane, un composant de base de la paroi cellulaire bactérienne, provoquant des dommages irréversibles. Ce sont donc des antibiotiques bactéricides. Ils ne sont pas actifs contre les champignons, dont la paroi cellulaire ne contient pas de peptidoglycane, ni contre les mycoplasmes, qui n'ont pas de paroi cellulaire.

Spectre d'action : Le spectre d'action des premières pénicillines, telles que la pénicilline G, largement connue, était limité aux bactéries à Gram positif et à certains cocci à Gram négatif et, en outre, une diffusion rapide de souches résistantes a été observée. Des modifications chimiques ont permis d'obtenir des dérivés plus ou moins efficaces contre presque toutes les bactéries gram-négatives. Les mêmes résultats ont été obtenus avec les dérivés de la céphalosporine C originale faiblement active.

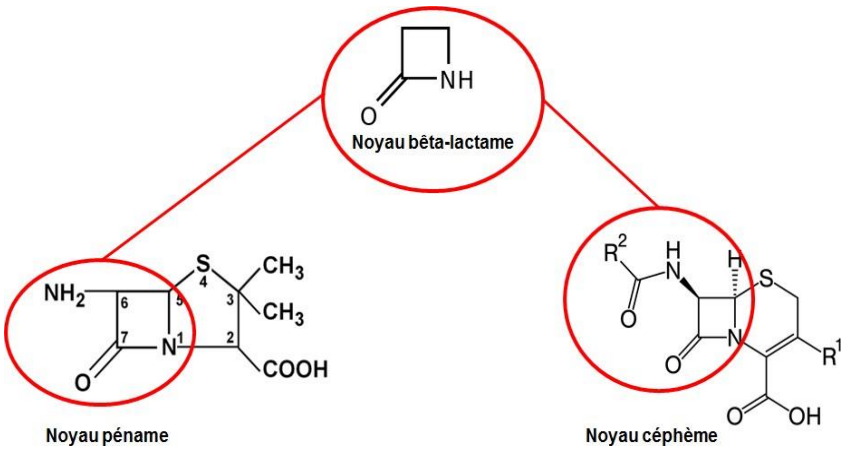


Figure 6 : Bêta-lactamines (pénicillines- céphalosporines) **(Cavallo et al. 2004 ; Ruppé, 2010)**

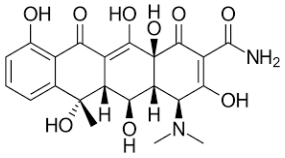
Les Tétracyclines :

Cette famille d'antibiotiques se caractérise par son très large spectre d'action et par sa grande efficacité thérapeutique. Elle ne comprenait à l'origine que la chlortétracycline, l'oxytétracycline et la tétracycline, cette dernière étant la plus utilisée en clinique. Les tétracyclines sont des produits de différentes souches de *Streptomyces*. Elles sont biosynthétisées

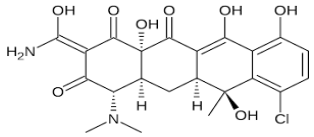
par cyclisation d'une chaîne obtenue par condensation d'unités acétate et malonate. La structure chimique consiste en quatre anneaux condensés linéairement, d'où leur nom.

Mode d'action : Ils agissent en empêchant la synthèse des protéines ribosomales. L'effet est réversible et, par conséquent, ce sont des agents bactériostatiques.

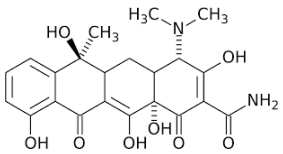
Le spectre d'activité : Leur spectre d'activité est particulièrement large, incluant les bactéries gram-positives et gram-négatives, les rickettsies, les chlamydiae, et certains protozoaires.



Tétracycline



Chlortétracycline



Oxytétracycline

Figure 7 : les antibiotiques de la famille des tétracyclines.

Les Aminosides (Aminoglycosides) :

Ils forment une grande classe de substances produites par les membres des genres *Streptomyces, Micromonospora et Bacillus*. Elles se caractérisent chimiquement par la présence d'un aminoalcool cyclique auquel sont liés des sucres aminés. L'alcool aminé et les sucres aminés sont tous deux dérivés du glucose par voie biosynthétique.

Mode d'action : Les antibiotiques aminoglycosides inhibent la synthèse des protéines de manière irréversible en interagissant avec les ribosomes, avec un effet bactéricide. La streptomycine, le premier aminoglycoside connu, a été découverte grâce à un programme de recherche systématique visant à isoler un antibiotique efficace contre les organismes à Gram négatif.

Spectre d'action : Le spectre d'action des aminosides est large, agissant sur les bacilles Gram négatifs aérobies notamment les entérobactéries et sur les bacilles à Gram positif (*Listeria*). L'action est inconstante sur les cocci en général. Ils sont actifs sur les *staphylococcus aureus* sécréteurs de pénicillinase, sur les cocci à Gram négatif, *Neisseria meningitidis* et *Neisseria gonorrhoeae*. Ces antibiotiques sont inactifs sur les streptocoques, pneumocoques, les entérocoques et les anaérobies.

Cas particulier : la streptomycine est active sur les mycobactéries. Elle est réservée pour le traitement de la tuberculose (toxicité auditive).

Des programmes de recherche intensifs menés au cours des dernières décennies, visant à isoler des dérivés actifs contre les nombreuses souches résistantes, ont permis d'isoler ou de synthétiser, entre autres, la kanamycine, la gentamicine, la tobramycine, l'amikacine et la nétilmicine, qui sont actives contre bactéries insensibles à la streptomycine.

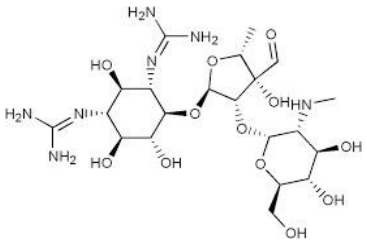


Figure 8 : Streptomycine le premier aminoglycoside

Les Quinolones :

Les quinolones ont une structure générale dérivant de l'acide dihydro 1,4 oxo 4 quinoleine carboxylique. La première molécule des quinolones est Negram® (acide nalidixique). Depuis, plusieurs molécules ont été synthétisées pour exalter le pouvoir antibactérien et améliorer les caractéristiques pharmacocinétiques. Schématiquement on peut classer les quinolones sur la base de l'étendue du spectre antibactérien et la nature fluorée ou non du squelette en deux groupes :

- Les quinolones de première génération appelés aussi les quinolones classiques (urinaires) tels que l''acide nalidixique : Negram®, l'acide oxolinique : Urotrate®, etc.
- Les quinolones de deuxième génération : On retrouve dans le groupe les fluoroquinolones tels que Ciprofloxacine : Ciflox®, Ofloxacine : Oflocet®, etc.

Mode d'action : Les quinolones inhibent la synthèse de l'ADN de la bactérie en se fixant sur le complexe "ADN-ADN gyrase" en empêchant la réplication et transcription de l'ADN bactérien.

Spectre d'activité : Les quinolones de 1ère génération ont à peu près le même spectre d'activité dirigé essentiellement contre les bactéries à Gram négatif excepté *Pseudomonas spp*.

Les fluoroquinolones ont un spectre élargi, on retrouve les bactéries à Gram négatif, les cocci à Gram positif dont l'activité est 100 à 1000 fois plus élevée que celles des quinolones de 1ère génération (sauf streptocoques et pneumocoques)**.** L'ofloxacine et la Ciprofloxacine ont une activité sur *Mycobacterium tuberculosis*.

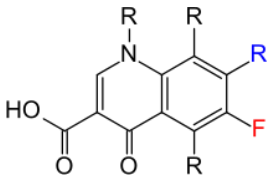


Figure 9 : Structure de base des quinolones **(Andriole, 2005).**

Les Macrolides :

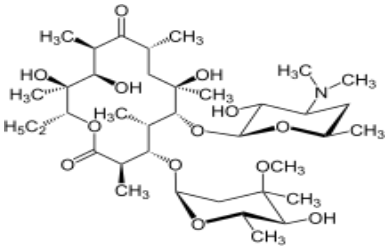
La structure chimique de ces antibiotiques est caractérisée par un cycle composé d'au moins 12 atomes de carbone et fermé par un groupe lactone. Ils sont des produits typiques des Streptomyces. Ils semblent être biosynthétisées par condensation d'un certain nombre d'unités acétate et propionate

.

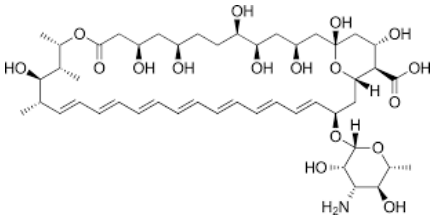
Les macrolides peuvent être subdivisés en deux classes homogènes :

1. Macrolides antibactériens, caractérisés par la présence de cycles lactone de 14 ou 16 atomes de carbone, avec au moins deux molécules de sucre. Ils inhibent de manière réversible la synthèse des protéines en interagissant avec les ribosomes avec une action bactériostatique. Leur spectre d'activité est limité aux bactéries gram-positives et aux mycoplasmes. Le représentant typique de cette class est l'érythromycine.

2. Macrolides antifongiques et antiprotozoaires, caractérisés par des cycles lactone d'environ 30 atomes, avec des substituants hydroxyle et comportant une série de doubles liaisons conjuguées (de 4 à 7). Pour cette dernière caractéristique, ils sont également appelés polyènes (tétraènes, pentaènes, etc.). Ils induisent des déformations des membranes cellulaires en interférant avec les stérols. Ils ne sont donc pas actifs contre les bactéries, qui ne contiennent pas de stérols dans leur membrane cytoplasmique, mais seulement contre les champignons et certains protozoaires. Leur toxicité oblige à limiter leur utilisation aux cas les plus graves. Le représentant le plus connu de cette famille est l'amphotéricine B, un heptaène.



Erythromycine



Amphotéricine B

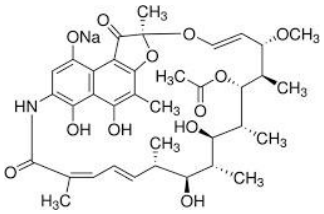
Figure 10: Macrolides antibactériens (Erythromycine) et macrolides antifongiques et antiprotozoaires (Amphotéricine B).

Les Ansamycines :

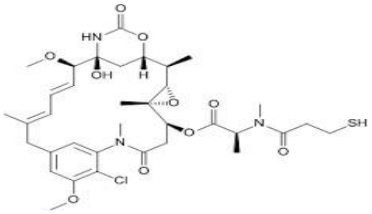
Il s'agit d'une famille d'antibiotiques, introduits en usage thérapeutique à la fin des années 1960, qui présentent une structure typique : une chaîne aliphatique qui relie deux points opposés d'un cycle aromatique, comme l'anse d'un panier ou d'une anse (d'où leur nom). Ils sont produits par des souches de plusieurs genres de l'ordre des Actinomycetales. Leur biosynthèse ressemble à celle des antibiotiques macrolides, c'est-à-dire la condensation d'un certain nombre d'unités acétate et de propionate. Les ansamycines peuvent être divisées en deux groupes, les naphtalènes et les benzènes, selon le type de cycle aromatique présent.

Les ansamycines naphténiques, les plus importantes, sont antibactériennes et inhibent sélectivement l'enzyme ARN polymérase. Parmi les ansamycines naphtaléniques, on trouve les rifamycines, qui sont très actives contre les bactéries gram-positives et les mycobactéries. Si les rifamycines naturelles ne sont pas utilisées en thérapie, certaines rifamycines semi-synthétiques ont un rôle chimio thérapeutique, comme la rifamycine SV, utilisée contre les infections des voies biliaires, et la rifampicine (aux Etats-Unis, rifampin), particulièrement active contre *Mycobacterium tuberculosis* et les staphylocoques. La fréquence des mutants résistants à la rifampicine est assez élevée, et elle varie d'une espèce à l'autre.

Les ansamycines benzéniques sont moins sélectives dans leur action, et ont été étudiées comme agents antitumoraux potentiels. Il est intéressant de noter que la maytansine, qui appartient à cette class, est un produit végétal.



Rifamycine SV

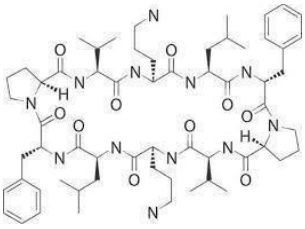


Maytansine

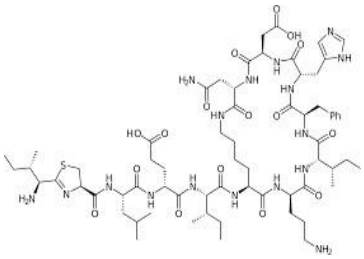
Figure 11 : Ansamycines naphténiques (Rifamycine SV) et ansamycines benzéniques (Maytansine)

Antibiotiques peptidiques :

La structure chimique de ces antibiotiques consiste en une chaîne d'acides aminés, souvent dosés dans un anneau. Ils sont produits par une grande variété de micro-organismes par des voies de biosynthèse différentes de la synthèse des protéines. Les premiers antibiotiques isolés ont été la gramicidine et la bacitracine. Ils sont tous deux actifs contre les bactéries gram-positives ; le premier interfère avec les fonctions membranaires et le seconde est un inhibiteur de la synthèse du peptidoglycane. Les membres les plus récents de cette famille sont la daptomycine et la ramoplanine, deux inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire, qui sont actuellement en cours de développement.



Gramicidine



Bacitracine

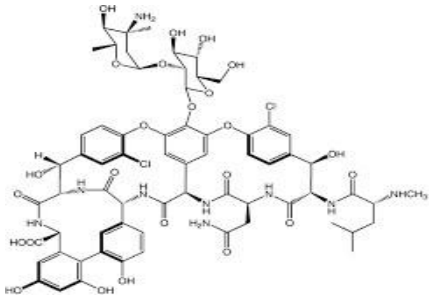
Figure 12 : les premiers antibiotiques peptidiques

Antibiotiques glycopeptidiques (Dalbaheptides) :

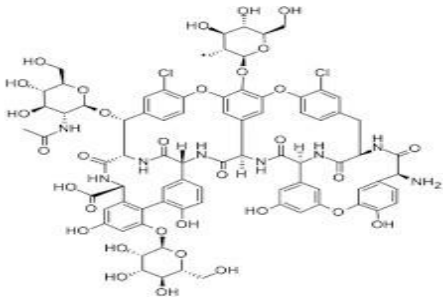
Ce sont des heptapeptides linéaires, dont au moins cinq des résidus d'acides aminés sont représentés par des cycles benzéniques, qui sont reliés entre eux pour former des groupes diphényle et triphényle éther. Ces cycles portent divers substituants, comme des hydroxyles, des atomes de chlore et des sucres. Leur mécanisme d'action implique la formation d'un complexe avec le fragment terminal D-alanyl-D-alanyl des intermédiaires de la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne. Les mutants résistants sont très rares.

Le nom proposé de dalbaheptides dérive des deux caractéristiques décrites (heptapeptide de liaison D-alanyl-D-alanyl). Les membres importants de cette classe sont : la vancomycine, produite par *Amycolatopsis orientalis*, et la teicoplanine, un mélange de cinq substances très

similaires produites par *Actinoplanes teichomyceticus*, qui sont actives contre les bactéries gram-positives, en particulier les staphylocoques résistants aux ß-lactames.



Vancomycine



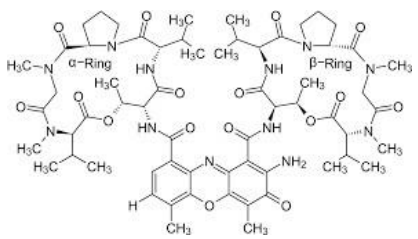
Teicoplanine

Figure 13 : les antibiotiques de la famille des dalbaheptides

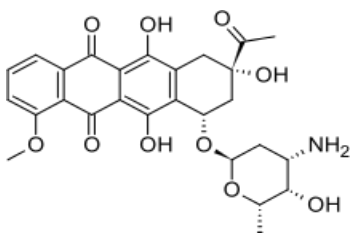
Antibiotiques antitumoraux :

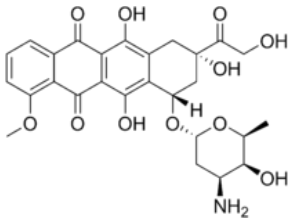
Ils appartiennent à des classes chimiques différentes mais agissent tous sur la réplication de l'ADN par des mécanismes différents. Les actinomycines, constituées d'un cycle phénoxazine portant comme substituants deux cycles peptidiques identiques. Elles s'intercalent entre les bases de l'ADN avec les groupes aromatiques, affectant la fonctionnalité de l'ADN. Dans les cellules eucaryotes elles interfèrent principalement avec la synthèse de l'ARN.

Les membres cliniquement importants de la class sont les anthracyclines (daunorubicine et doxorubicine), qui ont une structure tétracyclique portant un substituant sucre. Elles provoquent des ruptures dans les filaments d'ADN en interférant avec l'enzyme topoisomérase. La mitomycine C a une structure tricyclique et agit en formant des liaisons covalentes reliant deux filaments d'ADN. La bléomycine, un mélange de neuf composants peptidiques produits par *Streptomyces verticillus*, provoque des ruptures dans les filaments d'ADN par une réaction quasi-enzymatique.

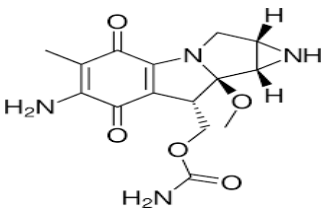


Actinomycine D

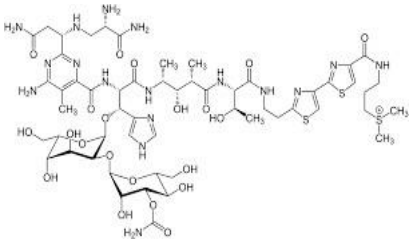




Anthracyclines (Daunorubicine et Doxorubicine)



Mitomycine



Bléomycine

Figure 14: différentes classes des antibiotiques antitumoraux

Antibiotiques divers :

Certains antibiotiques utilisés en thérapie ne peuvent être classés dans aucune des familles décrites jusqu'ici. En voici quelques-uns :

Le chloramphénicol, isolé à l'origine de *Streptomyces venezuelae*, a depuis été produit synthétiquement. C'est l'un des rares composés naturels qui contiennent un groupe nitro. Il inhibe la synthèse des protéines et est bactériostatique. Il est très efficace dans la guérison des infections par des bactéries gram-négatives, en particulier contre les salmonelles.

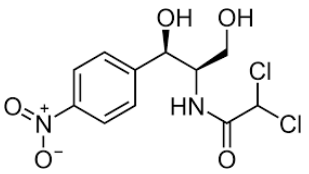
La lincomycine ressemble à l'antibactérien macrolide dans son mécanisme d'action (inhibition de la synthèse des protéines) et dans son spectre d'activité (limité aux bactéries gram-positives), et en fait elle démontre une résistance croisée partielle à l'érythromycine. Chimiquement, il est complètement différent, étant composé d'un acide aminé modifié condensé avec un sucre aminé complexe. Elle est particulièrement active contre certaines bactéries anaérobies. La clindamycine, l'un de ses dérivés semi-synthétiques, possède des propriétés similaires.

La novobiocine, active contre les bactéries gram-positives et Proteus, interfère avec l'ADN en inhibant l'une des sous-unités de l'enzyme gyrase. L'acide fusidique, produit par un champignon, a une structure de type stéroïde et est actif contre les micro-organismes gram-positifs, en inhibant l'un des facteurs d'élongation de la synthèse protéique.

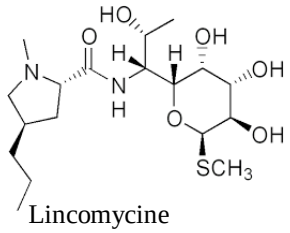
La fosfomycine, initialement obtenue à partir de *Streptomyces griseus* et maintenant produite par synthèse chimique, inhibe la synthèse du peptidoglycane et est bactéricide. Elle possède un spectre d'action assez large, mais présente une fréquence élevée de mutants résistants.

La griséofulvine est un médicament antimycotique. Elle est produite par un champignon et possède une structure aromatique, dérivée biosynthétiquement de la condensation d'unités acétate et malonate. Il s'agit d'un inhibiteur de la formation du cytosquelette.

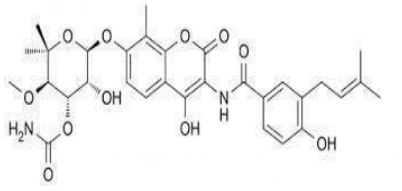
La mupirocine est un antibiotique relativement récent, purifié à partir d'un extrait de *Pseudomonas fluorescens*, dont l'activité est connue depuis le début de ce siècle. Elle inhibe la synthèse des protéines en interférant avec l'enzyme lysyl ARNt synthétase. Il possède un large spectre d'action, mais n'est pas actif de manière systémique, mais uniquement de manière topique.



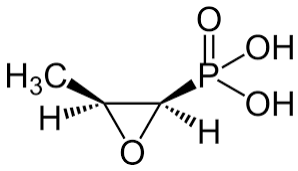
Chloramphénicol



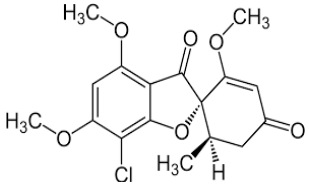
Lincomycine



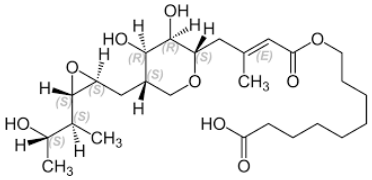
Novobiocine



Fosfomycine



Griséofulvine



Mupirocine

Figure 15 : autres classes d'antibiotiques

La chimiothérapie :

La chimiothérapie, traitement médicamenteux des maladies infectieuses, repose sur la capacité des antibiotiques (et de certaines autres substances chimiques) à inhiber la multiplication du micro-organisme infectant sans effet toxique intolérable sur les cellules ou les fonctions métaboliques de l'organisme humain. Des dizaines de milliers de composés ont été synthétisés chimiquement et testés pour leur activité antimicrobienne et seuls quelques-uns se sont avérés posséder les caractéristiques nécessaires à une utilisation clinique, qui peuvent être classés comme suit :

1. Activité contre un ou plusieurs micro-organismes pathogènes. Il est souhaitable qu'un antibiotique à large spectre ou à spectre étroit ait une faible propension à sélectionner la résistance et il est préférable, bien que non essentiel, qu'il ait également un effet bactéricide.

2. Bonne absorption et distribution. Pour être efficace, un antibiotique doit être absorbé, atteindre le site de l'infection et y rester à des concentrations inhibitrices pendant une durée suffisante. Il doit être éliminé de l'organisme dans un délai raisonnable pour éviter une accumulation et des conséquences toxiques potentielles.

3. Absence de toxicité. L'antibiotique doit être dépourvu de toute toxicité intolérable pour l'hôte aux doses thérapeutiques. Les effets indésirables graves ne sont tolérables que si l'antibiotique est destiné à être utilisé dans des maladies qui sont extrêmement graves ou potentiellement mortelles.

2. La résistance bactérienne aux antibiotiques :

Définition de la résistance :

La résistance aux antimicrobiens est un terme relatif qui est basées sur différents critères (génétiques, biochimiques, microbiologiques et cliniques). Les définitions les plus fréquemment employées se fondent sur les critères microbiologiques (résistance in vitro) et clinique (in vivo). Selon la définition microbiologique du terme, une souche est dite résistante lorsqu'elle se cultive en présence de concentration plus élevée en antibiotique comparativement à d'autres souches qui lui sont phylogénétiquement liées. Par conséquent, la résistance est une propriété qui ne peut être étudiée que par comparaison d'au moins deux souches, dont l'une de référence souvent appelée souche sauvage et développée en laboratoire à partir d'individus prélevés dans la nature, d'une même espèce ou d'un même genre, cultivées dans les mêmes conditions. Selon la définition clinique, une souche est qualifiée de résistante lorsqu'elle survit à la thérapie antibiotique mise en place. En outre, il est important de signaler, qu'en conditions *in vivo*, la capacité de résistance ou de sensibilité de la souche à la thérapie antimicrobienne mise en place sera dépendante de différents paramètres, tels que la localisation de la bactérie, le dosage et le mode d'administration de l'antibiotique, et l'état du système immunitaire de l'individu traité. Et nombreuses sont les situations où le composé ne pourra pénétrer ou agir au niveau du site infectieux, créant de la sorte un état de résistance clinique.

Causes de la résistance :

Les antibiotiques sont une découverte thérapeutique importante en pratique médicale [**Levy SB (1992)].** Ils ont joué un rôle important dans le traitement des infections microbiennes. Ces molécules ont également permis de surmonter les complications dans certaines situations, notamment la transplantation d'organes. Avec le temps, les microbes ont développé certaines formes de résistances vis-à vis de ces antibiotiques [**Turner M (2011)**]. Ce phénomène de résistance est dû à plusieurs facteurs tels que l'utilisation suboptimale des antibiotiques au cours des traitements [**Finland M (1979**)]. Son émergence est due également à l'hospitalisation prolongée, la longue durée des séjours et les comorbidités, le non-respect des pratiques hygiéniques et le transfert des malades entre les hôpitaux [**Palumbi SR (2001**)].

Origine de la résistance :

La résistance bactérienne aux antibiotiques aurait deux origines essentielles, naturelles et acquise. La première est programmée au niveau du pool génomique alors que la seconde est développée en fonction des conditions métaboliques

[Julian D, Dorothy D (2010)].

Résistance naturelle :

C'est une résistance intrinsèque, commune à une population, due essentiellement à la présence de gènes spécifiques [**Allen HK, Donato J, Wang HH, et al (2010)**]. Elle se caractérise par des modifications structurales, dans le cas de la membrane externe des bactéries à Gram–, et métaboliques voir une insensibilité totale, à tous les membres d'un groupe de bactéries, vis-à-vis d'une molécule particulière ou vis-à-vis d'une classe d'antimicrobiens.

L'absence ou la réduction de sensibilité à un antibiotique peut être due à : (i) un manque d'affinité du composé pour la cible bactérienne (par exemple, la faible affinité de l'acide nalidixique pour la gyrase des entérocoques), (ii) une inaccessibilité de la molécule à la cellule bactérienne (imperméabilité de la membrane externe des bactéries Gram négatives aux glycopeptides comme la vancomycine), (iii) une expulsion de l'antibiotique par des pompes à efflux chromosomiques (résistance aux tétracyclines, au chloramphénicol et aux quinolones chez Pseudomonas aeruginosa, ou encore (iv) une inactivation enzymatique innée de l'antibiotique (la production d'une bêtalactamase AmpC chez certains membres de la famille Enterobacteriaceae).

Résistance acquise :

Elle est due à des modifications dans le profil d'expression génique via des mutations ponctuelles ou acquises. Grâce à ce processus, les bactéries partagent entre elles des informations génétiques, ce qui leur confère un très grand pouvoir d'adaptation aux milieux environnementaux qu'elles habitent [**Springman AC, Lacher DW, Milton GWN, et al (2009)].** On décrit deux phénomènes majeures à la base de l'acquisition de résistances par modifications du génome bactérien, à savoir, les mutations responsables des résistances endogènes, et l'acquisition horizontale de matériel génétique étranger responsable des résistances exogènes. En outre, certaines résistances résultent de l'association d'une mutation et d'un transfert horizontal de gène, comme par exemple les événements conduisant à l'élargissement du spectre des bêta-

lactamases ou leur confèrent une résistance aux inhibiteurs de bêta-lactamases (**Guardabassi et Courvalin, 2006**).

Mécanismes de résistance aux antibiotiques :

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques ont été largement étudiés, et de nombreuses cibles des fonctions cellulaires ont été impliquées dans ces mécanismes [**Giedraitiene A, Vitkauskiene A, Naginiene R, et al (2011)**]. Les sites de la résistance sont variables entre les espèces bactériennes, et ils sont classés en plusieurs voies. Dans certains cas, au sein de la même souche bactérienne, on peut trouver plusieurs mécanismes de résistance différents (**Fig.16**). Les mécanismes de résistance ont été décrits chez plusieurs souches bactériennes telles que Pseudomonas aeruginosa [**Marshall BM, Ochieng DJ, Levy SB (2009)**].

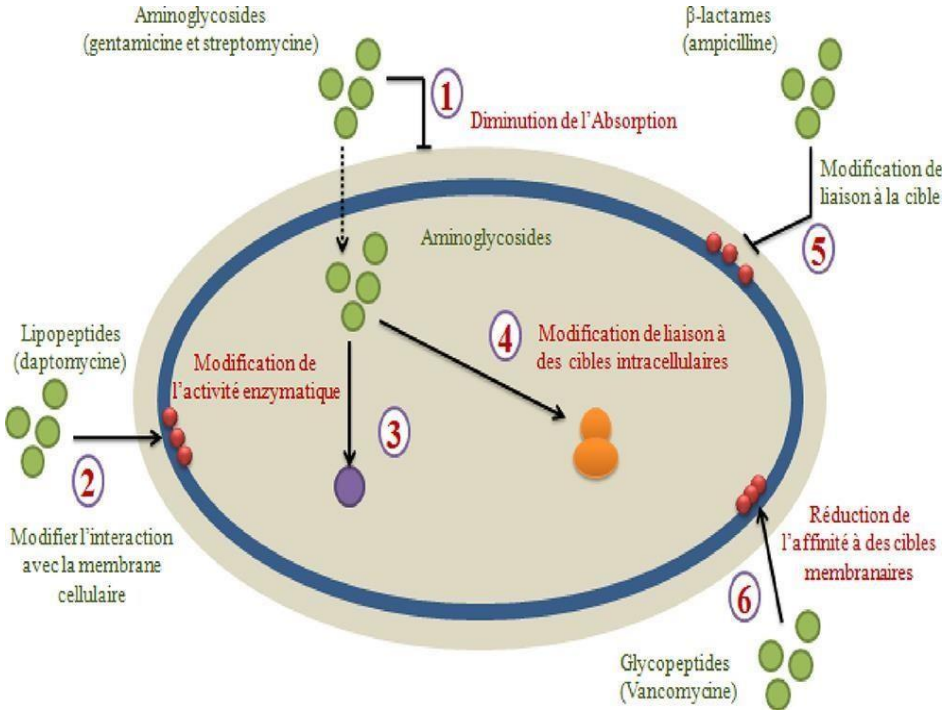


Figure 16 : Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques. Les bactéries possèdent différents modes de résistance aux antibiotiques. 1) Diminution de l'adsorption des aminoglycosides. 2) Modification de l'interaction des lipopeptides avec la membrane cellulaire. 3) Modification de l'activité enzymatique des aminoglycosides. 4) Modification de liaison des β-lactamines à des cibles intracellulaires. 5) Modification de liaison à des cibles membranaires. 6) Réduction de l'affinité des glycopeptides à des cibles membranaires.

Inhibition d'antibiotiques :

Certaines bactéries synthétisent des enzymes qui inhibent l'action des antibiotiques en dégradant ou en modifiant ce dernier. La modification des antibiotiques peut se faire de différentes façons selon les réactions chimiques catalysées (l'acétylation, la glycosylation, la nucléotidylation, la substitution, la ribosylation et/ou la phosphorylation). La modification induite, par ces enzymes, peut inactiver certains antibiotiques tels que les aminoglycosides, le chloramphénicol, les streptomycines les macrolides et les rifampicines ou bien diminuer leurs affinités vis-à-vis de leurs cibles [**Dzidic S, Suskovic J, Kos B (2008)**]. Les enzymes qui réalisent le blocage et/ ou la dégradation des antibiotiques sont diverses. Par exemple, la β-lactamase est une métalloenzyme (possédant le zinc comme cofacteur) détruisant les

antibiotiques de la famille des β-lactamines [**Jacoby GA, Munoz-Price LS (2005)**]. D'autres enzymes telles que les acétyltransférases, les nucléotidyltranférases et les phosphotransférases sont connues par leurs capacités à modifier l'affinité des antibiotiques de la famille des aminoglycosides. Les bactéries, en fait, partagent souvent les opérons responsables de l'expression de ces enzymes, même parfois via le transfert horizontal [**Jacoby GA, Munoz-Price LS (2005)**].

Modification des cibles des antibiotiques :

Le deuxième mécanisme de résistance est celui qui affecte les cibles des antibiotiques. Dans certaines situations, la bactérie modifie l'affinité de ses protéines de liaison à des antibiotiques spécifiques. Par exemple, certaines souches pathogènes telles que *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* et *Shigella dysenteriae* modifient l'affinité des protéines de liaison à la pénicilline (penicillin-binding proteins, PBP), ce qui leur permet de résister à des antibiotiques de la famille des β-lactamines (les antibiotiques qui ciblent spécifiquement les enzymes de synthèse de la paroi bactérienne) [**Poole K (2004)**]. Aujourd'hui, d'autres protéines de liaison à la pénicilline ont été décrites telles que la protéine dite PBP2a (penicillin-binding protein 2a) qui diminue l'affinité de l'oxacilline et autres antibiotiques de pénicilline chez *Staphylococcus aureus* [**Tenover FC (2006)**]. En plus de la modification enzymatique, certaines souches pathogènes mobilisent le positionnement de leurs organites pour échapper à l'action des antibiotiques. Par exemple, les ARN ribosomiques de méthylation (rRNA methylase), suite à des mutations chromosomiques, modifient l'emplacement topologique des ARNr 16S vers des positions spécifiques privilégiant ainsi ces complexes de l'action des antibiotiques de la famille des Aminoglycosides [**Jana S, Deb JK (2006)**].

Empêchement de l'entrée de l'antibiotique :

Certaines souches bactériennes empêchent les antibiotiques de rentrer dans la cellule bactérienne, et cela grâce à un mécanisme de transport particulier dit pompe à efflux qui leur permet d'exporter les antibiotiques à l'extérieur [**Li XZ, Nikaido H (2009)**].

Bases génétiques de la résistance :

Quelle que soit la nature de la résistance, innée ou acquise, elle s'établit via des allèles spécifiques dans le pool génétique d'une souche bactérienne. L'origine de la diversité génétique est due essentiellement à deux phénomènes globaux : les mutations chromosomiques ou parfois des hypermutations et le transfert horizontal de gènes entre les espèces de nature différente [**White DG, Alekshun MN, McDermott PF (2005)**].

Mutations chromosomiques : Elles peuvent se produire spontanément lors de la réplication de l'ADN (en absence d'un vrai système de réparation). Cette marque génétique donne lieu à des protéines biochimiquement modifiées. Ce type de mutation est plus étudié chez *Escherichia coli* dont la mutation du gène gyrA lui confère une forte résistance [**Hooper DC (1999)**]. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, une mutation dans le gène mexR cause la répression de l'opéron mexAB-oprM et confère la multirésistance à cette souche pathogène [**Adewoye L, Sutherland A, Srikumar R, et al (2002)**].

Hypermutation : L'hypermutation est un phénomène génétique qui désigne un état transitoire durant lequel une souche bactérienne subit un taux de mutation très élevé, permettant ainsi l'acquisition de la résistance aux antibiotiques. Cet état a été montré chez certaines souches pathogènes telles que *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Helicobater pylori* [**Dzidic S, Suskovic J, Kos B (2008)**]. D'autres souches bactériennes utilisent cette stratégie pour lutter contre d'autres agents pathogènes [**Dzidic S, Suskovic J, Kos B (2008)**].

Transfert des gènes : Les espèces microbiennes partagent des éléments génétiques entre elles d'une manière perpétuelle. Cet échange est appelé transfert horizontal du matériel génétique. Ce transfert est généralement réalisé grâce à trois phénomènes essentiels :

- ✓ la transduction : le transfert des gènes via les bactériophages
- ✓ la transformation : l'incorporation par une bactérie des fragments d'ADN libérés par d'autres bactéries.
- ✓ la conjugaison : le transfert des fragments via des plasmides conjugatifs [**Sommer MOA, Dantas G, Church GM (2009)**].

Le transfert des gènes peut se produire entre des bactéries phylogénétiquement éloignées, essentiellement entre les bactéries à Gram+ et celles à Gram– [**Courvalin P (1994)**]. Le transfert horizontal des gènes a donné lieu à une résistance aux différentes classes d'antibiotiques telles que les aminoglycosides, les céphalosporines et les fluoroquinolones [**Nordmann P, Poirel L (2002)**]. Dans certains cas, les éléments transposables (éléments mobiles qui se transposent d'une manière intra- ou interchromosomique) portent avec eux des copies des gènes via les trois mécanismes de transfert possibles : la conjugaison, la transformation et la transduction [**Giedraitiene A, Vitkauskiene A, Naginiene R, et al (2011)**].

D'autres éléments responsables du transfert des gènes entre les bactéries sont appelés les intégrons. Ce sont des fragments d'ADN connus sous le nom des cassettes des gènes que les bactéries s'intègrent dans certaines régions d'ADN chromosomique via un mécanisme de recombinaison d'une manière site spécifique [**Liebert CA, Hall RM, Summers AO (1999)].** Ces éléments transfèrent des gènes impliqués dans la résistance bactérienne aux antibiotiques. Les intégrons ne sont pas des éléments mobiles, mais leurs associations avec d'autres facteurs de transfert et d'insertion les rendent mobiles [**Holmes AJ, Gillings MR, Nield BS, et al (2003)**]. Les mécanismes d'acquisition des intégrons ont commencé à être connus, et certaines cassettes de gènes responsables sont décrites aujourd'hui tels que les intégrons codant pour les lactamases de type métalloenzyme qui confèrent la résistance au carbapénème [**Nordmann P, Poirel L (2002)**].

Les bactéries multirésistantes :

Les bactéries multirésistantes (BMR) aux antibiotiques ont été découvertes dans les années 1950 avec la mise en évidence des plasmides, vecteurs génétiques hébergeant plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques et pouvant diffuser entre bactéries. Pendant de nombreuses années, la découverte régulière de nouvelles molécules antibiotiques a permis de contrôler ce

phénomène. Nous connaissons aujourd'hui une période plus critique avec l'augmentation des résistances des bactéries a de nombreux antibiotiques, avec parfois de véritables ≪ monstres ≫ résistants a toutes les molécules disponibles, conduisant les cliniciens dans de véritables impasses thérapeutiques [**Zahar JR, Lanternier F, Lortholary O, et al.2009]**

La définition de la multirésistance est difficile à établir. Il est couramment admis de parler de multirésistance lorsqu'une souche bactérienne a accumulé sur son profil sauvage de sensibilité aux antibiotiques des résistances acquises telles que la souche ne reste sensible qu'à un nombre restreint d'antibiotiques utilisables en thérapeutique. Pour définir une BMR, une autre composante intervient : la capacité de diffusion de la souche et son pouvoir épidémique. Cela légitime le fait que les programmes de lutte et de prévention aient été ciblés sur des espèces bactériennes associées à des mécanismes de résistance particuliers et bien identifiés **[Schwab JM, Brechtel K, Mueller CA, *et al. 2006*].**

Bactéries multirésistantes concernées :

Dans le souci de mettre en place des programmes de lutte efficaces, des BMR prioritaires ont été choisies, qui correspondent à des espèces commensales devenues multirésistantes et présentant un haut risque de diffusion. Il s'agit principalement de Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline (SARM) et des entérobactéries productrices de bêtalactamase à spectre étendu (EBLSE). Les autres espèces Pseudomonas aeruginosa multirésistants (PAR) et Acinetobacter baumannii multirésistants (ABR) sont

des bactéries saprophytes, qui peuvent être responsables d'épidémies, mais à un moindre niveau et dans des contextes particuliers **[prévention de la transmission croisée (avril 2009)].**

Bactéries hautement résistantes émergentes :

Les bactéries hautement résistantes émergentes (BHRe) constituent une nouvelle menace. Des recommandations adaptées et impliquant la mise en oeuvre de mesures drastiques ont été émises par le Haut Conseil de santé publique **[Prévention de la transmission croisée des bactéries hautement résistantes aux antibiotiques émergentes. juillet 2013.].** L'enjeu est d'empêcher la propagation de souches pouvant conduire à des impasses thérapeutiques. Les bactéries et phénotypes concernés sont les entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC) et les entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG).

Lutter contre la résistance aux antibiotiques :

Nouveaux médicaments

La lutte contre le problème complexe de la résistance aux antibiotiques doit aller au-delà du développement mécaniste de nouveaux produits pharmaceutiques et intégrer une culture multidisciplinaire du changement. Ainsi, le troisième objectif issu de TATFAR vise à fournir (1) des incitations pour stimuler le développement de nouveaux médicaments antibactériens en médecine humaine, (2) des recherches pour soutenir le développement de nouveaux antibactériens, et (3) la publication des opportunités de financement aux communautés de recherche de l'UE et des États-Unis **[Transatlantic Taskforce on Antimicrobial Resistance (April 10, 2014)., Infectious Diseases Society of America (IDSA), Combating antimicrobial resistance (2011)].** La résistance aux antibiotiques peut être mieux traitée grâce à des systèmes

d'administration "intelligents" et à des combinaisons innovantes de molécules d'inspiration biologique (par exemple, des inhibiteurs de détection de quorum, des biosurfactants, des bactériophages, des enzymes, etc).

2.7.1.1. Inhibiteurs de détection du quorum :

Compte tenu de son rôle d'interrupteur principal, l'interruption de la détection du quorum à l'aide de quorumquenchers (QQ) ou d'inhibiteurs de détection du quorum (QSI) est une alternative possible aux antibiotiques **[S.B. Tay, W.S. Yew. 2013 et B. LaSarre, M.J. Federle. 2013].** Trois approches générales sont appliquées pour éteindre ou supprimer le quorum sensoriel microbien :

1) la perturbation de la synthèse de l'autoinducteur

2) l'inhibition des interactions ligand/récepteur e

3) la destruction de l'autoinducteur par clivage enzymatique et dégradation [**S.B. Tay, W.S. Yew. 2013** et **M. Chen, Q. Yu, H. Sun. 2013**].

2.8.2. Produits biologiques

***Peptides antimicrobiens* :**

Quatre classes principales de peptides antimicrobiens (AMP) existent dans la nature, notamment (1) les peptides anioniques, (2) les peptides cationiques avec des pourcentages molaires élevés de proline, d'arginine, de phénylalanine, de glycine ou de tryptophane, (3) les peptides anioniques et cationiques qui contiennent de la cystéine et forment des liaisons disulfure, et (4) les peptides cationiques linéaires à hélices alpha **[F. Guilhelmelli, N. Vilela, P. Albuquerque, L. da, S. Derengowski, I. Silva-Pereira, C.M. Kyaw. 2013 et J. Vizioli, M. Salzet. 2002].** Le mécanisme des AMPs comprend des dommages à la membrane cellulaire, l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire, la formation de pores et la perturbation de la bicouche membranaire [**K. Lohner, E.J. Prenner. 2002**], et l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines [**F. Guilhelmelli, N. Vilela, P. Albuquerque, L. da, S. Derengowski, I. Silva-Pereira, C.M. Kyaw**. **2013**]. Ces peptides antimicrobiens, d'une longueur de 12 à 50 acides aminés, sont des antibiotiques puissants (à des Concentrations micromolaires) à large spectre et fonctionnent comme un composant intégral du système immunitaire inné. Malheureusement, ces médicaments sont coûteux, souvent antigéniques [**H. Fritz, S. Brunner, M.L. Birnstiel, M. Buschle, A. v Gabain, F. Mattner, et al.2004**] et leur stabilité est limitée. Certains de ces inconvénients peuvent être contournés en greffant de manière covalente l'AMP à la surface d'un biomatériau **[F. Costa, I.F. Carvalho, R.C. Montelaro, P. Gomes, M.C.L. Martins. 2001** et **D. Alves, M. Olívia Pereira. 2014].** Ainsi, en raison de leur rôle dans le système immunitaire inné et du risque minimal de résistance aux antibiotiques [**A. Peschel, H.-G. Sahl. 2006** et **F. Dorner, K. Lienkamp. 2013],** cette classe d'antibiotiques naturels constitue une excellente ressource pour le développement de futurs médicaments **[S. Lohan, G.S. Bisht. 2013].**

Bactériophage :

Le bactériophage, un virus spécifiquement conçu pour infecter les bactéries par la reconnaissance d'un récepteur de surface cellulaire, présente l'une des alternatives les plus

attrayantes pour combattre la résistance aux antimicrobiens. Contrairement aux stratégies antibiotiques plus traditionnelles, le titre du bactériophage et son efficacité subséquente évoluent en proportion directe des populations bactériennes et augmentent pour combattre la réapparition de l'agent pathogène **[M. Sabouri Ghannad, A. Mohammadi. 2012].** Les bactériophages se sont révélés efficaces contre une variété de bactéries à gram négatif (par exemple *E. coli, P. aeruginosa, A. baumannii, K. pneumoniae, Vibrio vulnificus, Salmonella spp*) et à gram positif (par exemple *Enterococcus faecium et S. aureus*) **[J. Bradbury. 2004** et **H. Brüssow. 2005]** ; cependant, l'utilisation des bactériophages n'est pas recommandée sans réserve. Bien qu'il ne s'agisse pas d'une liste exhaustive de leurs inconvénients, l'intégration de l'ADN du phage dans le génome bactérien, l'échec de la thérapie bactériophagique en raison d'une spécificité restrictive et le développement d'une résistance bactérienne basée sur l'altération des récepteurs de surface des cellules bactériennes constituent les principales préoccupations. **[M. Sabouri Ghannad, A. Mohammadi. 2012** et **R.D. Joerge. 2003].** Un cocktail contenant plusieurs phages différents, en particulier lorsqu'il est utilisé en conjonction avec un antibiotique traditionnel **[A.M. Comeau, F. Tétart, S.N. Trojet, M.-F. Prère, H.M. Krisch. 2007]**, peut contourner ces inconvénients. Par ailleurs, l'utilisation de composants de bactériophages (par exemple, virolysine, peptides antimicrobiens, etc.) peut contourner un grand nombre, sinon la plupart, de ces pièges **[M. Sabouri Ghannad, A. Mohammadi. 2012]** et constituer une source importante de nouveaux antimicrobiens puissants. En outre, l'utilisation d'une enveloppe de phage modifiée pour afficher un peptide antigénique, en conjonction avec sa spécificité naturelle de ciblage bactérien, peut potentiellement provoquer la réponse immunitaire de l'hôte au site de l'infection **[E. Pajtasz-Piasecka.2008** et **A.E. Willis.1993].**

Chapitre III:
Etude du pouvoir de la formation des biofilms

1. Historique :

La découverte biofilms microbiens ont été observé dés 1974, quand Van Leeuwenhoek « **Figure17** » a utilisé son primitif mais efficace microscope pour décrire les agrégats de « Animalcules » qui il a' gratté dés surface dentaire humain. La population bactérienne se trouve fixe sur un support (état sessile) plutôt que libre isolé de milieu environnent (état planctonique).

Le terme de biofilm a été utilisé pour la première fois en 1943 par **(E. zobelle)**, il n'existe par de réel consensus sur les définitions du terme « biofilm » et il est existe de différence suivant les auteurs.

En1987 **(Costerton)** ont déclaré que le biofilm est constitué de cellules unique et des micro-colonies ; toutes incorporées dans un milieu très dense de cellules uniques et de micro colonies, toutes intégrées dans une matrice exopolymères.

En 1990 **(characklis et Marshall)** ont ensuite décrit d'autres la définition, tels que les caractéristiques de l'hétérogénéité spatiale et temporelle et implication des inorganique ou des substances abiotiques maintenues ensemble de matrice du biofilm.

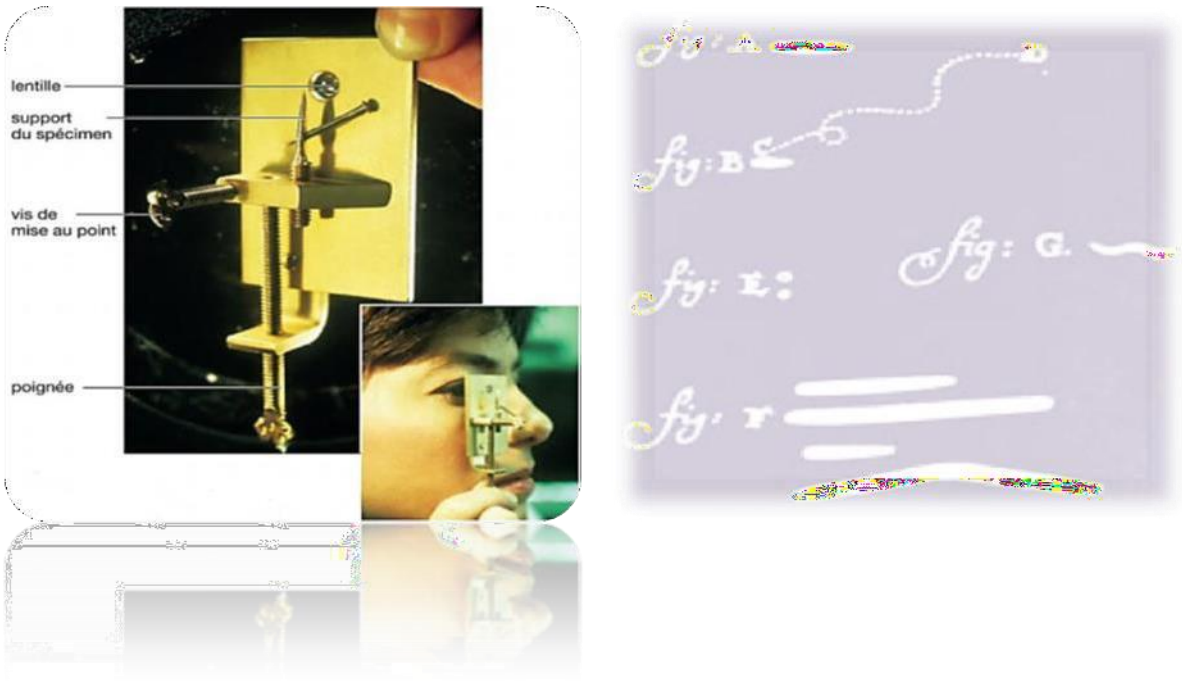


Figure 17. Microorganismes de biofilm observé par Leeuwenhoek.

2. Définition :

A. Le terme de biofilm a été proposé en **1978 (Costerton JW, Geesey GG, Cheng K, 1978)** pour designer une communauté microbienne adhérant à un substrat enfermé dans une substance polymère extracellulaire (EPS) produite par les cellules microbiennes elles-mêmes. Les biofilms peuvent se former sur une grande variété de surfaces y compris les tissus vivants des systèmes aquatiques naturels, les dispositifs médicaux à demeure et la tuyauterie des systèmes d'eau potable /industriels. La grande majorité des microbes se développent sous forme de biofilms dans des environnements aqueux. Ces biofilms peuvent être bénins ou pathogène,

libérant des produits nocifs et des toxines, qui s'enferment dans la matrice du biofilm **[Steven L Percival. 2011].** Les biofilms bactériens cliniques se développent lors d'infection chroniques constituent des réservoirs de pathogène à l'origine de nombreuses infections nosocomiales **(Lebaux et Chigo, 2012].** Un biofilm peut être constitué d'une ou plusieurs espèces de microorganismes **(Behlau et Gilmore).**

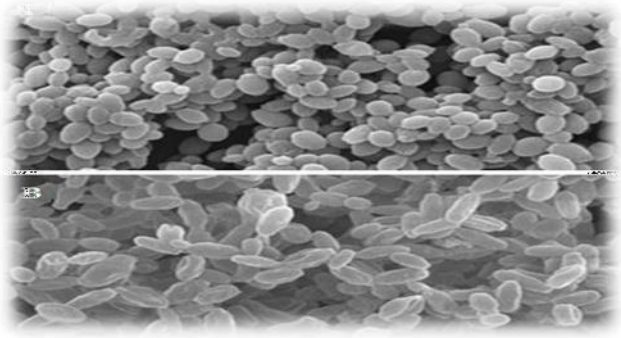


Figure 18: Microscopie électronique à balayage des biofilms matures (48 H) (A) C.glabrata (B) C.parapsilosis (Grossissement x 3000) (Saliva et Coll., 2010)

B. **La matrice extracellulaire :** une fois l'adhésion au support faite, les bactéries commencent à sécréter une matrice adhésive et protectrice appelée matrice extracellulaire. La matrice extracellulaire constitue une véritable variable barrière de protection pour les cellules bactériennes. En raison de l'environnement dans lequel se développe le biofilm, il est difficile de généraliser sur sa composition et son activité métabolique.

La matrice du biofilm est hautement hydratée et peut contenir jusqu'à 97 % d'eau. Elle peut être constituée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, d'agents tensioactifs, de lipides, de glycolipides et de cations **(Karatan E, Watnick P, Flemming H-C, Wingender J).** La composition de la matrice varie selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance. Un des exopolysaccharides le plus souvent retrouvés est un polymère de β-1,6-N-acétyl-D-glucosamine (polyglucosamine, PGA ou PNAG). On retrouve ce polymère chez plusieurs espèces bactériennes, dont *Escherichia coli, Staphylococcus aureus et Staphylococcus epidermidis, Yersinia pestis, Bordetella spp et Actinobacillus spp.* La cellulose, un polymère linéaire de glucose, est également retrouvée fréquemment chez diverses espèces et genres bactériens, dont *E. coli, Salmonella, Enterobacter et Pseudomonas*. Il existe plusieurs autres polysaccharides dont le glucane chez *Streptococcus mutans* et l'alginate retrouvé chez *Pseudomonas.*

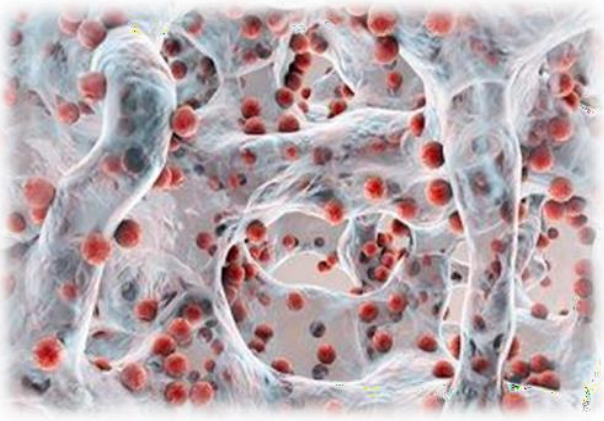


Figure 19: la matrice d'un biofilm homogène

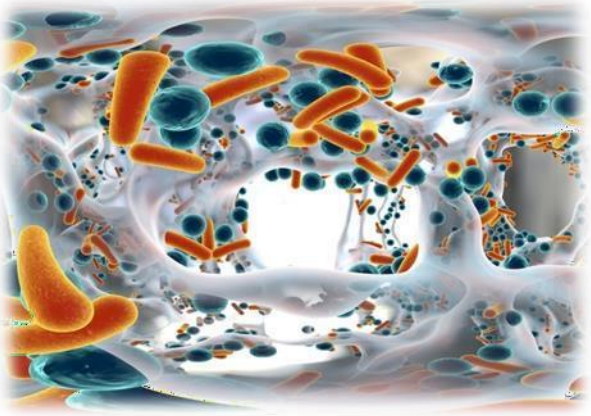


Figure 20 : la matrice d'un biofilm hétérogène

3. Cycle de formation de biofilm :

La formation d'un biofilm bactérien sur un surface solide est un phénomène complexe dans lequel des processus physiques, chimiques et biologiques sont impliqués **(characklis et marshall 1990, Lappin – scott et costerton, 1995).** La constitution d'un biofilm mature nécessite plusieurs étapes (**figure 21**)

- Attachement réversible des bactéries
- Adhésion irréversible et production d'EPS
- Formation de micro –colonies
- Maturation du biofilm et mise en place de la structure tridimensionnelle du biofilm
- Détachement du biofilm

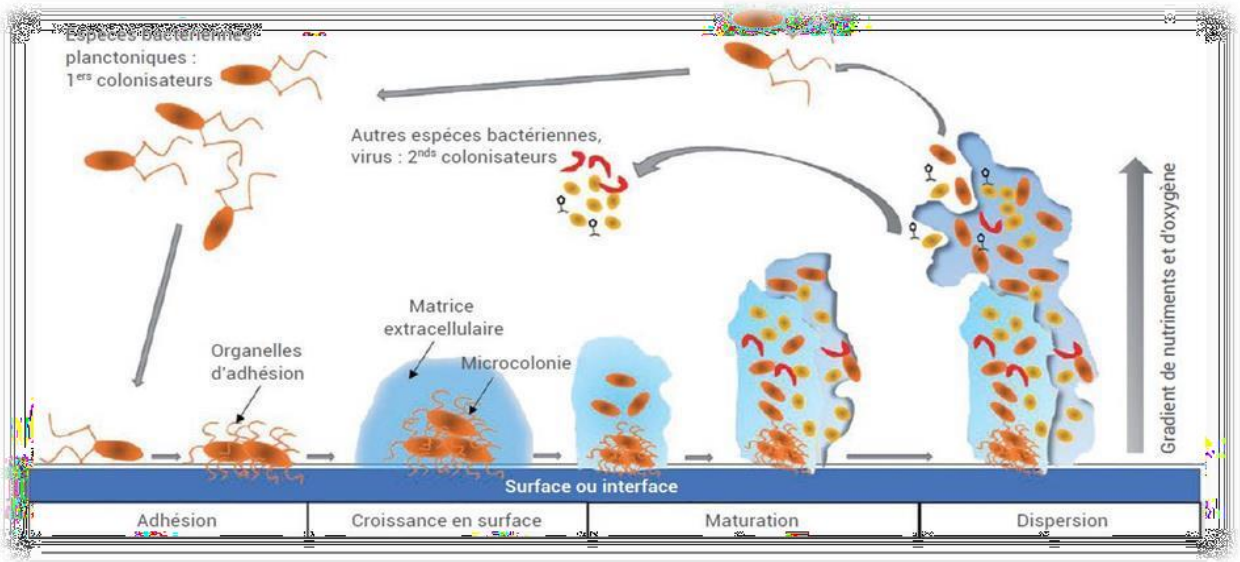


Figure 21 : Le cycle de formation de biofilm

Adhésion réversible :

Dans cette étape de formation du biofilm, les cellules microbiennes se fixent sur la surface à travers leurs appendices comme les pilli et les flagelles et peut également s'attacher par d'autres forces physiques. (**Garrett TR, Bhakoo M, Zhang Z, Maric S, Vranes J).** L'adhésion est due à des interactions faibles entre la surface et les bactéries (interactions de type van der Waals et électrostatiques). A ce stade, la bactérie peut désorber de la surface et retrouver son état planctonique, l'adhésion est donc réversible. Les fimbriae, pilli et flagelles renforcent l'interaction entre les bactéries et la surface de fixation.

Adhésion irréversible :

Dans un deuxième temps, l'adhésion devient irréversible grâce à la sécrétion d'exopolymères par les bactéries permettant de consolider leur fixation au support. Dans ce cas, des interactions fortes s'établissent entre la bactérie et la surface avec des liaisons de type hydrophobe. L'hydrophobicité de la surface peut également jouer un rôle dans renforçant l'attachement des microbes, car il réduit la force de répulsion entre les bactéries et la surface. (**Kumar CG, Anand SK, Tribedi P, Sil AK).** La synthèse des EPS, qui débute dès les premières étapes d'adhésion, se poursuit pendant la maturation du biofilm (**Kuchma et al, 2005 ; Spiers et al, 2003**) et la matrice peut alors occuper jusqu'à 75-95 % du volume d'un biofilm mature (**Suci et al, 1994**).

Formation de micro –colonies :

Après que des micro-organismes se soient fixés à une surface biotique ou abiotique et que cet attachement devient stable, un processus de multiplication et de division des cellules microbiennes commence, initié par une signalisation chimique particulière au sein de l'EPS. Ce processus conduit ensuite à la formation de micro-colonies**. (Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP, Mckenney D, Hubner J, Muller E, Wang Y, Goldmann DA, Pier GB.).** Les colonies bactériennes dans un biofilm se composent généralement de nombreux types de micro communautés. Ces micro-communautés se coordonnent entre elles sous de multiples aspects. Cette coordination joue un rôle crucial dans l'échange des substrats, la distribution des produits métaboliques importants et l'excrétion des produits finaux du métabolisme. La structure du biofilm dépend des conditions environnementales telles que la source de carbone ou le régime hydrodynamique (**Stanley et al, 2003 ; Klausen et al, 2006**).

Maturation du biofilm :

A ce stade de la formation du biofilm, les cellules microbiennes communiquent entre elles par des signaux auto-inducteurs. (**Vasudevan R**., **Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP**). La communication de cellule à cellule est un processus important, au cours duquel la densité requise de cellules microbiennes est atteinte. Cela conduit à la sécrétion de molécules de signalisation, appelées auto inducteurs. Ces auto-inducteurs facilitent le quorum sensing (**Federle MJ, Bassler BL**). A ce stade de maturation, certains produits génétiques sont exprimés, qui sont considérés comme importants pour la

formation d'EPS. L'EPS étant le principal matériau de la structure tridimensionnelle du biofilm, des vides interstitiels sont alors produits dans la matrice. Ces canaux sont remplis d'eau et agissent comme un système circulatoire, utilisé pour distribuer les nutriments importants et éliminer les déchets des communautés de micro-colonies dans le biofilm (**Parsek MR, Singh PK**).

Détachement et dispersion du biofilm :

Dans cette phase, les cellules microbiennes du biofilm se multiplient et se dispersent rapidement afin de passer de la forme sessile à la forme mobile. Le détachement se produit alors selon un schéma naturel (**Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP**). Cependant, certains types de bactéries ne produisent pas de polysaccharide extracellulaire et les cellules bactériennes se dispersent directement dans l'environnement, mais parfois un stress mécanique peut également être impliqué dans ce processus (**Baselga R, Albizu I, Amorena B**). Au cours du processus de détachement, les communautés microbiennes au sein du biofilm produisent différentes enzymes saccharolytiques qui contribuent à libérer la surface des microbes dans une nouvelle zone de colonisation. Par exemple, *Escherichia coli* produit de la N-acétyl héparosane lyase, *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens* produisent de l'alginate lyase, et *Streptococcus equi* produit de la hyaluronidase pour la lyse de la matrice EPS et son détachement ultérieur (**Sutherland IW**). Dans cette phase, les cellules microbiennes régulent à la hausse l'expression des protéines liées à la formation des flagelles, pour permettre aux bactéries de se déplacer vers un nouveau site. Le détachement des cellules microbiennes et leur transfert vers un nouveau site contribuent à la propagation des infections (**Otto M**.).

Cependant, certains types de bactéries ne produisent pas de polysaccharide extracellulaire et les cellules bactériennes se dispersent directement dans l'environnement, mais parfois un stress mécanique peut également être impliqué dans ce processus (**Baselga R, Albizu I, Amorena B**). Au cours du processus de détachement, les communautés microbiennes au sein du biofilm produisent différentes enzymes saccharolytiques qui contribuent à libérer la surface des microbes dans une nouvelle zone de colonisation. Par exemple, *Escherichia coli* produit de la N-acétyl héparosane lyase, *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens* produisent de l'alginate lyase, et *Streptococcus equi* produit de la hyaluronidase pour la lyse de la matrice EPS et son détachement ultérieur (**Sutherland IW**). Dans cette phase, les cellules microbiennes régulent à la hausse l'expression des protéines liées à la formation des flagelles, pour permettre aux bactéries de se déplacer vers un nouveau site. Le détachement des cellules microbiennes et leur transfert vers un nouveau site contribuent à la propagation des infections (**Otto M**.).

4-les caractéristiques du biofilm :

La capacité de former un biofilm est maintenant reconnue comme une caractéristique propre à plusieurs microorganismes. On estime d'ailleurs que 80% de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme d'un biofilm **(Richards JJ, Melander C, 2009).** Les biofilms bactériens isolés de divers environnements partagent des caractéristiques communes (**Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP, Hall-Stoodley L, Stoodley P)**.

1- les cellules bactériennes sont retenues ensemble par une matrice polymérique composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques.

2- Le développement du biofilm survient en réponse à des signaux extracellulaires, soit présents dans l'environnement ou produits par les cellules bactériennes.

3- le biofilm protège les bactéries contre le système immunitaire de l'hôte, la dessiccation et les biocides (antibiotiques et désinfectants).

4- cette dernière caractéristique est particulièrement importante, la présence de biofilms pourra avoir comme effet d'interférer avec un traitement adéquat de l'animal ou une désinfection efficace des surfaces **(Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP, Van Houdt R, Michiels CW).**

5. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm :

Les avantages de la production de biofilm comprennent une plus grande résistance aux forces physiques et au système immunitaire de l'hôte et aux Molécules toxiques comme les antimicrobiens et les désinfectants, la coopération métabolique et un partage d'ADN plus efficace (**Stewart et Costerton 2001, Hall-Stoodley & Stoodley 2009, Hung & Henderson 2009, Steenackers et al. 2012, Satpathy et al. 2016).** Le processus de formation du biofilm dépend des interactions entre les cellules bactériennes (forme microbienne, structure, composition moléculaire, présence de flagelles, de pili, de capsule ou de substances exopolymères), la surface de fixation (chimie, topographie et physicochimie) et les conditions environnementales (pH, nutriments disponibilité, température, protéines hôtes et dynamiques des fluides) **(Van Houdt & Michiels 2010, Campoccia et al. 2013, Cappitelli et al. 2014 Whitehead & Verran 2015)**. La température est l'un des facteurs les plus importants influençant la capacité à former un biofilm (**Stepanovic et al. 2003, De Oliveira et al. 2014, Cabarkapa et al. 2015, Piras et al. 2015).**

6. Facteur de différenciation :

Le quorum sensing :

Le (QS) est un mode de communication et de perception utilisé par les bactéries. Il se fonde sur la production de petites molécules, les autoinducteures (AI), qui peuvent diffuser à travers la membrane ou être transportés à l'extérieure de la cellule **(Bassler BL, Losick R. 2006)**. Les AI, dont la concentration est proportionnelle au nombre de bactéries, servent d'indicateur moléculaire de la densité bactérienne. A partir d'une certaine concentration de ces molécules, une réponse cellulaire est enclenchée par l'activation et la répression de gènes efficaces seulement lorsque la densité cellulaire est importante, pour mettre en place des phénotypes particuliers, comme la formation de biofilm, la virulence, la production d'exopolysaccharides, d'exoprotéases et de sidérophores. De nombreux facteurs induits par le QS sont sécrétés dans l'environnement de la cellule. Ils ont un intérêt global pour la communauté bactérienne pour fournir des nutriments à la population ou pour la transition du mode de vie planctonique (c'est-à-dire en suspension) vers un mode sessile, appelé biofilm, plus fréquemment rencontré en milieu naturel **(Filloux A, Vallet I. 2003).** Le QS ne servirait pas uniquement au recensement de la population bactérienne, mais également à la perception de la diffusion des facteurs secrètes dans le milieu pour optimiser l'efficacité de leur production **(West SA, Winzer K, Gardner A, et al. 2012)**. Pour intégrer au mieux ces différentes informations, les bactéries

ont développé des systèmes de QS impliquant plusieurs AI, de stabilités et de solubilités différentes, perçus par des récepteurs spécifiques qui sont interconnectes **(Cornforth DM, Popat R, McNally L, et al. 2014).**

6 .2. Les molécules du quorum sensing :

Il existe une grande diversité de molécules de communication entre bactéries. Les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus spp., Clostridium spp., Enterococcus spp*.) utilisent souvent des peptides cycliques d'environ 7 à 11 acides aminés **(LaSarre B, Federle MJ. 2013).** Chez les bactéries à Gram négatif, différentes molécules sont utilisées, les plus communes étant les acyl homosérine lactones (AHL), dont les tailles (de 4 à 18 atomes de carbones) et les modifications de la chaine acyl varient selon les bactéries **(Papenfort K, Bassler BL. 2016).** D'autres molécules sont impliquées dans le QS des bactéries à Gram négatif. Celles-ci sont spécifiques de chaque espèce bactérienne : des acides gras insaturés, comme le DSF (diffusible signaling factor), sont utilisés par les bactéries *Xanthomonas spp*., *Burkholderia spp*. et *Xylella spp*. ; des cétones (CAI-1[cholerae autoinducer-1] et LAI-1 [legionella autoinducer-1]) par *Vibrio spp*. et *Legionella spp*. ; L'épinéphrine et ses dérivés sont utilisés par les bactéries entérohémorragiques **(Rémy B, Moin S, Plener L, et al. 2018).**

6.3. Comment interférer avec le quorum sensing ? Le quorum quenching :

Le quorum sensing (QS) intervient dans l'activation et la régulation de nombreux phénotypes bactériens pouvant être problématique pour l'homme. Différentes stratégies ont donc été développées pour inhiber ces comportements régulés par le QS en bloquant la communication entre les bactéries. Cette méthode d'inhibition du QS appelée quorum quenching (QQ). La composante principale du QS étant la production et la détection de molécules signal, le QQ peut interférer de différentes manières avec ce système, soit au niveau intracellulaire, soit au niveau extracellulaire. L'utilisation de molécules inhibitrices, nommées inhibiteurs du QS (QSI), mimant les AI, permet ainsi d'intervenir au niveau des cellules bactériennes pour inhiber la production ou la perception des AI **(Tang K, Zhang X-H. 2014).**

D'autres stratégies ciblent directement les molécules de communication sécrétées dans l'environnement avant qu'elles n'atteignent leur cible, soit en les séquestrant à l'aide d'anticorps **(Park J, Jagasia R, Kaufmann GF, et al.2007)** ou de macromolécules comme les cyclodextrines **(Kato N, Morohoshi T, Nozawa T, et al. 2006)** soit en les dégradent avec des enzymes spécifiques (ou QQE pour quorum quenching enzyme) **(Fetzner S. 2015).** Le QQ présente l'avantage de ne pas affecter la croissance des bactéries, contrairement aux antibiotiques, ce qui minimise nettement la pression de sélection et devrait limiter l'apparition de résistance **(Defoirdt T, Boon N, Bossier P. 2010).** Le QQ représente donc une approche idéale pour la prévention et le traitement des infections bactériennes et pourrait constituer une alternative élégante aux antibiotiques.

7. le biofilm, une communauté bactérienne multi-espèces :

Il faut souligner qu'à l'état naturel les biofilms sont des communautés bactériennes au sein desquelles on peut trouver de nombreuses espèces différentes. Dans ces communautés, le transfert horizontal de gènes est favorisé et les bactéries échangent leur matériel génétique à des fréquences très élevées.

Récemment, il a été proposé que la formation des pili conjugatifs fût également un facteur déterminant pour la formation du biofilm proprement dit **(Ghigo JM. 2001).** Les conditions qui permettent la formation d'un biofilm mixte ne sont pas clairement établies. S. Molin *et al.* **(Nielsen AT. 2000)**. Ont suggéré que la mixité des populations est en partie dépendante de la nourriture. La croissance tridimensionnelle du biofilm et la présence d'une matrice extracellulaire qui réduit la diffusion au sein du biofilm conduisent a l'apparition de gradients d'oxygène dont la concentration décroit depuis la surface vers la base du biofilm, ou les nutriments sont plus rares et ou les déchets du métabolisme bactérien s'accumulent *(***Stewart PS, Franklin MJ. 2008).** L'hétérogénéité physicochimique du biofilm génère une hétérogénéité physiologique et la formation de microniches environnementales qui conduisent à l'émergence de sous-populations génétiquement semblables mais physiologiquement distinctes, en particulier du point de vue de leur tolérance vis-à-vis des antibiotiques **(Stewart PS et Franklin MJ. 2008, Lewis K. Persister cells, 2007).** L'hétérogénéité physiologique protège le biofilm en tant que communauté, garantissant la pérennité du groupe lors de stress importants par comparaison avec des populations génétiquement ou physiologiquement homogènes **(Boles BR, Thoendel M, Singh PK, 2004).** Enfin, la présence fréquente de microorganismes d'espèces différentes au sein d'un même biofilm constitue un niveau supplémentaire d'hétérogénéité biologique **(Hall-Stoodley L et Stoodley P.2009, Peters BM, Jabra-Rizk MA, O'May GA, *et al.* 2012)**. Ces biofilms polymicrobiens bactériens et/ou fongiques jouent également un rôle important en médecine humaine **(Hall-Stoodley L et Stoodley P.2009, Peters BM, Jabra-Rizk MA, O'May GA, *et al.* 2012).**

8. Modèles de laboratoire pour l'étude des biofilms :

Plusieurs systèmes sont couramment utilisés afin d'étudier en laboratoire la formation de biofilms **(Coenye T, Nelis HJ. 2010).** Les cuves à flux continu (ou «flow cell») sont de petites chambres qui permettent la formation d'un biofilm à l'interface solide liquide en présence d'une force de cisaillement et d'un apport continu d'éléments nutritifs. Ce système reproduit assez bien les conditions auxquelles sont exposés les biofilms dans leur environnement naturel. De plus, il permet de visualiser facilement le biofilm sous un microscope confocal. Une modification apportée au système permet la formation d'un biofilm à l'interface air-liquide en présence d'une faible force de cisaillement **(Goeres DM, Hamilton MA, Beck NA et al. 2009)**. Ce système (appelé «drip flow reactor») serait plus représentatif de l'environnement des poumons et de la cavité orale. Plus récemment, des systèmes de microfluidique ont été développés et adaptés à l'étude des biofilms **(Benoit MR, Conant CG, Ionescu-Zanetti C, Schwartz M, Matin A. 2010).** Les biofilms peuvent également être étudiés dans un système statique en microplaques de 96 puits **(Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA. 2005).**

Ce système très populaire permet la formation d'un biofilm à l'interface solide-liquide et le criblage à haut débit. Le Calgary Biofilm Device, mentionné à la section précédente, combine les caractéristiques d'un système de microplaques à 96 puits auquel une force de cisaillement constante est appliquée **(Lewis K. 2008).** Finalement, la pellicule qui se forme à l'interface air-liquide d'une culture en tube représente un autre modèle d'étude des biofilms.

9. Conséquences médicales du développement des biofilms :

La contamination des surfaces médicales telles que les cathéters ou les prothèses articulaires aboutit a la formation de biofilms bactériens qui, outre leur tolérance aux biocides, libèrent des bactéries planctoniques a l'origine d'infections systémiques (Figure 6). Même chez un individu immunocompétent, la réaction immunitaire ne permet pas de détruire la communauté bactérienne au sein du biofilm **(Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP, 1999 et Lewis K. 2007).** Par ailleurs, si l'administration d'antibiotiques permet la disparition transitoire des symptômes en éradiquant les bactéries planctoniques, elle n'élimine pas le biofilm, qui pourra de nouveau constituer une source d'infection. Les biofilms constituent donc des réservoirs bactériens à l'origine d'infections chroniques ou récidivantes.

Plusieurs critères ont été proposés afin de définir si une infection est associée, ou non, a un biofilm **(Parsek MR, Singh PK. 2003):**

- les bactéries doivent être associées a une surface ou dépendantes d'un substrat
- les bactéries doivent être organisées en agrégats cellulaires ou communautés enchâssés dans une matrice composée d'éléments bactériens ou de l'hôte
- l'infection initiale doit être confinée a un site de l'organisme
- l'infection doit résister à l'antibiothérapie, bien que les bactéries testées en phase planctonique y soient sensibles.

Parmi les complications médicales liées aux biofilms, peuvent être distinguées les infections liées a un matériel implante et les infections chroniques. Nous ne présenterons ici que les infections bactériennes, les infections fongiques faisant l'objet de l'Encadre 1.

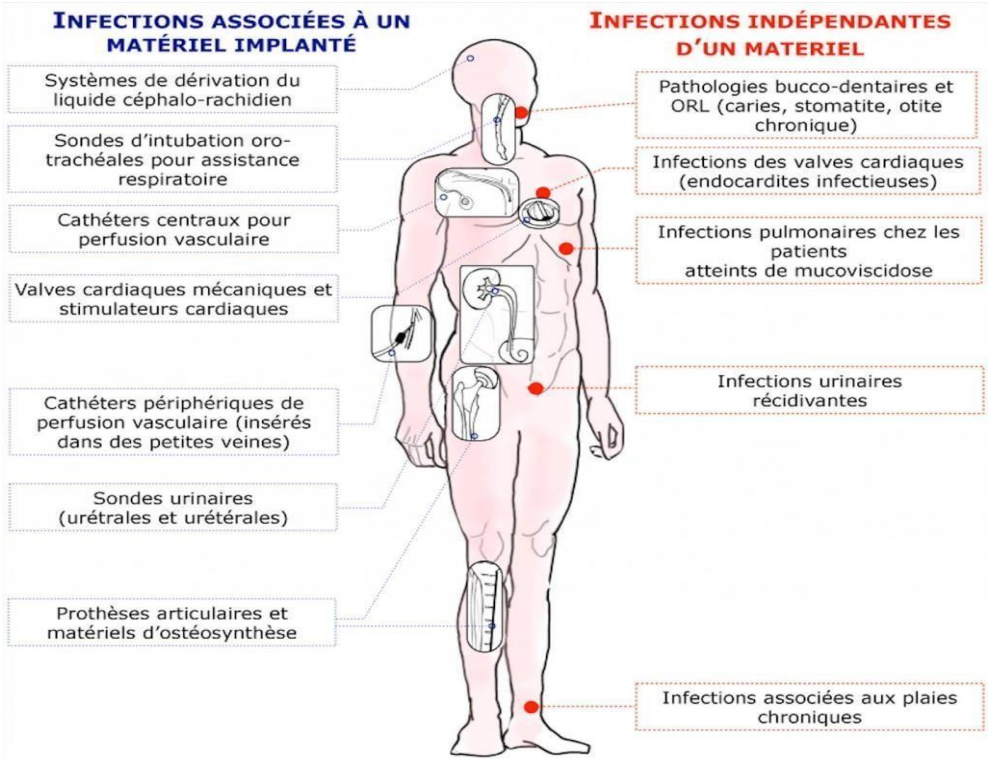


Figure 22: Principales infections associées aux biofilms. ORL : oto-rhino-laryngologie.

10. Résistance des biofilms à divers agents antimicrobiens :

Les biofilms retrouvés dans des environnements naturels ou industriels sont résistants aux bactériophages, aux amibes ainsi qu'aux biocides utilisés dans les procédés industriels **(Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999).** Comme indiqué précédemment, les biofilms permettent aux bactéries pathogènes de résister à la réponse immunitaire de l'hôte. De plus, les bactéries d'un biofilm sont généralement moins sensibles aux antibiotiques et aux désinfectants que ces mêmes bactéries sous forme planctonique. En fait, les bactéries d'un biofilm peuvent être de 10 à 1000 fois plus résistantes aux agents antimicrobiens **(Olson ME. 2010).** Plusieurs facteurs peuvent expliquer la plus grande résistance (certains auteurs préfèrent plutôt parler d'une tolérance) des biofilms aux agents **antimicrobiens (Hall- Stoodley L, Stoodley P. 2009 et Anderson GG, O'Toole GA. 2008 et Olson ME, Turner RJ. 2010)**. Un de ces facteurs est la matrice polymérique qui agit comme barrière réduisant ou empêchant la diffusion des agents antimicrobiens. Les charges électrostatiques à la surface de la matrice polymérique peuvent aussi lier certains agents antimicrobiens. Le métabolisme des bactéries d'un biofilm joue également un rôle très important. Étant donné la faible concentration de certains nutriments 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 **(Lewis K. 2008)**. La proximité spatiale des bactéries au sein d'un biofilm mature favorise probablement le transfert horizontal de gènes et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) demeure la mesure de référence pour déterminer la sensibilité des bactéries planctoniques à divers agents antimicrobiens. Cependant, il faut être conscient qu'il n'existe pas une bonne corrélation entre la CMI de cultures bactériennes planctoniques et la concentration de l'agent antimicrobien requise pour éradiquer un biofilm (**Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. 2002)**.

Il est maintenant possible de déterminer la concentration minimale d'un antibiotique pouvant éradiquer un biofilm (ou «minimal biofilm éradication concentration», MBEC). En effet, un groupe de chercheurs de l'University of Calgary a développé une technologie permettant de déterminer la sensibilité de biofilms à divers antibiotiques et désinfectants **(Harrison JJ, Stremick CA, Turner RJ, Allan ND, Olson ME, Ceri H. 2010).** L'appareil originalement connu sous le nom de «Calgary Biofilm Device» est maintenant appelé «MBEC Assay» et est disponible commercialement (Innovotech inc., Edmonton, AB). Son format de 96 puits, bien que ne reproduisant évidemment pas à la perfection l'environnement normal d'un biofilm ou d'un biofilm formé dans une cuve à flux continu, permet le criblage rapide d'agents antimicrobiens (seuls ou en combinaison). Ces chercheurs ont été les premiers à démontrer une augmentation de la résistance aux antibiotiques lors de la croissance sous forme d'un biofilm d'une vaste gamme de bactéries pathogènes des animaux **(Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. 2002).**

11. inhibition de la formation des biofilms par les huiles essentielles :

La formation de biofilms par des bactéries pathogènes est considérée comme un défi majeur pour l'industrie alimentaire et pour la santé humaine et animale. Les mécanismes QS régulent la formation de biofilm bactérien ; la destruction et/ou la perturbation de ce mécanisme peut donc aider à prévenir la formation de biofilm et résoudre de nombreux problèmes de santé. De nombreuses HE de plantes présentent des propriétés anti-SQ prometteuses en empêchant la formation de biofilm. Cela peut être d'une grande importance pour réduire la virulence et la pathogénicité des bactéries résistantes aux médicaments, en particulier les bactéries pathogènes d'origine alimentaire. En fait, l'utilisation de l'HE d'origine de plante dans l'industrie alimentaire ne modifie pas les propriétés organoleptiques des aliments, son utilisation pourrait donc être une alternative naturelle prometteuse à certains conservateurs alimentaires synthétiques.
Enfin, de nombreuses HE de plantes peuvent représenter un substitut possible à de nombreux médicaments antimicrobiens traditionnels, qui ont un impact négatif important sur l'environnement et la santé humaine/animale. (**Ippolito Camele, Hazem S. Elshafie1, Lucia Caputo and Vincenzo De Feo).**

Récemment, la recherche scientifique a connu une révolution majeure concernant l'importance de l'utilisation des HE de plante dans la lutte contre de nombreuses bactéries pathogènes, en particulier la détérioration des aliments et la santé humaine **(Khan et al. 2009, Olivero et al. Camele et al., 2012 ; Nieto, 2017).**

Huiles essentielles : Les huiles essentielles (HE) sont obtenues par distillation de plantes ou de parties de plantes (fleurs, feuilles, graines, racines, bois, écorce). Ceux-ci sont disponiblesen utilisant une variété de techniques, la plus courante étant la distillation à la vapeur. Le liquide qui en résulte, communément appelé essence, est très concentré **(Boughendjioua, 2015).** Contrairement à ce que leur nom l'indique, les huiles essentielles ont une consistance huileuse mais ne contiennent pas de corps gras **(Jouault, 2012).**

Huile d'Eucalyptus globuleux :

Source : L'huile d'eucalyptus est extraite des feuilles d'Eucalyptus globuleux (Eucalyptus globulus Labill) **[Urząda.d Rejestracji Produktów Leczniczych wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych.2008],** une plante qui appartient à la famille des Myrtacées et qui est laplante dominante des forêts australiennes **[Külheim, C. ; Padovan, A. ; Hefer, C.; Krause, S.T.; Köllner, T.G.; Myburg, A.A.; Degenhardt, J.; Foley, W.J.2015].**

Mode d'action : De nombreux chercheurs ont émis l`hypothèse que le mécanisme possible de la bioactivité de nombreuses HE est dû à leurs principales molécules bioactives uniques. En particulier, l'utilisation de composants uniques pour contrôler la formation de biofilms peut être suffisante dans certains cas, par exemple *B. cereus* et *E. coli* **(Kerekes et al., 2013)** ; cependant, d'autres études expliquent que la synergie entre différents composants uniquesa de meilleurs effets, comme dans le cas du biofilm de *Listeria monocytogenes*, **(Sandasi et al., 2009).**

De plus, les effets synergiques entre différents composants peuvent déclencher l'efficacité antimicrobienne de l'HE et réduire la résistance de nombreux micro-organismes pathogènes **(Elshafie et al, 2015b).** Certains composants uniques peuvent endommager la paroi cellulaire et la membrane plasmique des cellules microbiennes, altérer la morphologie et augmenter la perméabilité cellulaire **(Elshafie et al. 2019).**

Activité antibactérienne :

L'HE agit non seulement localement sur les bactéries, mais agit également sur divers sites cellulaires **(Bajpai et al. 2013).**

Bien que l'HE agisse principalement sur la paroi cellulaire bactérienne, elle peut également affecter les protéines et les acides gras membranaires, influence le Quorum-sensing (la capacité des bactéries à reconnaître et à répondre aux molécules de signalisation) et la génération d'ATP **(Bouyahya et al. 2017).**

L'huile d'Eucalyptus globulus, en particulier, s'est avérée efficace contre plusieurs bactéries, notamment : *Haemophilus influenzae, Haemophilus parainfluenzae, Stenotrophomonas maltophilia* et *Streptococcus pneumoniae* **(Cermelli et al. 2007).** Dans une autre étude, l'HE a significativement inhibé la croissance de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* **(Mohd, 2019),** *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Listeria innocua* **(Bey-ould si said et al. 2016).**

En ce qui concerne les BMRs, l'huile d'Eucalyptus globulus à montré une inhibition significative contre les *Staphylococcus aureus* résistants à la Méthicilline (SARM) et *Enterococcus faecalis* résistant à la Vancomycine (ERV) **(Mulyaningsih et al. 2010).**

Activité antivirale :

L'HE d'eucalyptus globulus a montré une grande capacité à inactiver le virus de l'herpès labial (HSV-1). Cette huile agit sur le virus en l'inactivant avant même qu'il n'infecte l cellule, soit en détruisant l'enveloppe virale, soit en interagissant avec les structures virales responsables de l'introduction du virus dans les cellules hôtes **(Chest, 2018).**

Cette huile a également montré une puissante activité antivirale contre le virus de la grippe A H11N9 et la capacité d'inactiver le phage M13 non enveloppé *d'E. coli* **(Usachev et al. 2013).** Dans une autre étude, l'HE a montré une légère activité contre le virus des oreillons Myxovirus parotidis, mais aucune activité contre l'adénovirus **(Cermelli et al. 2007).**

Activité antifongique :

L'HE est un produit à haute efficacité antifongique **(Moghaddam et Mehdizadech, 2016).** En effet, une étude a montré que l'Eucalyptus globulus déforme les hyphes, réduit le volume des cellules fongiques et induit l'affaiblissement des biofilms de Candida albicans, entraînant leur inhibition **(Barbosa et al. 2019).**

Dans une autre étude, l'HE d'Eucalyptus globulus a complètement inhibé la croissance des mycéliums de l'agent pathogène des plantes Coletotrichum, l'agent causal de l'anthracnose, qui affecte les fruits de la tomate. L'eucalyptol et le terpinen-4-ol, les principales molécules de l'huile, étaient responsables de cet effet **(Osaro-Matthew et al. 2016).**

Dans des études parallèles, l'HE d'Eucalyptus semble inhiber la croissance d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus parasiticus.* Après avoir testé les effets du 1,8-cinéole seul et de l'huile dans son ensemble, les chercheurs ont conclu que l'effet fongique est médié par un effet synergique de plusieurs molécules **(Vilela et al. 2008).**

Approche Méthodologique

1. Objectifs :

Objectif principal :

Le but de notre travail est l'isolement et l'identification des souches responsables des infections nosocomiales et la mise en évidence de la biorésistance à partir des patients hospitaliers ainsi que le pouvoir de la formation du biofilm.

Objectifs spécifiques :

- L'identification des souches bactériennes responsables des infections nosocomiales des prélèvements suivants : Coproculture, Pus et prélèvement urinaires.
- La biorésistance des germes responsables.
- La résistance des souches aux différentes familles d'antibiotiques.
- La résistance des souches aux huiles essentielles ; l'huile d'Eucalyptus.
- La mise en évidence de la formation du biofilm par les microplaques de titration et par le milieu de culture Rouge de Congo.
- La comparaison et interprétation des résultats.

2. Modalité pratiques :

Cadre et lieu d'étude :

Il s'agit d'une étude qualitative mesurant la résistance des bactéries responsables des infections nosocomiales aux antibiotiques et aux huiles essentielles et une étude quantitative de leur pouvoir de formation de biofilm.

Cette étude est réalisée au niveau de deux laboratoires : laboratoire d'Etablissement public de la wilaya de Médéa (unité de bactériologie) , laboratoire de microbiologie du département de biologie de l'université de Médéa au cours d'une période de 3 mois (6 mars- 23 mai) 2023. Et SAIDAL Antibiotical Médéa.

Prélèvements ; ECBU, PUS et Coproculture (selles) :

Nous avons impliqué dans l'étude, sous un transport conservé dans une glacière tous les souches pathogènes responsables des infections nosocomiales à partir de 30 prélèvements des patients hospitalisés au niveau des services de l'hôpital, nous avons exclu tous les prélèvements des patientes externes et hospitalisés hors le délai de notre étude.

L'ECBU : Examen cytobactériologique des urines, Il est préférable de recueillir l'urine le matin, au réveil car le prélèvement doit être effectué au moins 4 heures après la miction précédente l'urine a suffisamment séjourné dans la vessie pour que, en cas d'infection urinaire, les bactéries soient assez nombreuses pour une mise en culture. En présence de symptômes urinaires évoquant une infection urinaire **(brûlures en urinant, envie fréquente d'uriner),** cet examen est dans le but de la recherche la présence de germes dans les urines. Son interprétation est facile puisque l'urine est normalement stérile mais il est important de respecter certaines conditions de prélèvement pour éviter des résultats peu fiables. La chimie des urines est un test d'orientation permet la détection rapide des changements (en blondelettes réactives d'analyse urinaire) de multiples paramètres biologiques facilitant diagnostic

-

Prélèvement par sondage : Chez les malades sondés l'urine ne sera prélevée par ponction directe dans la sonde, après désinfection du site spécifique du dispositif de sonde mais jamais à partir du sac collecteur.

Techniques d'ensemencement :

Méthode de l'anse calibrée : cette méthode est actuellement la plus utilisée. L'urine est prélevée à l'aide d'une anse de 10 µl et est ensemencée selon une méthode standardisée qui permet, grâce a un abaque, de convertir l'aspect de la culture en UFC par millilitre, et ce sans dénombrement Cette méthode simple, sans dilution préalable, permet une numération de 103 à106 UFC/ml tout en permettant l'obtention de colonies isolées

- **Pus :** Un prélèvement cutané d'un tissu d'une plaie superficielle ou des plaies anfractueuses avec un écouvillon
- **Coproculture (selles)**: Un prélèvement des selles ; le but essentiel de la coproculture est de rechercher parmi une flore commensale très abondante et détecter des bactéries qui ne sont normalement pas présentes dans le tube digestif. Des bactéries habituellement absentes et réputées pour leur pouvoir pathogène.

3. Isolement des souches bactériennes :

Présentation des milieux de cultures :

Les milieux sélectifs des entérobactéries : (Colonies incolores = le pH est neutre ou basique, colonies rouges = le pH est acide)

Gélose Nutritive : Un milieu largement utilisé pour la culture des micro-organismes peu exigeants, elle est utilisée pour la culture de bactéries et pour le dénombrement des organismes dans l'eau, les eaux usées, les urines, les matières fécales et d'autres matériaux.

Gélose au sang :

À partir des biopsies, deux géloses au sang de cheval ou de mouton, une gélose CLED et une gélose « chocolat » Polyvitex® seront ensemencées, tandis que pour les milieux de transport, de conservation ou de lavage, ainsi que pour les suspensions cellulaires, deux géloses au sang de cheval ou de mouton le seront. La première gélose au sang est incubée avec la gélose « chocolat » Polyvitex® à 37 °C sous CO2pendant 48 heures ; la gélose CLED est incubée à 37 °C en aérobiose pendant 48 heures, tandis que la deuxième gélose au sang est placée à 37 °C en anaérobiose pendant 5 jours.

Gélose Hektoen :

La **gélose Hektoen** est un milieu différentiel modérément sélectif servant à l'isolement et à la culture de microorganismes entériques à Gram négatif, en particulier à l'isolement des espèces *Shigella et Salmonella* issues d'échantillons fécaux (flore mixte)

Gélose Chapman :

La gélose Chapman ou gélose au sel de mannitol est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement, le dénombrement et la différenciation des *Staphylococcus* à partir d'échantillons cliniques, alimentaires, antiseptiques et cosmétiques.

Ce milieu est à la fois une gélose sélective et différentielle. Le milieu sélectionnera des organismes qui peuvent vivre dans des zones à forte concentration en sel (chlorure de sodium) et la fermentation du mannitol, mise en évidence par le virage au jaune de l'indicateur pH (rouge de phénol), permet d'orienter le diagnostic.

Gélose Cétrimide :

Gélose cétrimide, ou gélose *Pseudomonas* cétrimide, est un milieu sélectif et différentiel utilisé pour l'isolement et l'identification de *Pseudomonas aeruginosa* à partir d'eau et d'échantillons cliniques.

Le cétrimide est un composé d'ammonium quaternaire ayant une activité bactéricide contre un large éventail d'organismes Gram-positifs et certains organismes Gram-négatifs, y compris des espèces de *Pseudomonas* autres que *Pseudomonas aeruginosa*

Gélose MacConkey :

C'est une gélose sélective et différentielle qui ne cultive que des espèces bactériennes gram-négatives, il peut en outre différencier les organismes à Gram négatif en fonction de leur métabolisme du lactose :

- Les fermenteurs de lactose, les colonies, deviennent rouges ou roses sur la gélose MacConkey
- Les non-fermenteurs ne changent pas de couleur.

Le taux de croissance, la vitesse de fermentation du lactose et la présence ou non d'une capsule sont également des moyens de différencier davantage les organismes dans le milieu MacConkey

Gélose Muller Hinton:

Il a été initialement formulé par Mueller et Hinton comme un milieu sans protéine pour l'isolement primaire des espèces de Neisseria. La gélose Mueller Hinton est un milieu solide standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens par la méthode de diffusion (méthode Kirby-Bauer) ou de dilution en gélose.

Ce milieu non supplémenté, initialement recommandé par Bauer et al, a été sélectionné par CLSI, CA-SFM et par l'EUCAST comme milieu de référence pour plusieurs raisons. Ce milieu est pauvre en sulfamides, triméthoprime et inhibiteurs de la tétracycline, et permet une croissance satisfaisante de la plupart des agents pathogènes non exigeants tout en démontrant une reproductibilité d'un lot à l'autre (**Microbiologie clinique 2022)**

Gélose au Rouge Congo:

Le rouge Congo est un colorant, organique, anionique pouvant se déposer dans les fibrilles amyloïdes qui pré- sentent ainsi un dichroïsme visible dans la lumière polarisée.

- **La gélose à base de Rouge Congo ;** est un milieu très convenable pour la détection des souches productrices de Slim. Sur ce milieu les souches exprimant le PIA (Polysaccharide Intercellulaire Adhésion) donnent des colonies noires avec une surface

rugueuse contre des colonies de couleur rouge et à surface lisse pour les souches PIA négatives (**Ziebuhr et al.2001).**

BHIB (le bouillon cœur-cervelle) :

Le bouillon cœur-cervelle est non sélectif enrichi à usage général, utilisé pour la culture d'une grande variété d'organismes à partir d'une variété d'échantillons cliniques et non cliniques.

C'est est une base hautement nutritive qui répond aux besoins de croissance de nombreux types de micro-organismes, notamment les bactéries, les levures et les moisissures

Le bouillon cœur-cervelle peut être utilisé comme milieu d'hémoculture ou comme bouillon d'enrichissement pour les organismes exigeants. Il est recommandé par l'APHA pour l'examen de l'eau et des eaux usées et par le CLSI pour la préparation des inoculum utilisés dans les tests de sensibilité aux antimicrobiens.

BHIB = Brain Heart Infusion (BHI) Agar

Bouillon nutritif :

Le **Bouillon Nutritif** est un milieu largement utilisé pour la **culture des micro-organismes peu exigeants.** Il est recommandé dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits. Il a la même formulation que gélose nutritive, seul l'agar a été omis (qui provoque la solidification du milieu dans la température ambiante). Il est constitué d'un mélange de Tryptone et d'extrait de viande qui contribue à la croissance des microorganismes. Le chlorure de sodium est destiné au maintien de la pression osmotique.

Ce milieu peut être enrichi d'autres ingrédients tels que sang, sérum, sucres, etc à des fins particulières

Tampon PBS:

Le PBS (Phosphate Buffer Saline) est une solution tampon. Ses propriétés isotoniques et non-toxiques permettent de maintenir les cellules dans un état viable et sain pendant de courtes périodes, en faisant ainsi un réactif de choix pour toutes les études cellulaires. Ce tampon sert surtout à rincer les cellules lorsqu'il faut enlever toute trace de milieu avant de les traiter. Il est prévu pour un usage sur les cellules maintenues hors de l'incubateur

4. Les techniques d'ensemencement :

En microbiologie : l'ensemencement est l'étape de transport entre votre milieu (substance alimentaire ou biologique ou culture bactérienne) et votre nouveau milieu de culture. à l'aide d'une « pipette Pasteur »ou anse de platine ou écouvillonnage **(Microbiologie clinique 2022)**

Ensemencement sur un milieu solide :

La technique de 4 quadrants :

C'est la technique d'épuisement qui consiste à disperser le microorganisme à la surface d'un milieu solide afin d'obtenir des colonies séparées, ainsi permet de retrouver tous les

microorganismes d'un mélange, mais aussi de vérifier la pureté d'une souche bactérienne. Cette technique a été faite sur une boite de pétri préalablement séchée sur laquelle on a dessiné des quadrants, déposer la suspension à analyser sur le 1er quadrant, réaliser des stries très serrées ensuite passer au 2e après avoir tourné la boite de 90°sans toucher le 1er, ou stériliser la pipette ou l'anse et reprendre du 1er quadrant, les stries doivent être toujours serrées ensuite passer au 3e et au 4e quadrant en desserrant légèrement les stries. Afin de pouvoir définir l'aspect des colonies obtenues, des colonies isolées dans le dernier quadrant schématiser en E, la présence ou non de l'hémolyse complète ou incomplète lorsqu'il s'agit d'une GSF (gélose au sang frais) est aussi prise par considération

La technique du Beurrage

Technique d'écouvillonnage qui consiste à réaliser un ensemencement très riche (pour les bactéries exigeantes et fragiles ou pour les tests d'antibiogramme).Elle se résume a placer la suspension a la surface du milieu gélosé (0.1 ml ou moins), l'inoculum a été étalé par la suite sur la surface de la boite pétri a l'aide d'un râteau de verre. Nous obtenons après incubation des colonies en surfaces

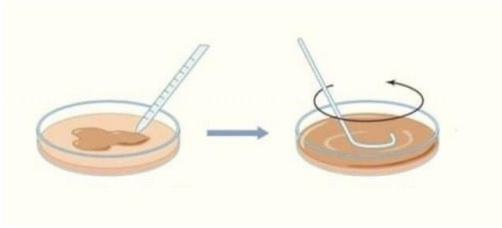


Figure 23 : Ensemencement par beurrage

Ensemencement incliné en pente :

Ensemencer toujours du bas en haut par des stries serrées par zigzag ascendant en douceur pour ne pas abimer la gélose, avec une anse bouclée, trempée préablement dans la culture bactérienne

Résultat : la culture se traduit par apparition de colonies ou virage de la couleur de l'indicateur pH

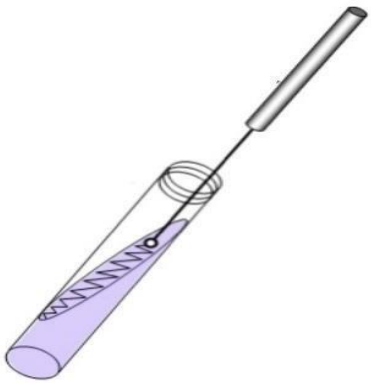


Figure 24 : Ensemencement incliné en pente

Ensemencement en culot :

L'ensemencement se fait par piqure centrale à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, après avoir préalablement chargé celle-ci de suspension bactérienne.

Ensemencement en culot + pente :

Commencer par ensemencer la pente par des stries serrées ensuite culot par piqûre centrale, donnant le même résultat.

Ensemencement sur milieu liquide :

On peut ensemencer un milieu liquide, soit à partir d'une suspension liquide, on met quelques gouttes dans le milieu à ensemencer avec pipette de pasteur. Ou a partir des colonies d'un inoculum.

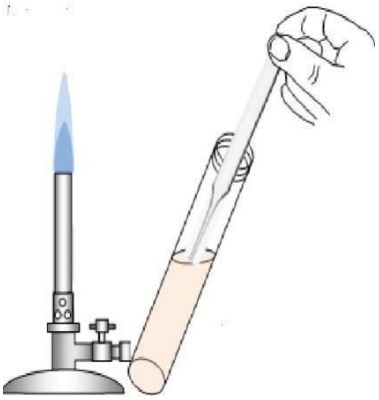


Figure 25 : Ensemencement sur milieu liquide

Soit à partir d'une gélose solide, écraser la colonie prélevée à l'aide d'une anse de platine ou pipette de pasteur sur la paroi du tube, pour obtenir une suspension homogène par prélever une colonie bien séparée puis écraser la colonie a la surface de la paroi du tube et bien mélangé avec le milieu liquide.

La conservation des souches : Les souches sont conservées dans des tubes qui contiennent un milieu de conservation GN à une température de 4°C (ces bactéries sont placées dans un état de vie ralentie ou momentanément suspendue donc dans des conditions peu favorables pour leur multiplication).

5. Identification :

Identification macroscopique : est basée sur l'étude des caractères visibles à l'œil nu (forme, taille, couleur et aspect).

Identification microscopique : est basée sur l'étude de la mobilité et de la coloration de Gram.

Examen direct à l'état frais : permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leur morphologie, de leur mode de groupement, de leur mobilité éventuelle et de la quantité approximative de bactéries **(Camille Delarras).**

Technique :

Prendre une lame propre nettoyée avec un coton imbibé d'alcool à 95° :

- Dans le cas d'une culture en milieu liquide (bouillon), déposer sur la lame une goutte de cette culture, à l'aide d'une pipette pasteur stérile ou un inoculum avec une anse de platine ;
- Dans le cas d'une culture sur milieu solide (gélosé) en tube ou sur boite de pétri, déposer tout d'abord sur la lame une goutte d'eau distillée stérile ou d'eau physiologique stérile, puis apporter et dissocier dans l'eau un inoculum bactérien ;
- Recouvrir d'une lamelle, puis luter la préparation avec de la paraffine ou de la vaseline ;
- Observer au microscope optique à l'objectif x 40 ou x 60. Pour mettre en évidence certains détails de structure, l'objectif x 100 à l'immersion doit être utilisé.

Il faut régler convenablement la lumière et ne pas prolonger le temps d'observation au-delà de 3 minutes, sinon la préparation se dessèche.

La coloration de Gram : permet effectivement de diviser le monde des bactéries en deux groupes distincts ; les Gram positifs et les Gram négatifs.

La division du monde bactériens en deux groupes (Gram + et Gram-) est principalement liée à une différence de structure chimique des parois cellulaires des bactéries. **(Camille Delarras).**



Figure N 26 : Kit R13 de couleur Gram (Crystal violet, Lugol, Alcool, Safranine ou Fuchsine) et lamelles.

Identification biochimique :

Identification par enzymes respiratoires :

a. Test catalase : Certaines bactéries ont la faculté de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H2O2). En présence d'une bactérie productrice de catalase, on observe à partir d'H2O2 une libération d'oxygène gazeux selon la réaction :

$H_2O_2 \Longrightarrow H_2O + 1/2\ O_2$.

Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène H2O2. Et si elles possèdent la catalase. Elles dégradent le péroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulle.

b. Test oxydase : le test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore la (NN- diméthyl-paraphénylène diamine) en un dérivé rose violacé.

NN- diméthyl-paraphénylène ⟹ Produit coloré rose violacé
Diamine incolore

Recherche des entérobactéries :

A partir des cultures pures des entérobactéries, des tests biochimiques doit être réalisés :

- **Étude du type respiratoire** :

L'ensemencement est effectué sur une gélose viande-foie (VF), Cet ensemencement est effectué à l'aide d'une pipette Pasteur de bas en haut en spirale. Après 24 heures à 37 °C, la lecture consiste à étudier le niveau du tube ou une croissance bactérienne est visible.

- **Milieu mannitol-mobilité :**

Il s'agit d'un milieu semi-solide contenant entre autres du mannitol et du rouge de phénol comme indicateur de pH. L'ensemencement du milieu est réalisé par piqure centrale.

Lorsque l'indicateur colore passe du rouge au jaune, ce qui correspond à l'acidification du milieu, le mannitol à été utilisé. Le caractère mobile est défini dans ce milieu par un trouble envahissant toute la largeur de la gélose de part et d'autre de la piqure centrale, alors qu'une bactérie immobile ne se développe que le long de la piqure centrale.

- **Étude de la fermentation de plusieurs sucres pour l'identification des entérobactéries :**

Le milieu de Kligler-Hajna ou milieu lactose-glucose-H2S est le plus couramment utilisé. Ce milieu solide en pente contient du glucose (0,1 %), du lactose (1 %), des acides amines, de thiosulfate de sodium, du citrate ferrique et du rouge de phénol. Ce milieu est ensemencé avec la souche à étudier en effectuant des stries à la surface de la pente de la gélose, puis le culot est ensemencé par piqure centrale. Les bactéries acidifient le glucose en anaérobiose relative (culot) ; le culot vire au jaune (par exemple entérobactéries).

✓ Si le germe n'utilise pas le lactose, la pente devient rouge par relatinisation du milieu due à la formation de produits alcalins provenant de la dégradation des acides aminés (par exemple *Proteus*).

✓ Si les bactéries utilisent le lactose en aérobiose relative (pente), il y a virage de la pente au jaune (par exemple *E. coli*). Le milieu peut être coloré en noir de façon plus ou moins intense par production d'H2S. Une pointe fine d'H2S est observée pour *Salmonella* Typhi. Le milieu peut être entièrement noir. La présence de gaz est détectée par la mise en évidence de bulles ou le soulèvement de la gélose. Un milieu contenant en plus du saccharose a 1 % peut être utilise ; il s'agit du milieu **TSI** (*Triple-Sugar-Iron*) [**P. Lanotte, C. Isnard et al].**

La recherche des Staphylococcus :

- Ensemencement dans le milieu sélectif (gélose Chapman). La présence d'un virage de couleur de milieu de culture indique la présence des staphylocoques.
- Recherche d'une coagulase par le test coagulase :

Principe *:*

Staphylococcus aureus produit deux types de coagulase, celle à l'état libre et celle à l'état lié. La coagulase à l'état libre est une enzyme extracellulaires produite lorsque l'organisme est cultivé dans du bouillon. La coagulase à l'état lié, également appelée facteur d'agglutination, reste attachée à la paroi cellulaire de l'organisme.

L'essai en tube est réalisé en ajoutant 2 à 4 colonies d'isolat à une éprouvette contenant le plasma coagulase réhydraté et en l'incubant à 37°C pendant une durée maximale de 4 heures. La formation d'un caillot indique la production de coagulase. L'essai en tubes est la méthode la plus fréquemment utilisée en raison de sa précision supérieure provenant de sa capacité à détecter à la fois la coagulase libre et la coagulase liée.

Procédure de test :

1. A l'aide d'une pipette stérile de 1 ml, ajouter 0,5 ml du plasma reconstitué à une éprouvette de 12 mm x 75 mm.
2. A l'aide d'une anse stérile, émulsifier 2 à 4 colonies de l'organisme du test dans le plasma.
3. Mélanger délicatement.
4. Incuber pendant 24 heures au bain marie à 37°C.
5. Au bout d'une heure, examiner le tube pour détecter toute formation de caillot en le penchant doucement sur le côté. En l'absence de toute formation de caillot évidente, revérifier toutes les 30 minutes jusqu'à une limite de 4 heures.
6. S'il n'y a toujours pas de caillot au bout de 4 heures d'incubation, réincuber le test à température ambiante pendant la durée restante, et vérifier la formation éventuelle de caillot au bout de 24 heures. Ne pas réincuber les tests ayant déjà produit un caillot au bout de 4 heures étant donné que certaines souches de S. aureus produisent une fibrinolyse susceptible de lyser les caillots au terme d'une autre incubation.
7. Relever les résultats.



Figure 27 : Réalisation du test coagulase

La recherche des Pseudomonas :

- Ensemencement dans le milieu sélectif (gélose au Cétrimide et gélose Hektoen).

Identification par galeries miniaturisées :

Notre étude à été réalisée par 3 types des galeries :

- API 20 E pour l'identification biochimique des Entérobactéries.
- API 20 NE pour l'identification biochimique des Pseudomonas.
- API Staph pour l'identification biochimique des Staphylocoques.

✓ **API 20 E :**

Est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 test biochimiques miniaturisées, ainsi qu'une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le tableau d'identification. (**SA.RCS LYON)**

Principe : La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenants des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduit par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide de tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide de catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

***Mode opératoire* :**

❖ **Inoculation de la galerie** :

Après la préparation de la galerie et de l'inoculum, introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, pose la pointe de la pipette sur le coté de la cupule en inclinant légèrement la boire d'incubation vers l'avant) :

- Pour les tests CIT, VP, et GEL, remplir tube et cupule.
- Pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules).
- Pour les tests : ADH, LDC, ODC, H2S, URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.

- Refermer la boite d'incubation.
- Incuber à 37 °C pendant 18-24 heures.

❖ **Lecture de la galerie :**

• Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.
• Si 3 tests ou plus (test GLU + ou –) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- **Test TDA :** ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur **marron-rougeâtre** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats.
- **Test IND** : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur **rose** diffusant dans toute la cupule indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats.
- **Test VP** : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur **rose** ou **rouge** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration **rose** apparaissant après 10 minutes doit être considérée **négative.**

Par ailleurs dans certains cas, le profil à 7 chiffres étant insuffisamment discriminant, les tests complémentaires suivants sont nécessaires :

- Réduction des nitrates en nitrites (NO2) et en azote (N2) : ajouter 1 goutte des réactifs NIT 1 et NIT 2 dans le tube GLU. Attendre 2 à 5 minutes. Une coloration **rouge** indique une réaction **positive** (NO2). Une réaction négative (coloration jaune) peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) : ajouter 2 à 3 mg de réactif Zn dans la cupule GLU. Après 5 minutes, un tube resté **jaune** indique une réaction **positive** (N2) à noter sur la fiche de résultats. Si la cupule est **orange-rouge**, la réaction est **négative**, les nitrates encore présents dans le tube ont été réduits en nitrites par le Zinc.

Cette réaction est intéressante pour les bacilles à Gram négatif oxydase positive.

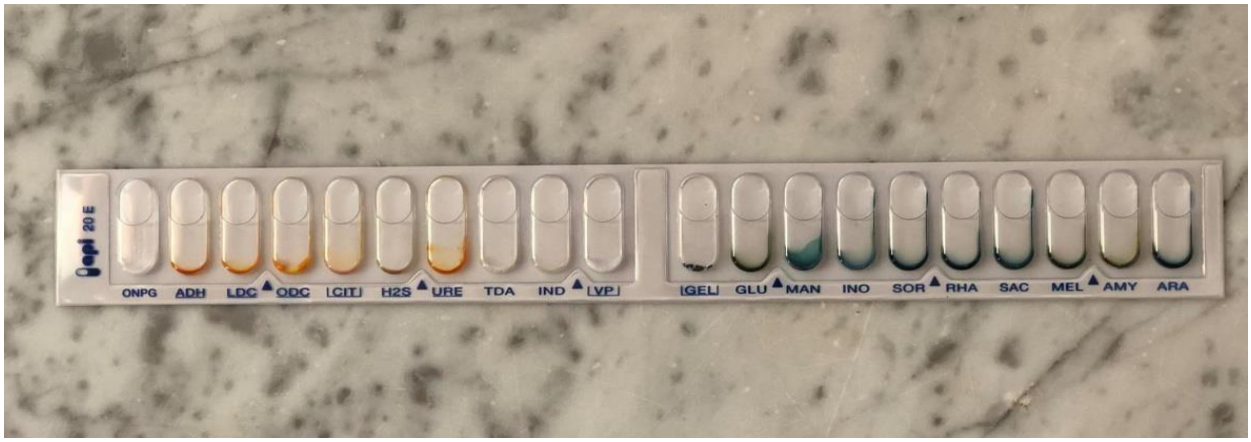


Figure 28 : API 2OE (avant le remplissage).

✓ **API 2O NE :**

Est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex *Pseudomonas, Acinetobacter, Flavobacterium, Moraxella, Vibrio, Aeromonas,* etc).

Principe : La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés.

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline se reconstitue le milieu. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduit par des virages colorés spontanés ou révélés par l'adition des réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser les substrats correspondants. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture ou l'identification est obtenue à l'aide de catalogue analytique et d'un logiciel d'identification **(SA.RCS LYON).**

Mode opératoire :

❖ **Inoculation de la galerie** :

Après la préparation de la galerie et de l'inoculum, remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO3 à PNPG avec la suspension bactérienne en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, pose la pointe de la pipette sur le coté de la cupule en inclinant légèrement la boite d'incubation vers l'avant.

- Remplir tubes et cupules de test GLU, à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entrainer des résultats incorrects.

- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignées GLU, ADH, URE (pour former un ménisque convexe.
- Refermer la boite d'incubation et incubée à 37°C pendant 24 heures.

❖ **Lecture de la galerie :**

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture
- Noter sur la fiche des résultats toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG).
- La révélation des deux tests NO3 et TRP doit se faire en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air pour cela, placer le couvercle de la boite d'incubation au-dessus de ces tests, pendant la période de révélation des tests NO3 et TRP.

- **Test NO3 :**

- Ajouter une goutte de réactif NIT 1 et NIT 2 dans la cupule NO3.
- Après 5 mn, une couleur rouge indique une réaction positive, à noter sur la fiche de résultats.
- Une réaction négative peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) ; ajouter 2-3 mg de réactif Zn dans la cupule NO3.
- Après 5 mn, une cupule restée incolore indique une réaction positive à noter sur la fiche des résultats.

Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative car les nitrates encore présents dans le tube ont alors été réduits en nitrites par le Zinc.

La réaction utilisée pour l'identification de la bactérie est la réduction des nitrates ; elle est positive si l'une ou l'autre des deux réactions précédentes (production de NO2 ou de N2) est positive.

La production de N2 peut cependant être utilisée seule comme test complémentaire dans le catalogue analytique.

- **Test TRP :**

Ajouter une goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive.

Test d'assimilation :

Observer la pousse bactérienne. Une cupule trouble indique une réaction positive

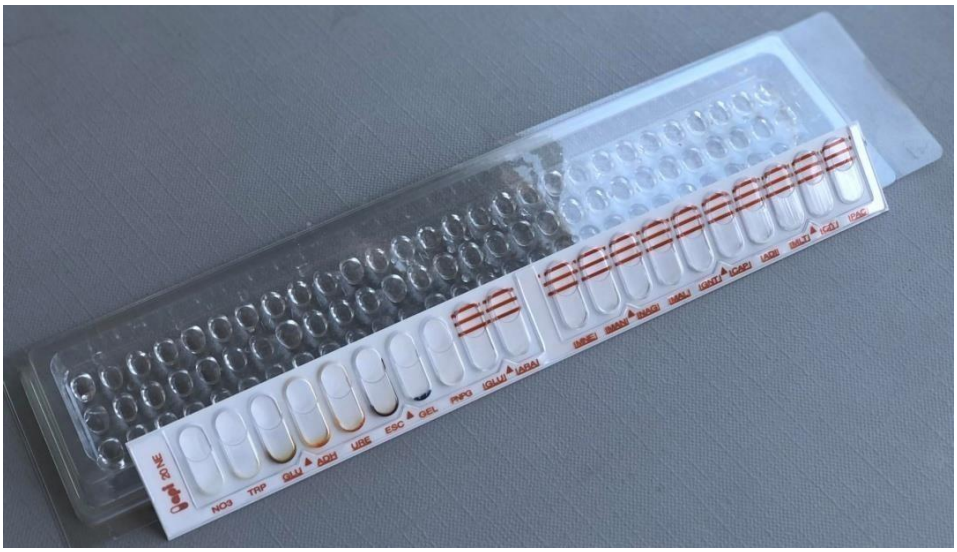


Figure 29 : API 20 NE (avant le remplissage).

✓ **API Staph :**

Est un système standardisé pour l'identification des genres Staphylococcus, Micrococcus et Kocuria comprenant des tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le tableau d'identification en fin de notice.

Principe : la galerie API Staph comporte 20 microtubes contenants des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans API Staph Medium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduit par des virages colorés spontanés ou révélés par l'adition des réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture ou l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique d'un logiciel d'identification **(SA.RCS LYON).**

Mode opératoire :

❖ **Inoculation de la galerie :**

• A l'aide d'une pipette, remplir les tubes de la galerie avec API Staph Medium ensemencé.

Ne remplir que les tubes et non les cupules, sans dépasser le niveau du tube. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette ou de la sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.

• Créer une anaérobiose dans les tests ADH et URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine pour former un ménisque convexe.

• Renfermer la boîte d'incubation.

•Incuber à 36°C ± 2°C pendant 18-24 heures.

❖ **Lecture de la galerie :**

• Après incubation, lire les réactions conformément au Tableau de Lecture en ajoutant 1 goutte de chacun des réactifs suivants :

- Test VP : VP 1 et VP 2 :

Attendre 10 minutes. Une couleur **rose franche** ou **violette** indique une réaction **positive**. Une couleur **rose pâle** ou **rose claire** obtenue après 10 minutes doit être considérée **négative**.

- Test NIT : NIT 1 et NIT 2 :

Attendre 10 minutes. Une coloration **rouge** indique une réaction **positive**.

- Test PAL : ZYM A et ZYM B :

Attendre 10 minutes. Une coloration **violette** indique une réaction **positive**. Une couleur beige-rosé ou violet très pâle obtenue après 10 minutes doit être considérée **négative**.

• Noter les résultats sur la fiche de résultats.



Figure 30 : Api Staph (avant le remplissage).

5. Antibiogramme :

Principe :

Le principe consiste à tamponner l'inoculum standardisé (**0.5Mcf)** sur la surface d'une boite de gélose Mueller Hinton (MH) en présence d'un ou plusieurs antibiotiques et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celles-ci. Après l'incubation, le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré autour de chaque disque.

Technique :

- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées. Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boite de 60° a chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boites de Pétri, il faut recharger l'écouvillon a chaque fois.
- Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotique sur une boite de 90 mm.
- Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces bactériologiques stériles et ne pas déplacer les disques âpres application.
- Respecter la température, l'atmosphère et la durée d'incubation recommandées pour chaque bactérie.
- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.
- Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories S, R ou I **(K. Rahal et all).**



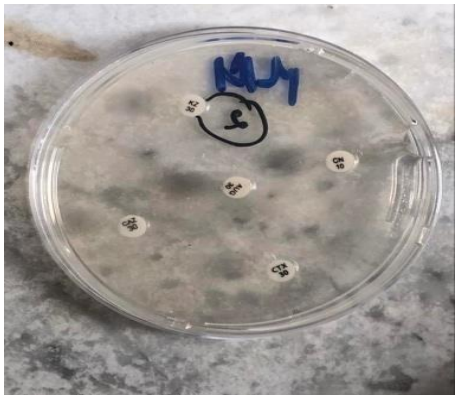


Figure 31 : Réalisation de l'antibiogramme (disques d'antibiotiques des Entérobactéries avant l'incubation)

6. Evaluation de la formation de biofilm

La technique de microplaque en titration :

La détermination quantitative de la formation de biofilm dans les microplaques à 96 puits est basée sur la mesure colorimétrique du cristal violet incorporé par cellules sessiles **(Chavant *et al.*2006)**

Une souche de chaque genre est testée dans le milieu BHIB (Bouillon Cœur Cervelle) modifié par 4 paramètres afin de déterminer les meilleurs paramètres favorisant la formation de biofilms et par la suite déterminer les souches en fortes et faibles production de biofilm.

Tableau 01: Paramètres utilisés dans l'évaluation de formation de biofilm par la méthode de (TCP).

Paramètre 1 : **BHIB+ % Glucose**	*Paramètre 2 :* **BHIB + % Saccharose**	*Paramètre 3 :* **BHIB+ % Glucose et % Saccharose**
2% Glucose	2% Saccharose	2% Saccharose+2% Glucose
3% Glucose	3% Saccharose	2% Saccharose +3% Glucose
4% Glucose	4% Saccharose	2% Saccharose +4% Glucose
5% Glucose	5% Saccharose	2% Saccharose +5% Glucose

***Paramètre 5* : Les souches sont testées dans trois différentes températures d'incubation 28°C, 35°C et 37°C dans le milieu BHI.**

L'étude de la formation de biofilms est réalisée par coloration au cristal violet (CV). Cette technique permet une évaluation quantitative de la formation de biofilms puisque la coloration adsorbée est directement corrélée à la densité du biofilm formé **(Musk et al. 2005).** La formation du biofilm a été réalisée dans des microplaques à 96 puits selon le protocole d'O'Toole et al. (2000).



Figure 32 : Microplaque en polystyrène de 96 puits

Tout d'abord, les microplaques en polystère ont été stérilisées dans une hôte sous la lumière UV durant 1 heure

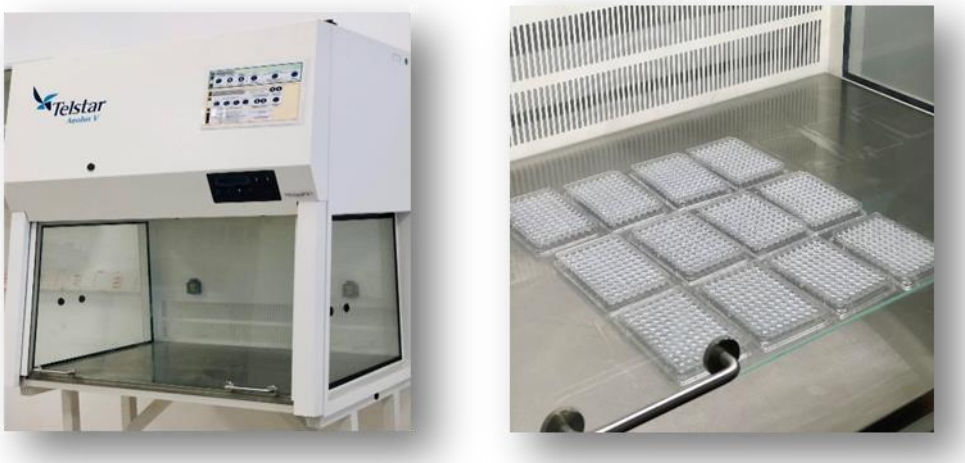


Figure 33: stérilisation des microplaques dans une hôte UV [Telstar]

Une suspension bactérienne de chaque souche a été préparée des tubes de BN à l'aide des pipettes pasteur à partir des colonies isolées d'une culture de 24h . Puis agité à l'aide d'un vortex

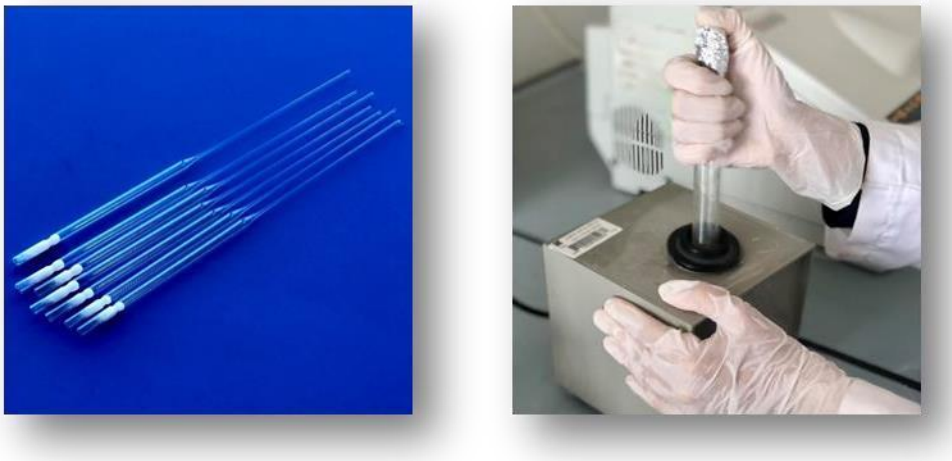


Figure 34 : Préparation des suspensions

Ces suspensions ont été ajusté à une densité optique (DO) à 600 de 0.080 nm à l'aide d'un spectrophotomètre après les avoir mis dans des cuves avec un témoin de l'eau distillée et une cuve du milieu utilisé ; BHIB afin d'absorber les ondes de ce dernier

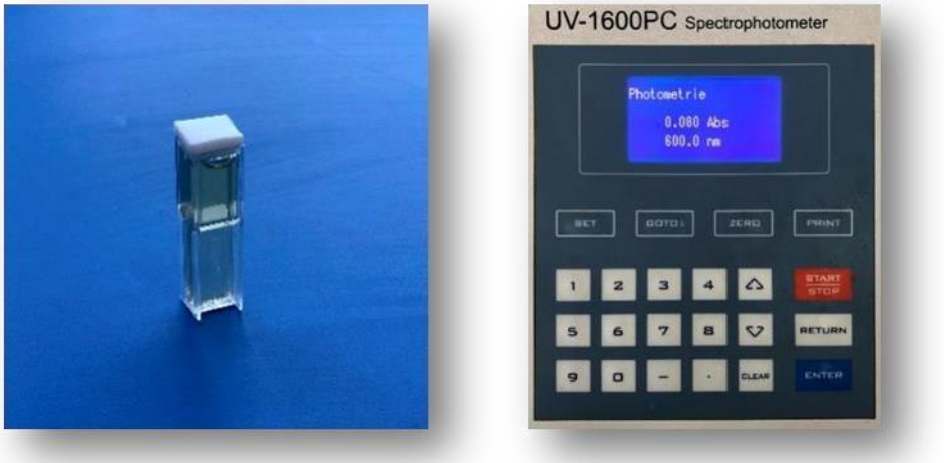


Figure 35 : Mesure de la DO (par cuves)



Figure 36 : Spectrophotomètre

Apres avoir préparer le BHIB par suspendre 37g de la poudre déshydratée, dans 1000 ml d'eau distillée, porté à ébullition et dissoudre complètement le milieu. On l'a réparti dans des tubes à essais et des flacons et le stériliser en autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Les paramètres variables de concentration de Glucose, Saccharose, Glucose + saccharose ont été mélangés avec 100 ml de BHIB dans chaque flacon contenant une concentration différente



Figure 37 : Les différentes concentrations des sucres mélangés dans BHIB

Un volume de 100 µl de chaque suspension bactérienne a été déposé dans les puits d'une microplaque à 96 puits avec une micropipette de 100µl. Par la suite, 100 µl de BHIB + chaque paramètre en 3 répétitions, avec une ligne de témoin de BHIB et une autre ligne de BHIB + 2% de Saccharose (le sucre fixé), les plaques sont incubés dans 3 les températures dans 3 étuves différentes(28°, 35° et 37°) pendant 48h et sans agitation

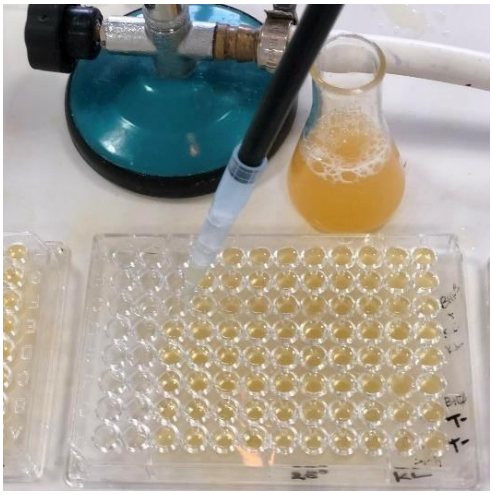


Figure 38 : Micropipette de 100µl



Figure 39 : La disposition des paramètres

Après 48h incubation, le contenu de chaque puits a été enlevé délicatement l'aide d'une micropipette



Les puits ont été lavés successivement 3 fois avec le tampon PBS à température ambiante **(SRDJAN STEPANOVIC.2007)** puis séché la plaque couverte dans une étuve a ventilation de 60°C durant 20 minutes, le biofilm a été ensuite coloré avec le cristal violé, 100 µl de cristal violet était incorporer dans chaque puis et laissé agir pendant 10 minutes.



Figure 40 : Etuve de séchage

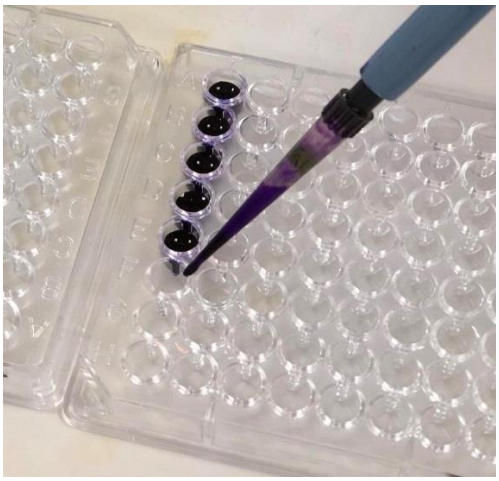


Figure 41 : Remplissage de cristal violet

Ensuite ils ont été lavés en profondeur avec de l'eau distillée.



Figure 42 : Lavage du cristal violet avec l'eau distillée

Les microplaques ont été séchées pendant 20 minutes puis solubiliser avec une solution alcoolisée d'Ethanol 96% pendant 30 minutes.



Figure 43 : Solubilisation avec Ethanol

La quantité de l'Ethanol solubilisé a été mesuré par lecture de la densité optique à 600nm dans un lecteur de plaque ELISA.



Figure 44 : Lecteur des microplaques ELISA (MP69 UV)

5.2. La technique de Rouge Congo :

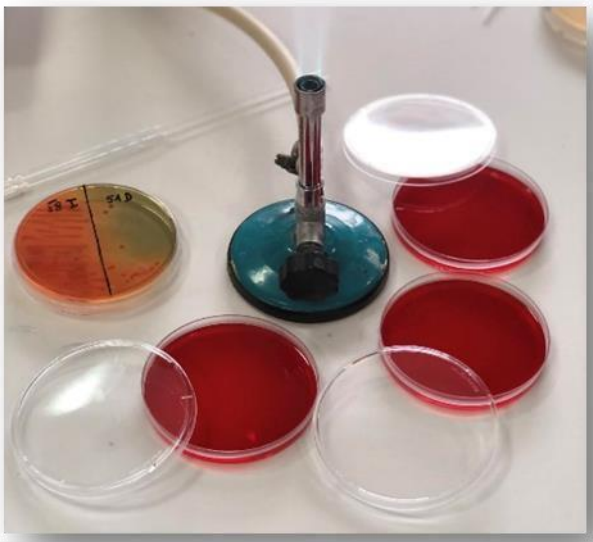


Figure 45 : Coulage des boites pétri au Rouge congo

1.2.1. La méthode Rouge Congo Agar (RCA) :

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

- **Préparation de la gélose à base de Rouge Congo** : Le milieu est préparé avec 38g/l de bouillon cœur cervelle (BHIB), 20g/l de saccharose, 10 g/l d'agar et 0,8 g/l de Rouge Congo. Le milieu est autoclavé à 120°C pendant 20 minutes puis les boites sont coulées, séchées et

ensemencées avec des colonies jeunes de 24h par des stries serrées à l'aide d'une anse de platine, à partir des cultures de 24 heures sur GN, puis incubé à 37°C pendant 24 heures **(Handke et al.2004)**

- **La lecture :** Après 24 heures d'incubation à 37°C, la production de slim est caractérisée par l'apparition de colonies noires à surface rugueuse contre des colonies rouges à surface lisse pour les souches non productrices **(Ziebuhr et al. 2001).**

Les souches de phénotypes variables donnaient des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir **(Nasr et al. 2012).**

6. L'aromatogramme de L'huile d'Eucalyptus :

Durant notre étude, l'huile d'Eucalyptus été incorporés par deux manières : elle a été incorporée dans des disques vierges (pour effectuer le test d'aromatogramme) et dans les microplaques (pour inhiber la formation des biofilms).

La méthode gélosé des disques :

Elle consiste de l'ensemencement sur un milieu gélosé (MH), dans une boîte de Pétri, des suspensions bactériennes des 5 souches d'une densité de 0.5MF, puis ensemencé par 4 quadrants. Les disques (papiers filtres) sont ensuite imprégnés de 25 µl d'huile essentielle pure (l'huile d'Eucalyptus), lui-même déposés sur la boîte de Pétri avec un disque vierge en témoignage. Selon cette méthode, les boîtes de Pétri sont remplies de 10 à 20 ml de bouillon d'agar et inoculées avec des micro-organismes. L'incorporation des huiles essentielles peut se faire de deux manières : sur un disque de papier **[Omer. 1998 et Aboutabl. 2000]** Durant l'incubation de 24h la substance est alors censée diffuser dans la gélose (à la surface ou dans la masse) ce qui créé un halo et un gradient de concentration dépendant de l'inhibition de la souche **(AISSAT Nouria et KASMIKatia.2007).**



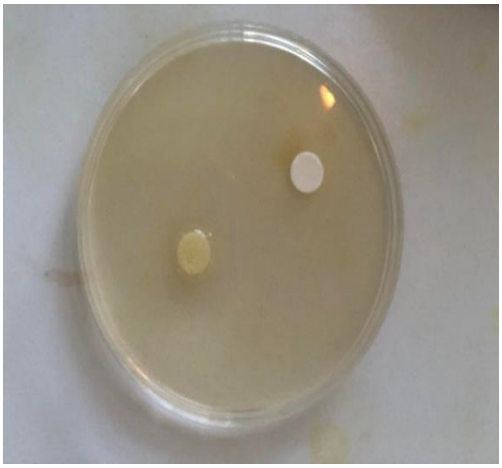




Figure 46 : Réalisation de l'Aromatogramme, à gauche disque imprégnée de l'huile d'Eucalyptus et à droite disque vierge (Témoin)



Figure 47 : Suspension bactérienne mesuré en densitomètre ayant 0.5 MF



Figure 48 : Etuve d'incubation

7. Inhibition de la formation de biofilm par l'huile d'Eucalyptus :

L'évaluation de l'inhibition de biofilm a été faite dans des microplaques de titration de 96 puits, l'huile pure a été mis en dilution en 11 fois avec la suspension ayant la bactérie avec un témoignage de BHIB et BHIB + la suspension bactérienne, puis incuber à 37°C durant 24h et mesurer sa DO.

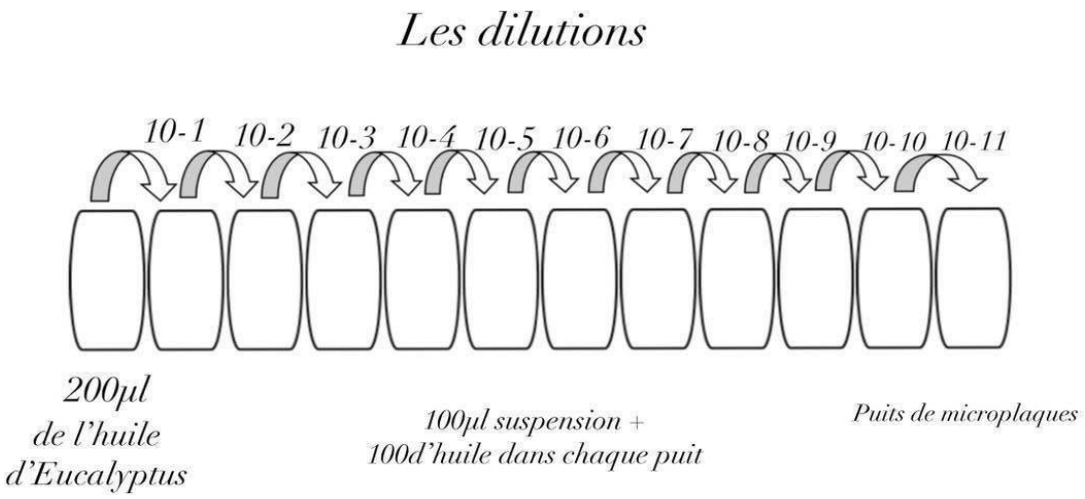


Figure 49 : Les dilutions de l'huile d'Eucalyptus dans les puits d'une microplaque

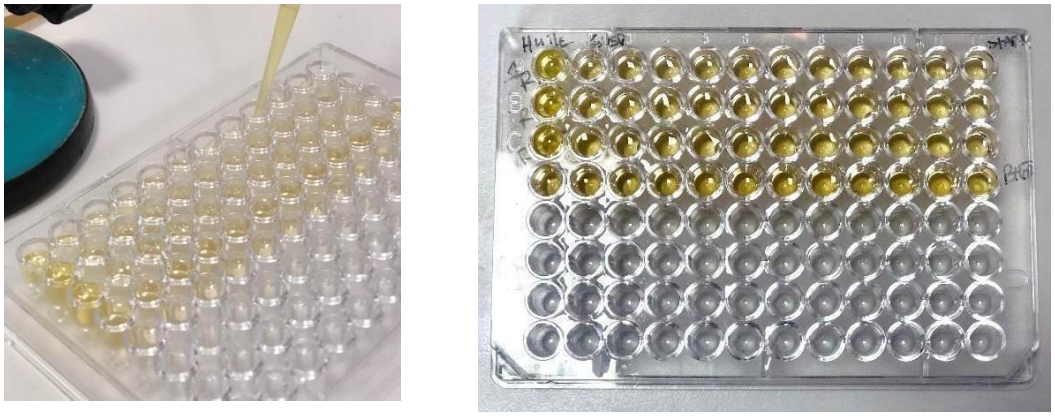


Figure 50 : Huile d'Eucalyptus + suspension bactérienne

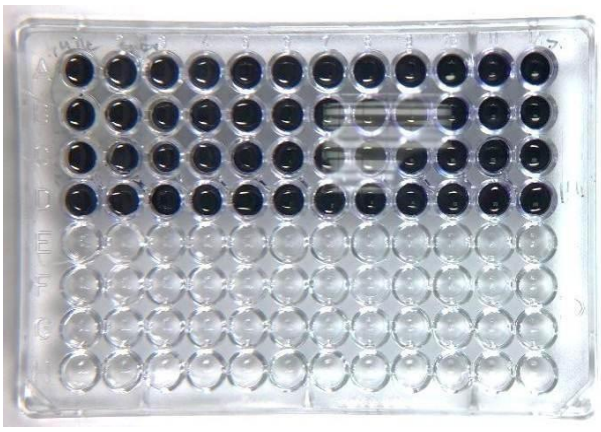


Figure 51 : Fixation de biofilm par cristal violet

Résultats

RESULTATS

1. Répartition des patients selon le sexe :

Les isolats des prélèvements étaient obtenus du 7 mars jusqu'à le 24 mai 2023.

Les prélèvements de pus :

Notre série se compose de 10 patients, 3 patients du sexe masculin et de 7 patients du sexe féminin.

Tableau 2 : Les pourcentages des prélèvements de pus selon le sexe

Sexe	Effectif	Pourcentage %
Femme	7	**70%**
Homme	3	30%

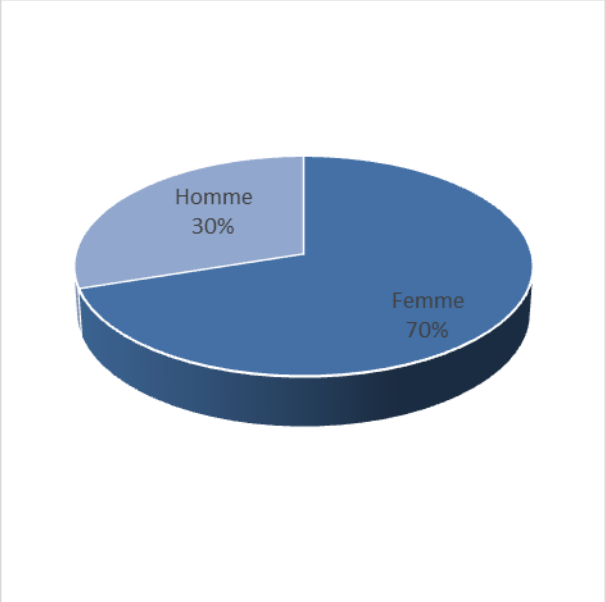


Figure 52 : Répartition en graphe circulaire des prélèvements de pus selon le sexe.

Commentaire : La population étudiée a été composée de 10 patients, ils sont caractérisés par une nette prédominance féminine avec un pourcentage de 70% contre le sexe masculin 30%.

Sex-ratio : F/H = 2,33.

Les prélèvements de Coproculture (selles) :

Notre série se compose de 10 patients, 3 du sexe féminin (3 adultes et 1 enfant) et de 6 patients du sexe masculin.

Tableau 3 : le pourcentage des prélèvements de coprocultures selon le sexe

Sexe	Effectif	Pourcentage %
Femme	3	30%
Homme	6	**60%**
Enfants	1	10%

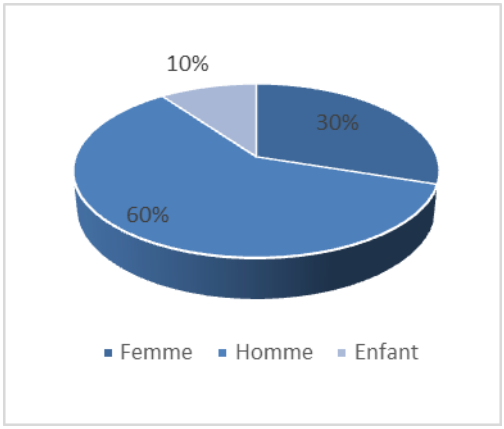


Figure 53 : Répartition des prélèvements de coprocultures selon le sexe.

La population étudiée a été composé de 10 patients, ils sont caractérisés par une nette prédominance du sexe masculin avec un pourcentage de 60% contre le sexe féminin ; 30% et enfants 10%.

Sex-ratio F/H = 0.5.

Les prélèvements urinaires ECBU :

Notre série se compose de 10 patients, 8 du sexe féminin et de 2 patients du sexe masculin.

Tableau 4 : Les pourcentages des prélèvements urinaires selon le sexe

Sexe	L'effectif	Pourcentage%
Femme	8	**80%**
Homme	2	20%

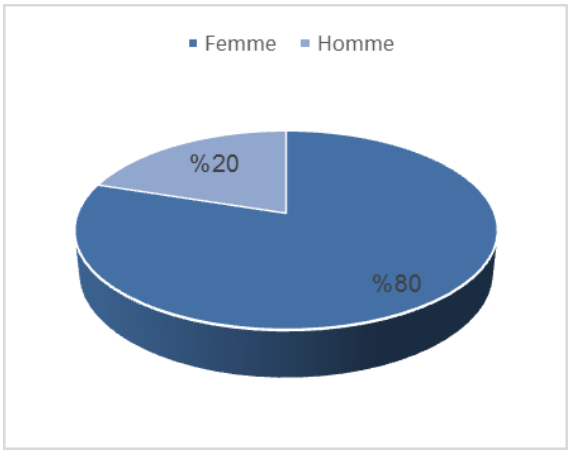


Figure 54 : Répartition des prélèvements urinaire selon le sexe

La population étudiée a été composé de 10 patients, ils sont caractérisés par une nette prédominance du sexe féminin avec un pourcentage de 80% contre le sexe féminin ; 20%.

Sex-ratio : F/H = 4.

2. Identification des souches:

Durant notre étude les 5 souches on été repiquées des prélèvements initiaux pour les transplanter sur 5 milieux de culture : Hektoen, Chapman, MacConkey, gélose nutritive, Cétrimide)

Identification macroscopique : Les résultats d'identification macroscopique des souches isolées sur différents milieux sont basés sur des caractéristiques morphologiques (taille, couleuret aspect).

Tableau 5 : Résultats d'observation macroscopique des souches isolées.

Milieu de culture	Croissance	Type de souche
Hektoen	Colonies vertes et jaunes à saumon, isolées et de grande taille	*E. coli, Pasteurella spp*
Chapman	Colonies jaunes	*Staphylococcus epidermidis*
MacConkey	Colonies roses	*Enterobacter cloacae serratia marcescens* *Aeromonas hydrophila*
Gélose nutritive	Colonies blanches**,** isolées et de petites tailles	*E. coli, Staphylocoque eperdimis, Aeromonas hydrophila, Enterobacter cloacae serratia marcescens, Pasteurella spp*
Cétrimide	Colonies blanches perlées, transparences	*Pasteurella spp*
Gélose au sang	Colonies blanches, isolées et petites taille	*Aeromonas hydrophila*

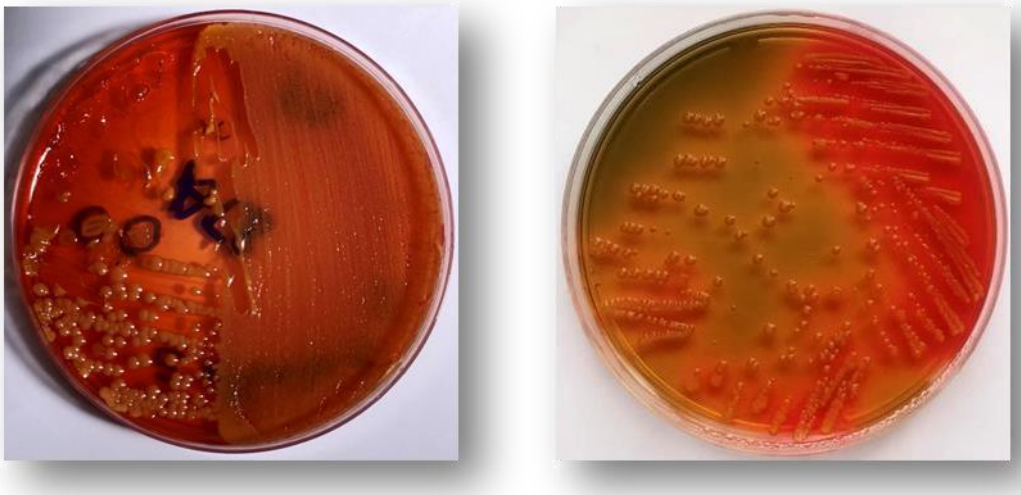


Figure 55 (Photos personnelles): Aspect d'*Aeromonas hydrophila* sur le milieu Hektoen (colonie bactérienne humide et brillante)

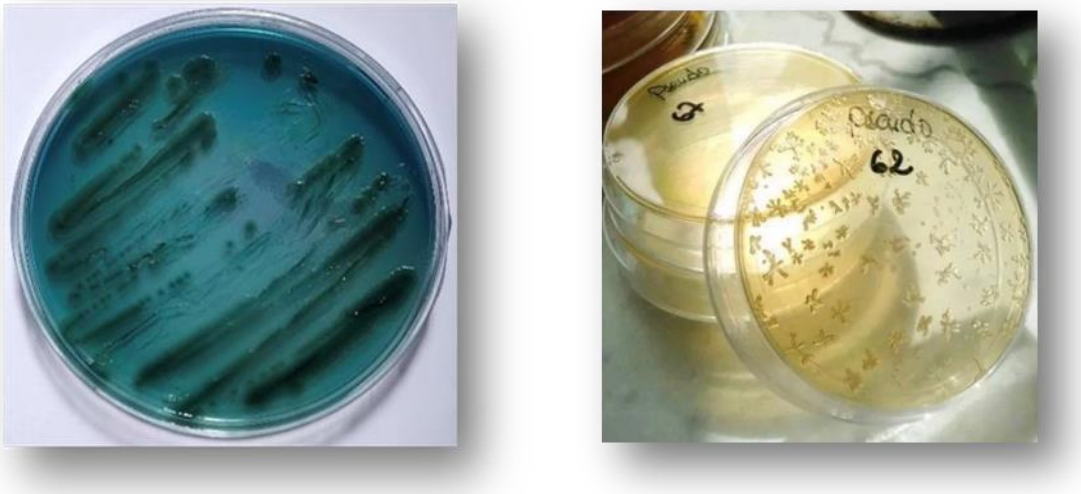


Figure : 56 (pp) Aspect de *Pasteurella spp* sur le milieu Hektoen et Cétrimide (colonie bactérienne humide et brillante)



Figure 57 : (pp) Aspect d'*E.coli* sur le milieu Hektoen

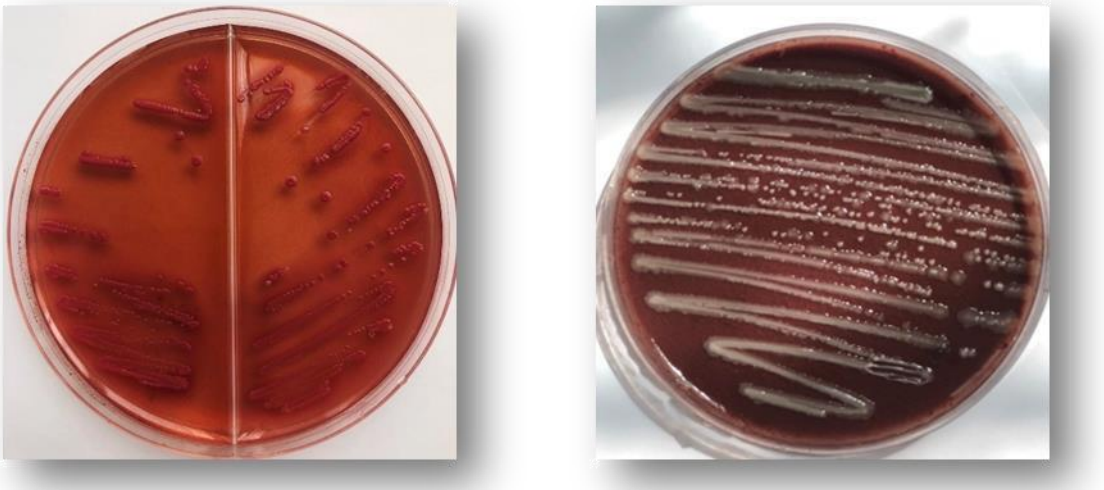


Figure 58 : Aspect d'*Aeromonas hydrophila* sur le milieu MacConkey et sur gélose au sang



Figure 59 : (pp) Aspect de *Staphylococcus epidermidis* sur le milieu Champan

Identification microscopique: les résultats d'identification microscopique sont basés sur la coloration de Gram. Les bactéries Gram+ sont colorées en violet et les bactéries Gram-sont colorées en rose.

Tableau 6 : Résultat de coloration de Gram des souches

Les souches	**Gram et forme des colonies**	**Couleur**
Staphylococcus epidermidis	Cocci gram+ (Grappes de raisins)	Violet
Aeromonas hydrophila	Coco-bacille gram-	Rose
Pasteurella spp	Bacille gram-	Rose
E. coli	Bacille gram-	Rose
Enterobacter cloacae serratia marcescens	Bacille gram+	Violet

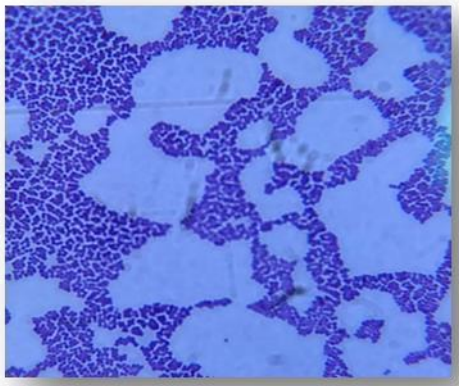


Figure 60 : (pp) Cocci Gram^{+} de (*Staphylococcus epidermidis)*

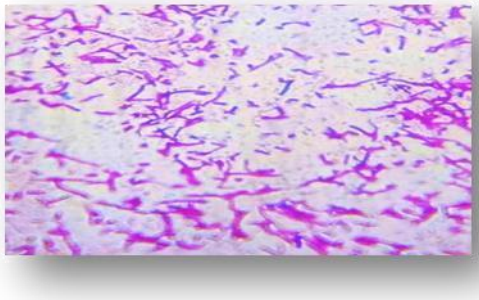


Figure 61 : (pp) Bacille Gram^{-} (*E. coli)*



Figure 62 : (pp) Bacille Gram^{+} (Enterobacter cloacae serratia marcescens)

3. Recherche des enzymes respiratoires (Test Catalase et Oxydase) :

Test catalase : Ce test détermine la direction initiale dans l'identification des bactéries, sert a la neutralisation. La libération d'oxygène indique la présence de l'enzyme catalase due à la production d'O2 . La plupart des bactéries à Gram- possède l'enzyme de catalase est dite bactérie catalase positive**.**



Figure 63 : (pp) Réaction de la catalase positive *(Staphylococcus epidermidis et Pasteurella spp)*



Figure 64 (pp) : Catalase négative

Test Oxydase : La recherche d'oxydase est une technique d'identification en bactériologieconcernant les bactéries à gram-

L'apparence d'une tache violette ou rose violacé indique une oxydation bactérienne du substrat de la NN-diméthyl-paraphénylène diamine (un réactif incolore)

Tableau 7 : Résultat du test catalase et oxydase

Souches	Catalase	Oxydase
Staphylococcus epidermidis	+	-
Pasteurella spp	+	+
Aeromonas hydrophila	+	-
Enterobacter clocae Serratia Maecescens	+	-
E. coli	+	-

Test coagulase :

L'enzyme de coagulation, facteur de coagulation, reste attachée aux parois cellulaires de Staphylococcus. a différencier Staphylococcus aureus qui donne un test positif. Des expériences en tube ont été réalisées en ajoutant 2 à 4 colonies isolées dans des tubes contenant du plasma de lapin coagulase réhydraté et en incubant à 37°C pendant un maximum de 4 heures. Notre résultat montre un test négatif.

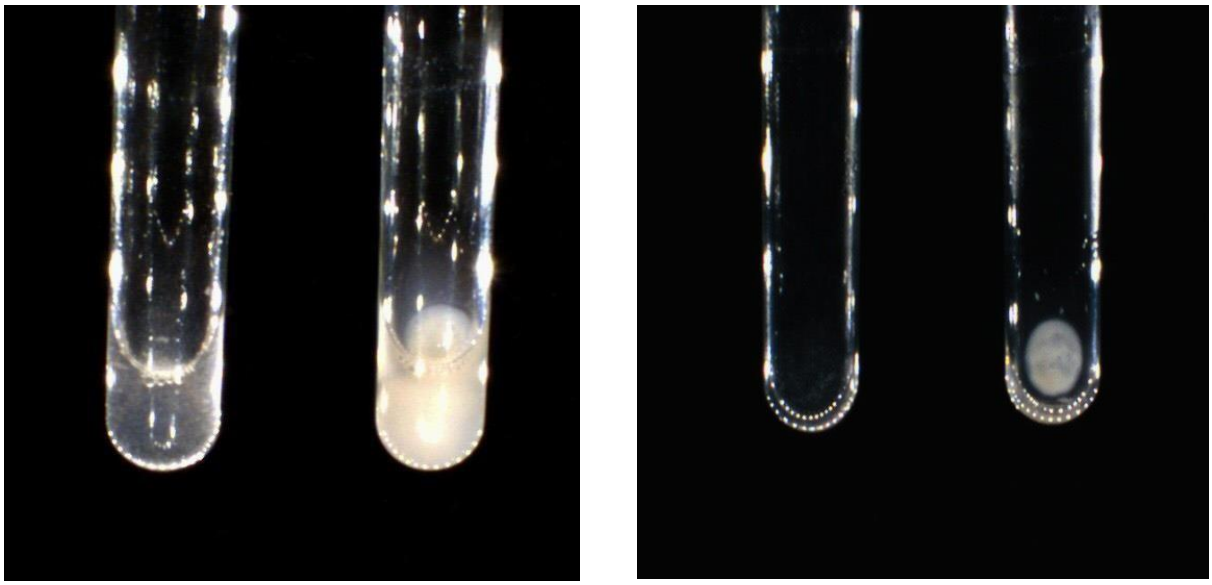


Figure 65 : Résultat de la coagulase négative de Staphylococcus epidermidis

4. Identification biochimique:

Tests biochimiques :

Ce tableau représente la lecture des milieux de culture dans des tubes a essais après ensemencement en culot + pente et incubation d'une durée de 24h à 37

Tableau 8 : Résultat des tests biochimique d'*E. coli*

Souche	Test	Caractères recherché	Résultat
Escherichia. coli	**Mannitol**	Mobilité	Mobile (trajet jaune avec un temps de 3 divisions/h)
	KIA	• Formation de gaz • La lysine decarboxylase • Fermentation de glucose (test ONPG)	• Pas de virage de couleur / • Pas de culot jaune (dégradation de glucose) • ONPG- • LDC+
	TSI	• Fermentation des sucres	• Pas de virage de couleur • Pas de culot jaune : (dégradation, de glucose) • Lactose – • Pas de pente rouge • Absence de H2S • Formation de gaz
	Viande foie	• Aérobie stricte : en presence d'O2 • Aero-anaérobie facultative en absence d'O2	• Aéro-anaérobie Facultative
	Citrate de Simmons	• Utilisation de citrate	• Citrate negative : la coloration du milieu passe du vert a bleu vif



Figure 66 : (pp) Tests biochimiques

Enrichissement Enzymatique (Urée + Test réductase I et II):

Ce tableau montre le résultat de l'enrichissement enzymatique des tests Urée et Réductase

Tableau 9: Résultat de l'enrichissement enzymatique

Souches	Test Urée	Test reductase
Staphylococcus epiderimidis	• Apparence de virage de couleur • Urée +	• Absence de virage de couleur • Reductase - • Bactérie non réductrice
Pasteurella spp	• Absence de virage de couleur • Urée -	• Apparence de virage de couleur en orange • Reductase + • Bactérie riche en enzyme
E. coli	• Apparence de virage de couleur • Urée -	• Apparence de virage de couleur en orange • Reductase + • Bactérie riche en enzyme

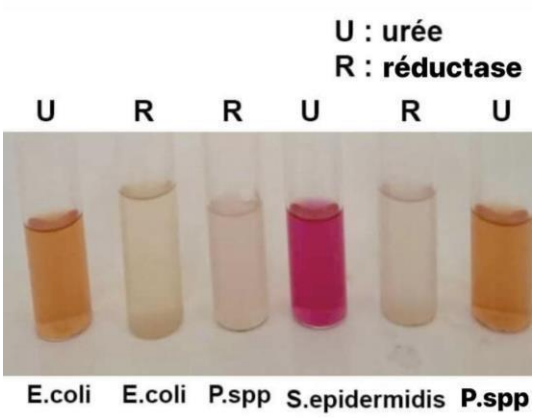


Figure 67 : Résultat de la mini galerie classique d'E.*coli, Pasteurella spp, Staphylococcus epidermidis,*

Lecture des galeries biochimiques

Le tableau suivant montre la lecture de l'Api20E des Entérobactéries : *E. coli, Enterobacter cloacae Serratia marcescens, Aeromonas hydrophila* après 24h d'incubation.

Tableau 10: Lecture de l'Api20E

Test	*E. coli*	*Enterobacter cloacae Serratia marcescens*	*Aeromonas hydrophila*
ONOG	+	+	-
ADH	+	+	+
LDC	+	-	+
ODC	+	+	+
CIT	-	+	-
H2S	-	-	-
URE	-	-	-
TDA	-	-	-
VP	-	+	+
GEL	+	-	+
GLU	-	+	-
MAN	-	+	-
INO	+	-	-
SOR	+	+	-
RHA	-	+	-
SAC	+	+	-
MEL	+	+	-
AMY	+	+	-
ARA	-	+	+

(+): Test positive **(-): Test negative**



Figure 68 :(pp) Résultat d'Api20E d'*Enterobacter cloacae serratia marcescens*

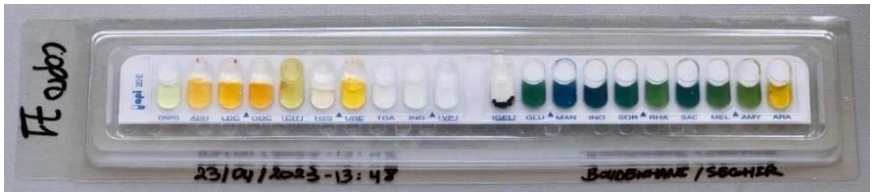


Figure 69 : (pp) Résultat d'Api20E d'*E. coli*

Le tableau suivant montre la lecture de l'Api Staph de *Staphylococcus epidermidis*

Tableau 11 : Lecture de l'Api Staph

Test	*Staphylococcus epidermidis*
O	-
FRU	+
LAC	-
TRE	-
XLT	-
MEL	-
NIT	+
PAL	+
VP	+
RAF	-
XYL	-
MDG	-
NAG	+
ADH	+
URE	+



Figure 70 :(pp) Résultat de l'Api Staph

Tableau 12 : Lecture de l'Api20E de *Pasteurella spp*

Test	*Pasteurella spp*
NO3	-
TRP	-
GLU	+
ADH	+
URE	+
ADH	+
GEL	+
PNPG	+
GLUa	-
ARAa	-
MNEa	-
MANa	-
NAGa	-
MALa	-
GNTa	-
CAPa	-
ADIa	-
MLTa	-
CITa	-
PACa	-
Ox	-



Figure 71 : Api20E de *Pasteurella spp*

5. Antibiogramme :

L'étude des sensibilités aux antibiotiques des souches isolées par la méthode de diffusion des disques antibiotiques sur le milieu Muller Hinton, permet d'obtenir dés résultats suivants après 24h d'incubation :



Figure 72 : (pp) Résultat de l'antibiogramme d'*Aeromonas hydrophila*



Figure 73 : Résultat de l'antibiogramme de *Staphylococcus epidermidis*

La prédominance des souches résistantes selon espèce :

Tableau 13 : Résultat de la prédominance des souches résistantes selon espèce

Souche	Nombre de caractère sensible	Nombre de caractère résistant	Pourcentage%
Staphylococcus epidermidis	11	3	21%
Escherichia coli	3	10	77%
Pasteurella spp	2	16	88%
Aeromonas hydrophila	8	8	50%
Enterobacter cloacae Serratia marcescens	8	5	38%
Totalité	32	42	57%

Le résultat de la sensibilité aux antibiotiques des 5 souches isolées montre que *Aeromonas hydrophila* présente une résistance très élevée, soit 88%, *Escherichia coli* présente une résistance élevée, soit 77%, *Pasteurella spp* qui présente une résistance moyenne ; soit 50%. Par la suite *Enterobacter cloacae Serratia marcescens* et *Staphylococcus epidermidis* sont caractérisés par un taux de résistance faible ; soit 38% et 21% par ordre décroissant

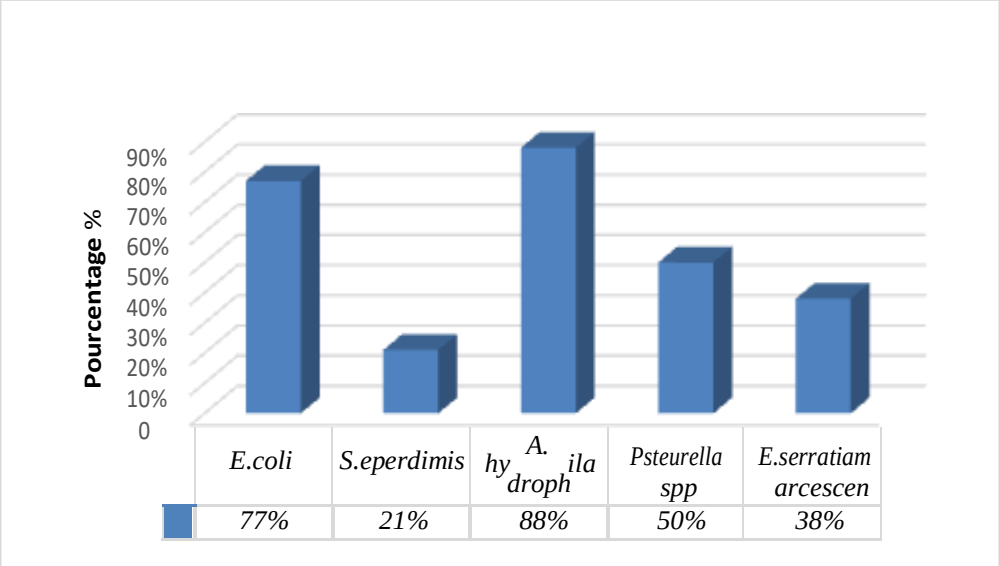


Figure 74 : Répartition graphique des souches résistantes par espèces

Prédominance des souches résistantes selon différentes services :

Tableau 14 : Résultat de la prédominance des souches résistantes par différents services

Service	Nombre de caractère sensible	Nombre de caractère résistant	Pourcentage %
GYN (Gynécologie)	14	13	48%
HD (Hémodialyse)	8	8	50%
CHH (Chirurgie homme)	2	16	89%
CHF (Chirurgie femme)	11	18	62%
UMC (Urgence médio chirurgical)	17	23	57,5%
CCI (Chirurgie infantile)	11	3	21%
INF (Infection)	26	53	67%
ONCO	3	10	77%

(Oncologie)			
OPHT (Ophtalogie)	8	8	50%
MAT (Micro angiopathie thrombochirurgie femme)	3	10	77%
MH (Médicine homme)	3	10	77%
MF (Médicine femme)	3	10	77%
PED (Pédiatrie)	6	20	77%
EXT (Externe)	26	65	71%
Totalité	141	267	65%

La répartition des patients ayant une infection nosocomiale ont été distribué dans le graphe a barre précèdent selon les différents services de l'hôpital de Médéa.

La prévalence des patients est considérable chez le service de CHH (chirurgie homme) avec un pourcentage de 89% suivis par le service ONCO (oncologie) et pédiatrie avec un taux de 77%. HD (hémodialyse) ayant 50%. Quoique les IN ont été faibles au niveau du service de CCI (chirurgie infantile) avec un taux de 21%.

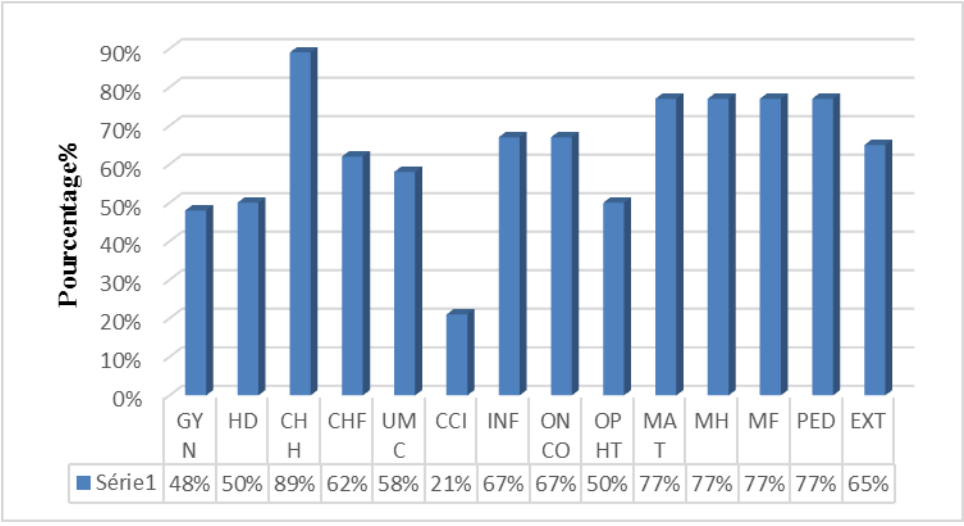


Figure 75 : Répartition des souches résistantes par différents services de l'EPH de Médéa.

Prédominance des souches résistantes aux différents antibiotiques :

La représentation graphique présente la résistance des souches : *(E. coli, Staphylococcus epidermidis, A. hydrophila, Pasteurella spp, E, Serratia marcescens*) aux différents antibiotiques :

Le profil de l'antibiogramme de *Staphylococcus epidermidis* a révélé les résultats suivants :

Une forte résistance avec un taux de 40% a la pénicilline P et une sensibilité a l'Oxacilline OX, la kanamycine K30, et l'Erythromycine E15.

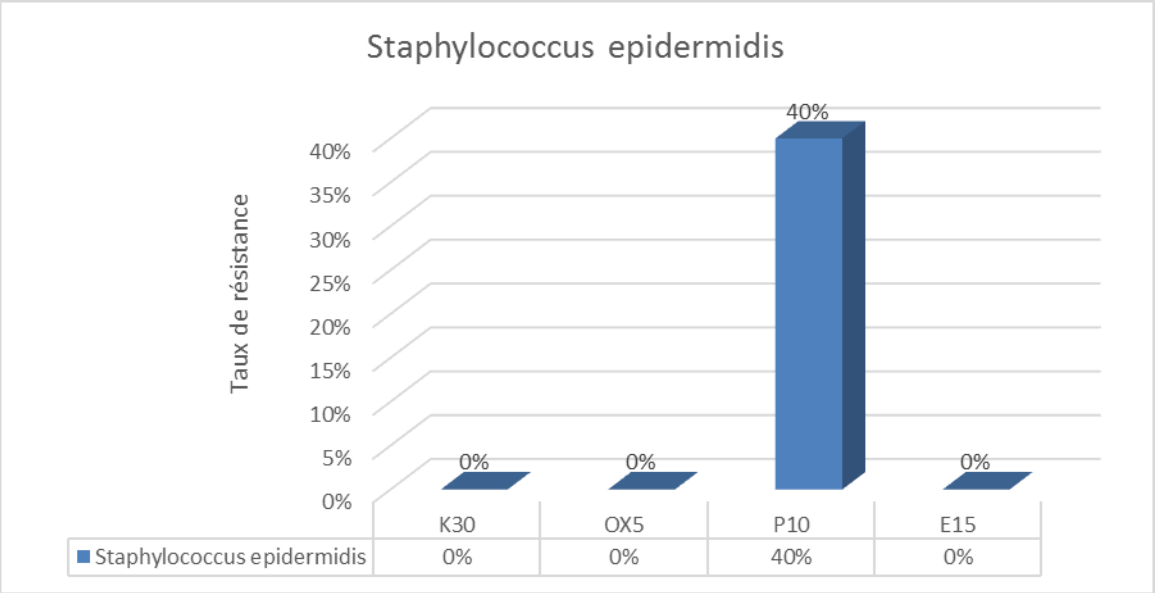


Figure 76 : Représentation graphique de l'antibiogramme de *Staphylococcus epidermidis*

Le profil de l'antibiogramme de *Pasteurella spp* révélé les résultats suivants :

Une forte résistance avec un taux de 50% à Ticarcilline clavulanique TCC 75+25, par la suite une résistance modérée à la Nalidixic acide NA30 avec un taux de 34%, à la Erythromycine E15 avec un taux de 23%, cette bactérie présente une résistance faible a Colistine CL10 et la Rifampicine RF5 avec un taux de 6%.

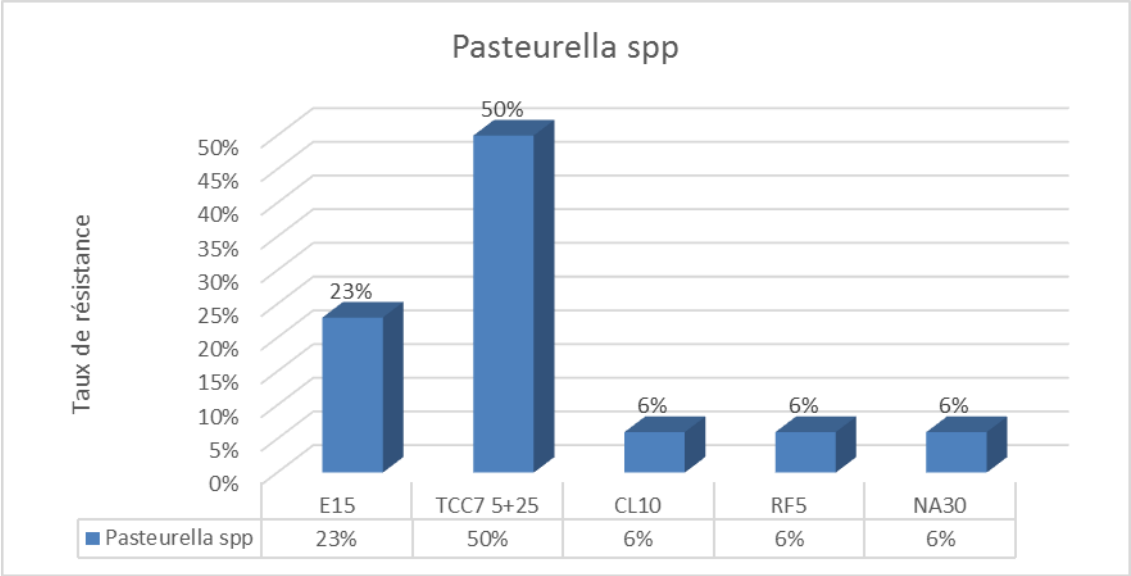


Figure 77 : Représentation graphique de l'antibiogramme de *Pasteurella spp*

Ce graphe représente la comparaison de la résistance de deux souches *E.coli* et *A.hydrophila* : E *.coli* présente une résistance élevée au Fusidique FC 10 avec un taux de 53% alors *qu'Aeromonas hydrophila* présente une résistance élevée à la colistine CL 25 avec un taux de 51%.

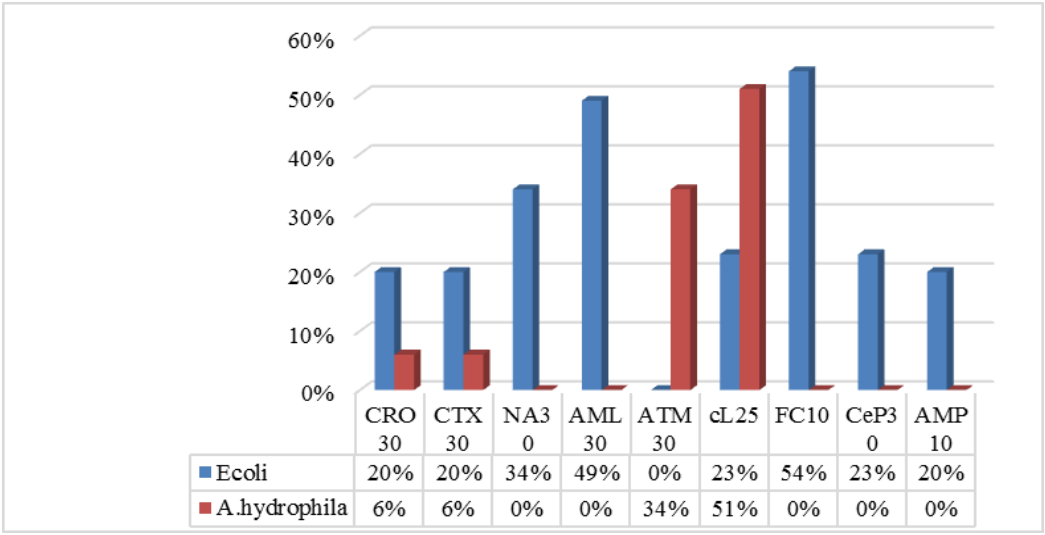


Figure 78 : La comparaison de résistance d'*E. coli* et *A.hydrophila*

Le profil de l'antibiogramme d'Enterobacter serratia marcescence révélé les résultats suivants : Une forte résistance avec un taux de 23% à l'Ampicilline AMP 3 et à la kanamycine KZ 30, par la suite une faible résistance à la Nitrofurantoine F 300 avec un taux de 6% et aucune résistance aux Amoxicilline-acide clavulanique AUG 30, Cefoxitine FOX 30, Acide fusidique FC 10 et à la Cephalothin Cep 30.

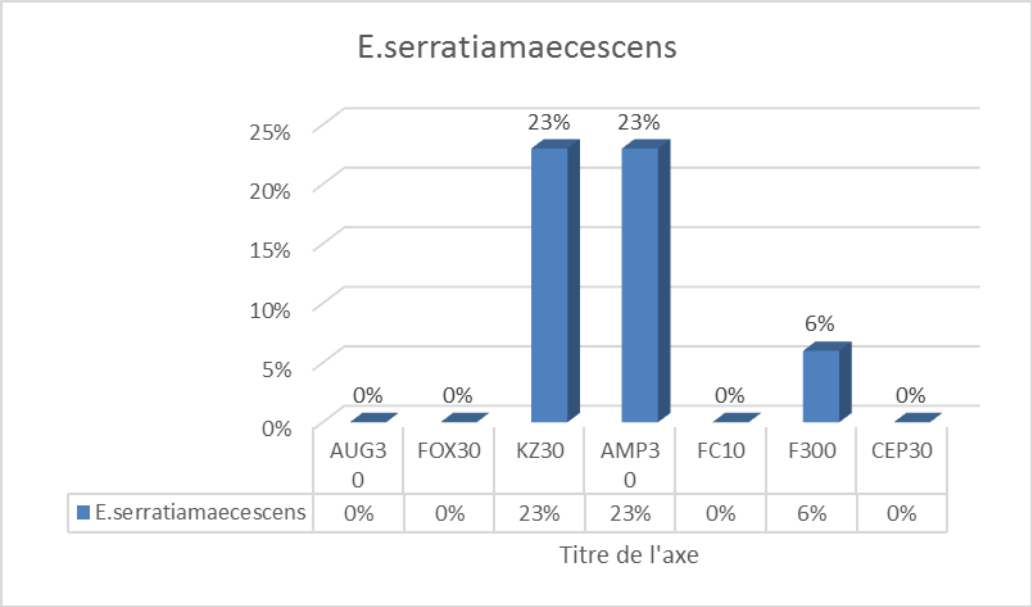


Figure 79 : Représentation graphique de l'antibiogramme d'*E. Serratia marcescens*

6. Répartition des souches isolées de 30 prélèvements :

Ce tableau présente la répartition des souches isolées de 30 prélèvements

Tableau 15: les pourcentages des souches isolées de 30 prélèvements

Souche	Nombre des souches isolées	Pourcentage%
E. epidermidis	4	13%
A. hydrophila	1	3%
E.coli	21	70%
Pasteurella spp	3	10%
E. serratia marcescens	1	3%

Sur 30 prélèvements positifs au cours de notre étude, E. coli est l'espèce bactérienne la plus fréquemment trouvée avec un taux de 70% de l'ensemble des espèces étudiées, suivis par *Staphylococcus epidermidis* (13%), *Pasteurella spp* (10%) et *Aeromonas hydrophila* et *Enterobacter serratia marcescens* avec un taux de (3%)

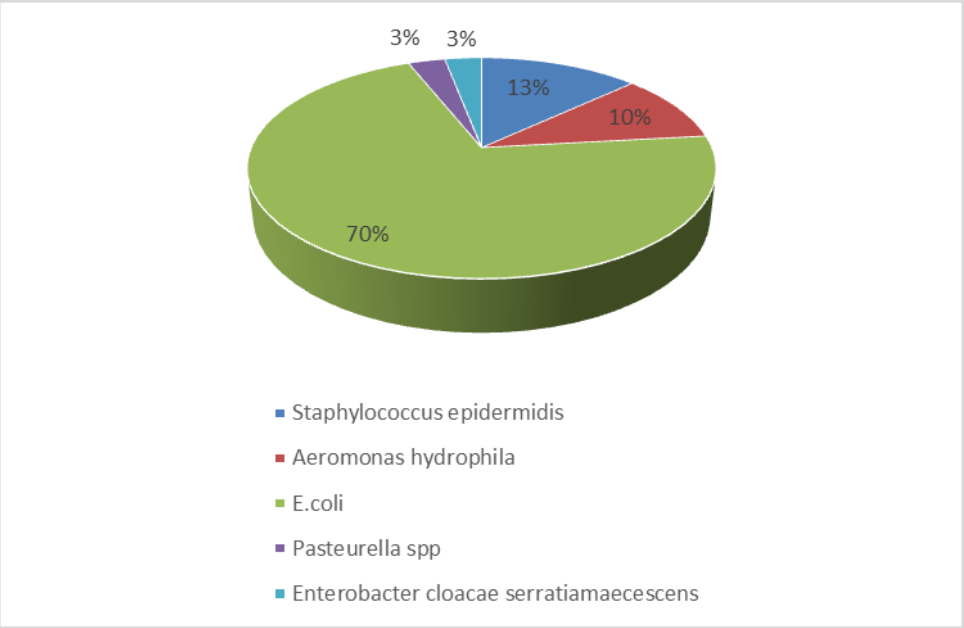
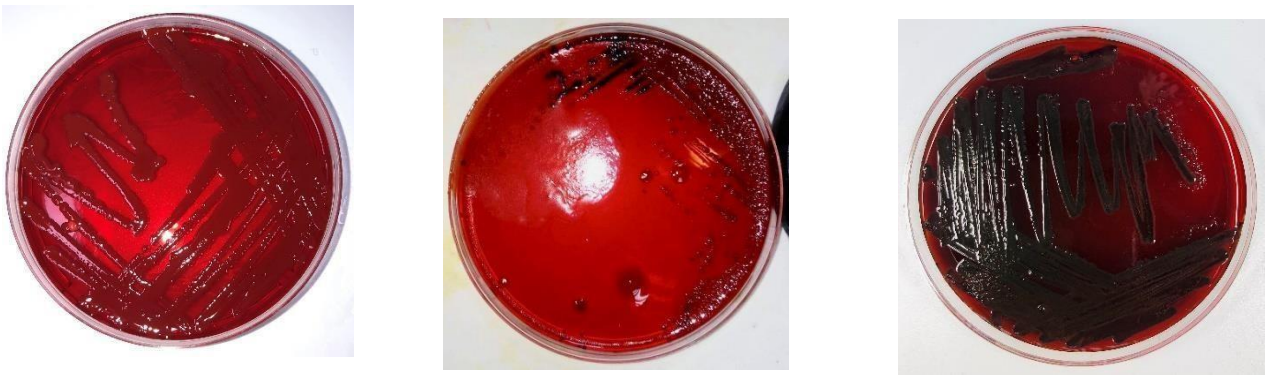


Figure 80 : Le taux des 5 souches isolées selon 30 prélèvements

7. L'évaluation de la formation de biofilm :

Evaluation de la production de slim par la méthode au Rouge Congo :

La recherche de la production de slim sur gélose BHIB additionné de Rouge Congo a été réalisée par culture des souches isolées. Les résultats sont positives pour *Aeromonas hydrophila*, deux phénotypes sont observés ; des colonies grises et des colonies a centre noir avec surface rugueuse, par contre les colonies de couleur lisse et rouge sont observés chez les souches d'*E.coli*. des colonies avec léger centre noir ont été observés chez les souches de *Staphylococcus epidermidis*. La figure n° illustre les résultats de la production de slim après incubation de 24H



E.coli ***Staphylococcus epidermidis*** ***Aeromonas hydrophila***

Souche non productrice de biofilm	Souche modérément productrice de biofilm	Souche fortement productrice de biofilm

Figure 81 : Phénotype de production et non production de slim.

Réparation des 5 souches sur gélose Rouge Congo :

Tableau 16 : Pourcentage de formation de biofilm des 5 souches sur gélose Rouge Congo

Souche	*A : E. coli,* *E. cloacae serratia marcescens*	*B: Pasteurella spp, Staphylococcus epidermidis*	C : Aeromonas hydrophila
Type de formation de biofilm	Non	Modérée	Fort
Pourcentage %	40%	20%	40%

Représentation graphique de % des 5 souches sur gélose Rouge Congo

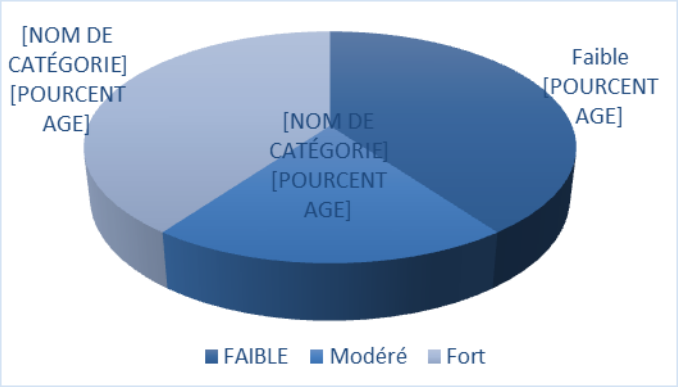


Figure 82 : Fréquence des différents aspects macroscopiques des souches testées à la formation de slim.

Evaluation de la formation de biofilm par la technique de plaque culture de tissue (TCP) :

Selon la technique des plaques de culture de tissu, avec des puits en polystyrène sur lesquelles les bactéries vont adhérer et former le biofilm permettant une évaluation quantitative et qualitative en utilisant le milieu BHIB additionné de différents pourcentages de glucose et saccharose, en évaluant l'impact des conditions et paramètres environnementales sur la formation de biofilm pour les isolats, la température d'incubation est de 48h sous différents températures (28°, 35° et 37°)

La formation de biofilm a été observée chez les 5 souches que nous avons choisit, les valeurs de résultats obtenues des 2 répétitions sont montrées dans l'annexe.

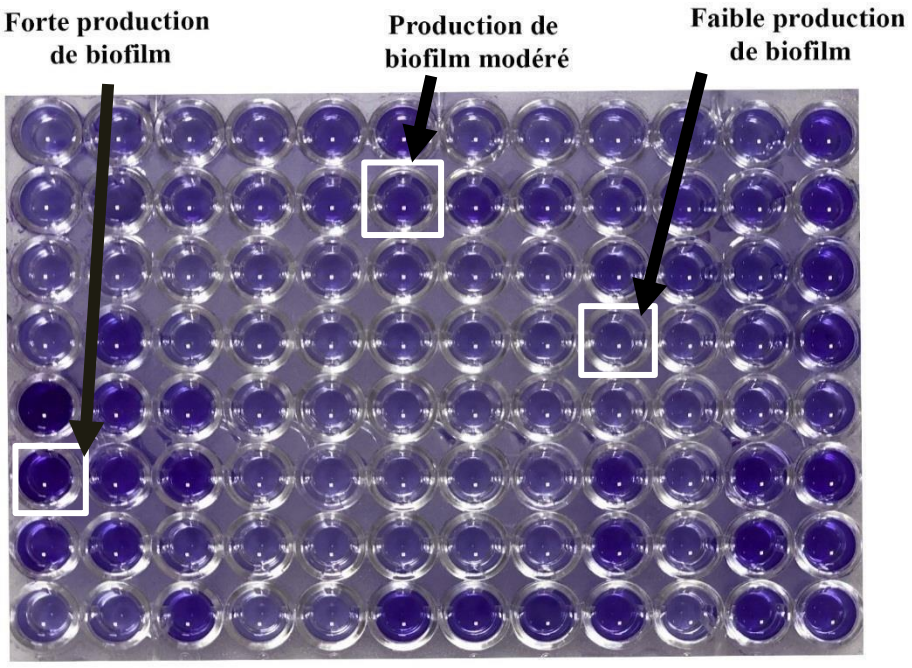


Figure 83 : Evaluation de la production de biofilm par la méthode TCP

Evaluation de la formation de biofilm selon l'effet des sucres additionnés :

Ce graphe à barre montre l'effet de l'ajout des différentes concentrations de glucose, de saccharose et le glucose (variable) additionné avec le saccharose (fixé)

Les résultats montrent que l'ajout de glucose favorise la formation de biofilm est mieux que l'ajout du saccharose seul ou le mélange des deux. Relativement à chaque sucre, les résultats montrent l'augmentation délicatement ascendante de la formation de biofilm en corrélation directe avec la concentration de sucre 2%, 3%,4%,5%. Vis-à-vis le saccharose, le résultat après l'ajout de 3% ou 4% est légèrement meilleur par rapport à l'ajout de 2 ou 5% de saccharose dans le milieu BHIB, touchant le mélange de glucose et saccharose, la densité de la production de biofilm était peu différente, l'ajout de 2% de glucose + 4% de saccharose montre la densité la plus élevée.

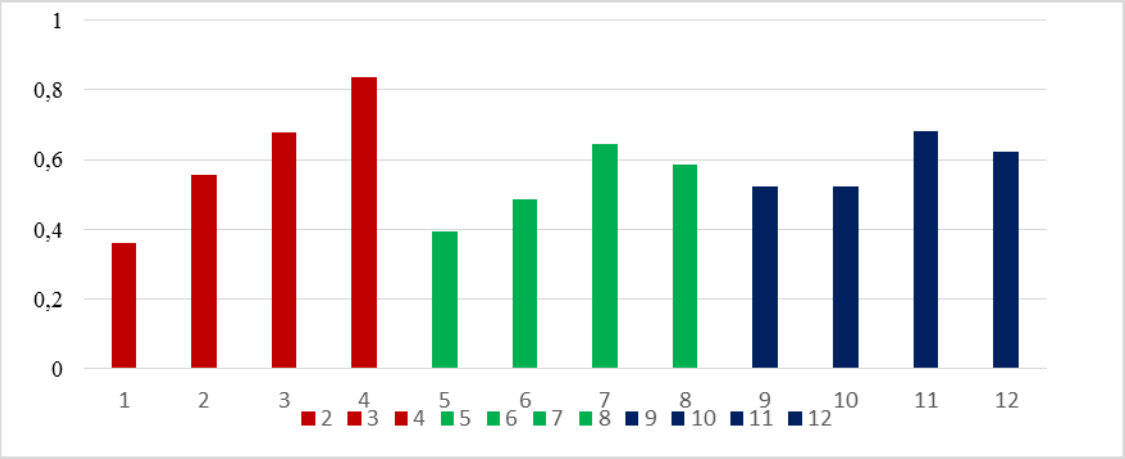


Figure 84 : L'effet sur la formation de biofilm selon les sucres additionnés

Etude de la formation de biofilm en fonction de température :

Les résultats ont montré que le biofilm dans le milieu BHIB incubé à 28° est formé plus fort en comparaison avec les résultats obtenus à 35° et par la suite 37°

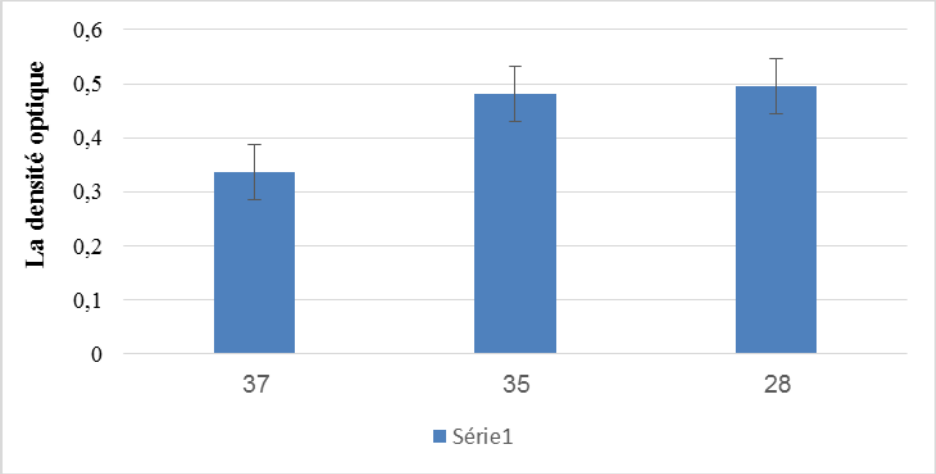


Figure 84 : Evaluation de la formation de biofilm par différentes températures

Inhibition de la formation de biofilm de l'huile essentielle d'Eucalyptus :

Les résultats de l'inhibition de la formation des biofilms par l'huiles d'Eucalyptus montre que moins la concentration de l'huile plus la formation de biofilm.

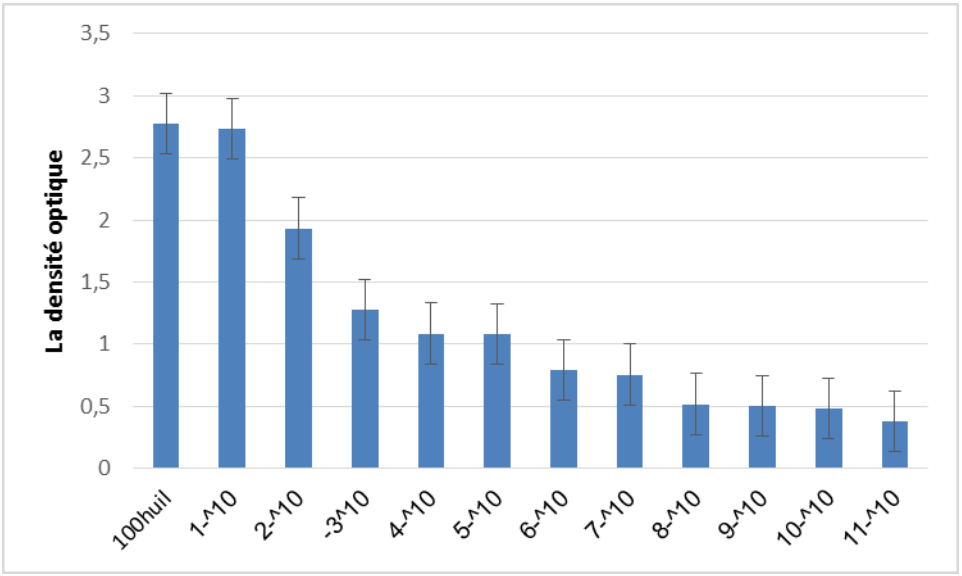


Figure 85 : Inhibition de la formation de biofilm par l'huile essentielle d'Eucalyptus

8.Étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'Eucalyptus (Aromatogramme) :

L'aromatogramme a été réalisé pour les 5 souches isolées la sensibilité à l'huile essentielle (Eucalyptus) par la méthode des disques vierge sur le milieu de Muller Hinton, les résultats montre qu'une sensibilité extrême a été marquée par *Staphylococcus epidermidis* avec un diamètre de 32mm, *Enterobactercloacae Serratia marcescens* marque une sensibilité d'un

diamètre de 16mm. *Aeromonas hydrophila*, *E.coli* et *Pasteurella spp* marquait une sensibilité de 14mm, 13 mm, 10mm) par ordre décroissant.

Tableau 17 : Résultat de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'Eucalyptus :

Souches	**Diamètre**	**Transcription**	**Zone d'interpretation**
Staphylococcus epidermidis	32mm	+ + +	Extrêmement sensible
Pasteurella spp	10mm	+	Sensible
Enterobactercloacae Serratia marcescens	16mm	++	Très sensible
Aeromonas hydrophila	14mm	+	Sensible
E. coli	13mm	+	Sensible

[19,1] : sensible. **[15;19] : Très sensible** **>20 : Extrêmement sensible**



Figure 86 : Aromatogramme d'*E.coli*

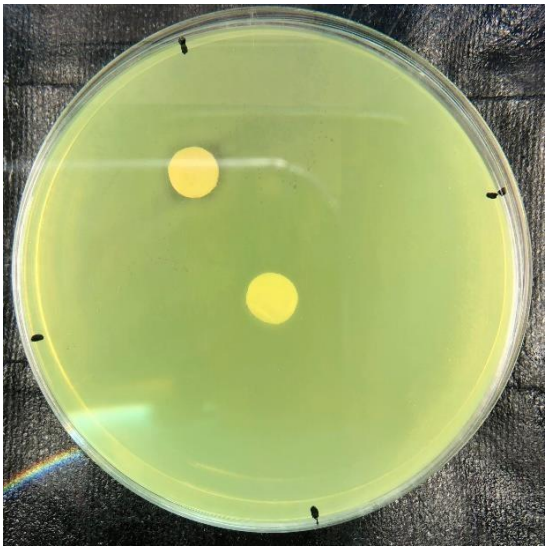


Figure 87: Aromatogramme de *Pasteurella spp*

DISCUSSION

Discussion:

Notre étude a été menée au niveau du laboratoire de l'hôpital de Médéa (service de microbiologie) qui était rétrospective et prospective. Les résultats obtenus sont cohérents et révèlent ce qui suit :

Les résultats montrent que les infections nosocomiales surviennent plus fréquemment chez les femmes (64 %) que chez les hommes (36 %). Ces résultats s'expliquent par la nette prépondérance des hospitalisations des femmes par les services spécialisés en Médecine femme (77%), gynécologie féminine (48%), Médecine femme (77%) et chirurgie femme (62%). Ces résultats sont quelque peu similaires à l'étude de **(Ratiba.Z, 2022).**

1. **Les prélèvements d'infections nosocomiales étudiés et les germes responsables :**

Les types d'échantillons prélevés à l'hôpital les plus couramment identifiés étaient les échantillons fécaux, d'urine et de pus.

En ce qui concerne les bactéries en question, les principales bactéries couvertes dans cette série sont, par ordre décroissant :

Escherichia coli (70%), constituant 50% de la flore terminale de l'intestin **(Patrice DEBRÉ et al. 2014)**, Staphylococcus epidermidis (13%) et Pasteurella spp.(10%) à partir d'échantillons de pus, Aeromonas hydrophila (3%) et Enterobacter cloacae (3%) à partir d'échantillons d'urine.

2. **L'antibiorésistance des souches étudiées :**

Concernant la résistance aux antibiotiques, notre étude a identifié deux bactéries multirésistantes. *Pasteurella spp* (88%), qui est très résistant à l'acide fusidique, et Escherichia coli (77%), qui est très résistant à la colistine de la famille des polymyxines **.**La résistance aux staphylocoques (21 %) était plus faible par rapport à Enterobacter serratia marcescens (38%) alors que Aeromonas hydrophila présente une résistante moyenne (50%).

L'étude de **Hassini. W** et **Mekawi. H (2022)** montre que Staphylococcus aureus se caractérise par un taux de résistance élevé de 66%, suivi par Enterobacter à 60%.

3. **La formation des biofilms des souches étudiées :**

Les chercheurs montrent que la première étape d'une infection à staphylocoque consiste à se fixer à des surfaces de divers matériaux, y compris des dispositifs médicaux et des tissus hôtes. Ces réponses ont été attribuées à la combinaison de facteurs extracellulaires tels que l'adhérence et la formation de biofilm **(Salman Sahab Atshan.2012).**

La formation de biofilm a été estimée à l'aide de la méthode de microplaque de titration à 96 puits et de la méthode Rouge Congo réalisée dans notre étude.

Concernant la formation de biofilm sur microplaques, les résultats obtenues ont montre que toutes nos souches étudiées démontrent la capacité à former des biofilms à différents seuils sous l'influence des sucres ajoutés et à différentes températures.

Ces résultats indiquent que le taux de formation de biofilm augmente avec l'augmentation de la concentration de glucose (5%) et de saccharose (3% et 4%). Ceux-ci sont presque identiques aux résultats de **Hassini. W et Mekawi. H (2022).**

Les résultats d'**Afreenish Hassan (2011)** prouvent que la méthode PCT est plus efficace que les méthodes MT et RCA. Sur un total de 110 isolats cliniques, 22,7% (producteurs élevés), 41%(producteurs modérés) et 36,3% (producteur faible ou aucune production de biofilm) ont été détectés par la méthode PCT. Et les bactéries formant un biofilm présentent une résistance aux antibiotiques plus élevée que les bactéries ne formant pas de biofilm.

Dans notre étude utilisant la méthode RCA, sur les cinq souches examinées, 20% étaient très productives (Aeromonas hydrophila), 40% étaient moyennement productives (Pasteurella spp et Staphylococcus epidermidis), 40% avait une faible production de slim (Escherichia coli et Enterobacter cloacae). Ces résultats par la suite sont grossièrement semblables aux résultats de d'Afreenish Hassan.

Freeman et al ont décrit une méthode qualitative simple pour détecter la formation de biofilm en utilisant un milieu de gélose au rouge Congo (RCA). Des colonies noires avec une consistance cristalline sèche indiquent la production d'un biofilm **(Afreenish Hassan, 2011)**

Quelques clones appartenant au même type de spa se sont avérés être fortement adhérent à la surface des plaques de microtitration en polystyrène mais a montré une production variable de slim sur la gélose au rouge Congo. Certains clones de différents types de spa se sont avérés être négatif pour la production de slim en rouge congo mais fortement adhérent à la surface des plaques de microtitration en polystyrène. Ainsi, la variation entre phénotypique et la caractérisation génotypique peut être due à l'hétérogénéité dans les origines génétiques, et non en raison de la présence ou absence de gènes nécessaires au biofilm.

Sur la base des résultats de **(Afreenish Hassan, Javaid Usman, Fatima Kaleem, Maria Omair, Ali Khalid, Muhammad Iqbal),** la méthode sur plaque de culture tissulaire a été considérée comme la méthode de référence dans cette étude et comparée aux données des méthodes MT et RCA. Des paramètres tels que la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive négative, la valeur prédictive positive et la précision ont été calculés. Ceux qui étaient vraiment positifs étaient les producteurs de biofilms utilisant les méthodes PCT, MT et RCA. Les résultats faussement positifs étaient des producteurs de biofilm pour les méthodes MT et RCA, mais pas pour la méthode PCT. Les faux négatifs étaient des isolats qui n'ont pas formé de biofilms avec les méthodes MT et RCA mais qui l'ont fait avec la méthode PCT. Un vrai négatif est celui qui n'a pas produit de biofilm en utilisant les trois méthodes. La sensibilité et la spécificité de la MT étaient de 73 % et 92,5 %, respectivement. La sensibilité et la spécificité de la méthode RCA sont restées faibles à 11 % et 92 %, respectivement.

Ces derniers résultats sont similaires à notre étude en ce que les taux de formation de biofilm par les trois méthodes sont différents.

4. Activité antimicrobienne de l'huile d'Eucalyptus :

L'activité antibactérienne de l'huile d'eucalyptus a été démontrée par la méthode de l'aromatogramme, une technique de mesure de l'activité antibactérienne des huiles essentielles Chémotypiques in vitro **(Bachir Raho Ghalem and Benali Mohamed).**

Cette technique a été réalisée selon deux méthodes : Méthode du disque et méthode de microdilution.

Notre étude comparant le diamètre de la zone d'inhibition (mm) au diamètre de référence a montré que 60% des souches étaient sensibles à l'huile d'eucalyptus, 20% extrêmement sensibles et 20% très sensibles. Les diamètres de S. epidermidis, Pasteurella, Enterobacter cloacae, Aeromonas hydrophila et E. coli issus de notre étude sont, par ordre décroissant : 32mm, 10mm, 16mm, 14mm, 13mm.

La méthode du disque, dans laquelle le produit à tester est étalé à partir d'un disque de papier, permet une détermination qualitative de la sensibilité des souches à effets antibactériens de l'HE. Cette méthode a été choisie pour cette étude en raison de sa fiabilité et de sa simplicité. Dans cette méthode, le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque est mesuré en millimètres et comparé au diamètre du matériau de référence, fournissant ainsi des résultats préliminaires concernant la sensibilité de la souche et l'activité antimicrobienne du produit**.**

Selon une étude de Sagdiç, un extrait est considéré comme bactériostatique s'il a un diamètre d'inhibition de 12 mm ou plus **(M. Aouni, F. Pelen, R. Soulimani).**

Les microdilutions sont réalisées dans des plaques Elisa à 96 puits **(M. Aouni, F. Pelen, R. Soulimani).**

Dans notre étude, l'huile d'eucalyptus s'est avérée efficace pour inhiber la formation de biofilm par les souches étudiées.

Notre résultat a montré que la formation de biofilm diminuait avec l'augmentation de la concentration d'huile, expliquant la variation de la DO bactérienne (à une longueur d'onde de 600 nm) et du pouvoir antibactérien de l'huile au sein de chaque puits de dilution.

CONCLUSION

Conclusion :

Notre étude indique que les agents pathogènes nosocomiaux les plus courants appartiennent aux familles Enterobacteriaceae, Staphylococcaceae et Pseudomonadaceae. De plus, la présence de bactéries multirésistantes augmente le risque de développer des infections graves telles que les infections nosocomiales qui sont sujettes à la formation de biofilm.

Notre études ont montré que certaines bactéries stressées peuvent échanger spontanément des gènes de résistance. On dit qu'il s'agit d'un échange horizontal car il déclenche l'émergencede bactéries « multirésistantes » porteuses de plusieurs gènes de résistance à différents antibiotiques sans transmission de génération en génération.

Notre étude suggère que le PCT est une méthode quantitative et fiable pour détecter les micro-organismes formant un biofilm. Par rapport à la méthode RCA, le PCT peut être recommandé comme méthode de dépistage générale pour détecter les bactéries formant un biofilm en laboratoire.

Considérant le phénomène de résistance croissante des souches microbiennes aux antibiotiques, il semble pertinent d'utiliser d'autres voies de recherche pour contribuer au développement de nouveaux antimicrobiens Nos recherches indiquent que les effets antimicrobiens des huiles essentielles sont bien documentés et que l'utilisation de ces deniers est une alternative viable à l'utilisation d'antibiotiques synthétiques ou semi-synthétiques et d'agents antimicrobiens.

Les références

REFERENCES

Les références :

1. **A. Bouyahya · Y. Bakri · A. Et-Touys · A. Talbaoui · A. Khouchlaa · S. Charfi · J. Abrini · N. Dakka. (2017).** Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. Lavoisier SAS 2017. DOI 10.1007/s10298-017-1118-z.
2. **A. Bouyahya · Y. Bakri · A. Et-Touys · A. Talbaoui · A. Khouchlaa · S. Charfi · J. Abrini · N. Dakka. (2017).** Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries **.**
   Advanced Drug Delivery Reviews xxx (2014) xxx–xxx. www.elsevier.com/locate/addr
3. **Alain Filloux et Isabelle Vallet**. **(2003).** Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté. P 77.
4. **BELKHIRI Meïssa, LANANE Anfel. (2020).** Mémoire de fin d'étude : Apport de l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus dans le phénomène de la résistance aux antibiotiques **.**
5. **Benjamin D, Amanda E. (2014).** Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance.
6. **C. Cattoen. (2015).** Persistance du portage de bactéries multirésistantes après la réanimation. SRLF et Lavoisier SAS 2015. DOI 10.1007/s13546-015-1048-4.
7. **Camille Delarras.** Pratique en microbiologie de laboratoire, Recherche de bactéries et de levures-moisissures**.** Chapitre 2 : Base technique microbiologique générale, P 65.
8. **Chahrazed Benzaid, Lazhari Tichat, Mahmoud Rouabhia, Sonia Akil Dahdouh. (2022).** Prévalence des infections nosocomiales d'origine microbienne au service de réanimation du Centre hospitalo-universitaire d'Annaba-Algérie.
9. **D. Kalemba and A. Kunicka. (2003).** Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils**.** *Current Medicinal Chemistry*, *10*, 813-829.
10. **D.YALA, A.S. MERAD, D. MOHAMEDI, M.N. OUAR KORICH. (2001).** Classification et mode d'action des antibiotiques. Médecine du Maghreb n°91.
11. **Emilie Guerin, Guillaume Cambray, Sandra Da Re, Didier Mazel, Marie-Cecile Ploy. (2010).** Les antibiotiques induisent la capture de gènes de résistance par les bactéries. M/S n° 1, vol. 26.
12. **file:///C:/Users/admin/Downloads/101641-fr-mk.pdf**
13. **François Denis, Marie-Cécile Ploy, Christian Martin, Vincent Cattoir.** Bactériologie Médicale, Techniques usuelles Chapitre 3 **:** Du prélèvement à la caractérisation des souches. **P. Lanotte, C. Isnard et al.** P15.
14. **G. Lancini et al. (1995).** The Antibiotics. Springer Science Business Media New York1995.
    https://books.google.dz/books?id=MSXJAwAAQBAJ&lpg=PP1&ots=O6n0LZ5_b1&dq=m%C3%A9thode%20d%27identification%20bact%C3%A9rienne&lr&hl=fr&pg=PR16#v=onepage&q=m%C3%A9thode%20d'identification%20bact%C3%A9rienne&f=false
    https://doi.org/10.1016/j.medmal.2017.03.188
15. **https://fr.wikipedia.org/wiki/Tampon_phosphate_salin**
16. **https://microbiologie-clinique.com/bouillon-coeur-cervelle.html**
17. **https://microbiologie-clinique.com/Bouillon-nutritif.html**

18. **https://microbiologie-clinique.com/Chapman.html**
19. **https://microbiologie-clinique.com/G%C3%A9lose-nutritive.html**
20. **https://microbiologie-clinique.com/gelose-cetrimide.html**
21. **https://microbiologie-clinique.com/MacCONKEY.html**
22. **https://microbiologie-clinique.com/milieux-de-cultures.html#:~:text=Milieu%20Ur%C3%A9e%2Dindole%20est%20un,fait%20virer%20l'indicateur%20color%C3%A9.**
23. **https://microbiologie-clinique.com/MUELLER%E2%80%93HINTON.html**
24. **https://www.ameli.fr/assure/sante/examen/analyse/preparer-ecbu-lire-resultats**
25. **https://www.cairn.info/revue-hegel-2015-2-page-109.htm**
26. **https://www.francebiotechnologies.fr/produit/tampon-pbs-en-tablettes#:~:text=Le%20PBS%20(Phosphate%20Buffer%20Saline,pour%20toutes%20les%20%C3%A9tudes%20cellulaires.**
27. **Ippolito Camele, Hazem S. Elshafie, Lucia Caputo and Vincenzo De Feo. (2019).** Anti- quorum Sensing and Antimicrobial Effect of Mediterranean Plant Essential Oils Against Phytopathogenic Bacteria.
28. **KatarzynaWinska, Wanda Ma˛czka, Jacek Łyczko, Małgorzata Grabarczyk, Anna Czubaszek and Antoni Szumny. (2019).** Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative?
29. **Kathrin I. Mohr. (2016).** History of Antibiotics Research**.** DOI 10.1007/82_2016_499.
30. **Lebeaux D, Ghigo J.M. (2012).** *Infections associées aux biofilms Quelles perspective thérapeutiques issues de la recherche fondamentale*. médecine/sciences, 28(8-9): 727-39.
31. **Markus Kalesse, Andreas Böhm, Andi Kipper and Vanessa Wandelt. (2016).** Synthesis of Antibiotics. DOI 10.1007/82_2016_502.
32. **MEZACHE Yousra LITIM Esma. (2018).** Mémoire de fin d'étude : L'huile essentielle d'*Eucalyptus radiata*: Activité antibiofilm et effet préventif et anti inflammatoire sur la colite induite par l'acide acétique chez les rats femelles.
33. **Milieux de cultures (microbiologie clinique)**
34. **Muhsin Jamal, Wisal Ahmad, Saadia Andleeb, Fazal Jalil, Muhammad Imran, Muhammad Asif Nawaz, Tahir Hussain, Muhammad Ali, Muhammad Rafiq, Muhammad Atif Kamil. (2007).** Bacterial biofilm and associated infections**.** Journal of the Chinese Medical Association xx (2017) 1-5. www.sciencedirect.com
35. **MUYLAERT A., MAINIL J.G. (2012).** Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». Ann. Méd. Vét., 2012, **156**, 109- 123.
36. **Protima Banerjee, Madhulika Singh, Varsha Sharma. (2015).** Biofilm formation. Department of Botany & Biotechnology, Sadhu Vaswani College, Bairagarh, Bhopal-462030, India. P556.
37. **Rondey M. Donlan and J. William Costerton. (2002).** Biofilm: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms: Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia 30333, and Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman, Montana 59717. P168.
38. **S. Jaffel, B. Mahdi, L. Thabet, M. Boussofara. (2017).** Les infections nosocomiales chez lestraumatisés en réanimation. Page S77.
39. **SA.RCS LYON.** bioMérieux **:** https://www.biomerieux.fr/diagnostic-clinique/galeries-didentification-api

40. **Sandrine PAROT. (2007).** Thèse Doctorat : BIOFILMS ELECTROACTIFS : FORMATION, CARACTERISATION ET MECANISMES.
41. **Sonia Mion, Benjamin Rémy, Laure Plener, Eric Chabrière et David Daudé.** Quorum sensing and quorum quenching : Comment bloquer la communication des bactéries pour inhiber leur virulence ? Med Sci (Paris) 2019 ; 35 :31-38.
42. STANDARDISATION DES TESTS DE SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES A L'ECHELLE NATIONALE (MEDECINE HUMAINE ET VETERINAIRE) 7ème édition **(2014).**
43. Steven L Percival, Sladjana Malic, Helena Cruz, David W Williams. (2011). Introduction aux biofilms : Biofilm et médecine vétérinaire**, 41-68.**
44. ***Thomas Brauge***. **(2015).** Thèse Doctorat : Etude des exopolysaccharides de la matrice extracellulaire des biofilms de Listeria monocytogenes.
www.médcine/science.
45. **Yannick D.N. Tremblay, Skander Hathroubi, et Mario Jacques.** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique.

Les annexes

ANNEXE

Annexe 1: Matériels

Matériel de travail	**Milieux de culture**	**Les réactifs**
Cinq étuves l'une de 37C°, 28C°, 35C°, 120C° et 60C° Réfrigérateur Microscope Les Lames et lamelles Tubes à essais Portoir Pipettes pasteur Trois becs de bunsen avec des conduits de gaz Anse calibré L'eau distillée et l'eau physiologique 500 boites pétries Becher Fiole jaugée Papier filtre Lavabo Les antibiotiques des groupes (Entérobactéries, staphylocoque, Pseudomonas) API 20E Api NE Api STAF Agitateur « vortex »	Solide Gélose Nutritive Gélose au sang Gélose Hektoen Gélose campan Gélose Cétrimide Gélose MacConkey Gélose Muller Hinton Gélose au Rouge Congo Liquide Bouillons nutritifs BHIB Tampon PBS	L'alcool L'huile de paraffine Plasma de lapin Réactifs de Kovacs Voges proskauer (vp1, vp2) Réactif de TDA Nitrate (Nit 1 et Nit 2) (ZYMA, ZYMB) IND Zn Disques d'oxydases

Densitomètre Spectrophotomètre Disques vierges Comptes gouttes Les cuves Les tubes d hémolyse Les microplaques de titration 96 puits 3 micropipettes à 1000 µl,et 25 µl ,25µl Barreaux magnétiques Tige magnétique		

Annexe 2 : Compositions des milieux de culture

Géloses	**Compositions**
Gélose nutritive	❖ Extrait de viande ..... 1g/l ❖ Extrait de levure .....2g/l ❖ Peptone .....5g/ ❖ Chlorure de sodium .....5g/l ❖ Agar .....15g/l ❖ Eaux désilé.....1000ml
Gélose Hektoen	❖ Protéosepeptone..... 12g ❖ Extrait de levure ..... 3g ❖ Chlorure de.....5g ❖ Thiosulfate de sodium..... 9g ❖ Citrate de fer III et d'ammonium..... 1.5g ❖ Salicine .....2g ❖ Lactose..... 12g ❖ Fuscine..... 0.1g ❖ Bleu de bromothymol .....10g ❖ Agar 14g

	❖ Eau distillée.....1000ml
Gélose Chapman	❖ Peptone .....11g/l ❖ Extrait de viande..... 1g/l ❖ Chlorure de sodium.....75g/l ❖ Mannitol..... 10g/l ❖ Rouge de phénol ..... 0.025g/l ❖ Agar .....15g/l ❖ Eau désilé .....1000ml ❖ PH=..... 7.4
Gélose cétrimide	❖ Peptone de gélatine ..... 16g/l ❖ Peptone de caséine..... 10g/l ❖ Bromure de tétradonium ..... 0.2g/l ❖ Sulfate de potassium ..... 10g/l ❖ Chlorure de magnésium ..... 1.4g/l ❖ Agar .....10g/t ❖ Eeau ..... 1000ml ❖ PH=..... 7.1
Gélose MacConkey	❖ Peptone bactériologie.....20g/l ❖ Sels biliaires .....1 .5g/l ❖ Chlorure de sodium.....5g/l ❖ Lactose..... 10g/l ❖ Rouge neutre ..... 0.03g/l ❖ Cristal de violet..... 0.01g/l ❖ Eau distillé..... 1000ml ❖ PH=..... 7.1
Citrate de Simmons	❖ Sulfate de magnésium ..... 0.2g/l ❖ Phosphate monomaniaque.....1g/l ❖ Phosphate bipotassique ..... 1g/l ❖ Citrate de sodium..... 2g/l ❖ Nacl..... 5g/l

	❖ Bleu de bromothymol ..... 0.08g/l ❖ Agar .....15g/l ❖ Eau distillé..... 1000ml ❖ pH= 6.8
Gélose viande foie	❖ Base viande foie.....30g ❖ Glucose .....2g ❖ Agar .....6g ❖ pH= 7.4
Gélose TSI	❖ Mélange de peptones.....18g/l ❖ Extrait de levure ..... 3g/l ❖ Extrait de viande.....4g/l ❖ Lactose..... 10g/l ❖ Saccarose.....10g/l ❖ D-glucose .....1g/l ❖ Chlorure de sodium..... 5g/l ❖ Citrate d'ammonium ferrique .....0.3g/l ❖ Thiosulfate de sodium.....0.3g/l ❖ Rouge de phénol .....0.025g/l ❖ Agar .....14g ❖ pH= 7.4
Gélose KIA	❖ Peptone .....15g ❖ Extrait de Viande.....3g ❖ Peptone pepsique de viande ..... 5g ❖ Glucose .....1g ❖ Lactose..... 10g ❖ Rouge de phénol .....25g ❖ Chlorure de sodium..... 5g ❖ Sulfate ferreux… .....0.2g ❖ Chlorure de sodium..... 5g ❖ Thiosulfate de sodium..... 0.3g

	❖ Agar .....14g ❖ Eau distillé..... 1000ml ❖ pH= 7.5
Gélose Muller Hinton	❖ Hydrolysat acide de caséine ..... 17.5g ❖ Extrait de ……2g ❖ Amidon .....1.5g ❖ Calcium.....20à25mg ❖ Magnésium..... 10à12.5mg ❖ Agar .....15g ❖ Eau distillé..... 1000ml ❖ pH= 7.4
Gélose au rouge Congo	❖ BHIB..... 37g ❖ Saccarose.....20g ❖ Agar .....10 ❖ Colorent rouge Congo..... 0.8g ❖ Eau distillé..... 1000ml
Mannitol mobilité	❖ Peptone trypsique de caséine.....10g ❖ Mannitol..... 75g ❖ Rouge de phénole1% ..... 4ml ❖ Nitrates de potassium..... 1g ❖ Agar .....3.5g ❖ pH= 7.6
	Milieux liquides
BHIB	❖ Protéase peptone .....10g ❖ Infusion de cervelle de veau… .....12.5g ❖ Infusion de cœur de bœuf.....5g ❖ Glucose .....2g ❖ Chlorure de sodium..... 5g ❖ Hydogénophosphate de sodium..... 2.5g ❖ Eau distillé..... 1000ml ❖ PH=..... 7.4
PBS	❖ Nacl..... 8g ❖ Kcl ..... 0.2g. ❖ Na2HPO4…..1.44g

	❖ KH2OP .....0.24g ❖ Eau distillé..... 1000ml ❖ pH= 7
	Colorants
Cristal violet	❖ Violet de Gentiane .....10g ❖ Phénols… ..... 20g ❖ Éthanol 90°.....100ml ❖ Eau distillé..... 1000ml
Lugol	❖ Iodure de potassium..... 2g ❖ Iode 1g
Fushine	❖ Fuchsine basique .....10g ❖ Phénol .....50g ❖ Éthanol..... 100ml ❖ Eau distillé..... 1000ml

Annexe 3 : Interprétation de l'antibiogramme de *Pasteurella spp*

Antibiotiques	Symbole	Charge mg	Famille	Sensible	Intermédiaire	Résistance
Imipenème	IpM	10	Beta Lactamines			
Érythromycine	E	15	Macrolides	>21	14_20	<13
Ciprofloxacine	CIP	5	Quinolones	>21	16_20	<15
Terramycine	TOB	10	Aminosides			<1
Pipergcillin	PI	100	Beta Lactamines	>17	_	<17
Nétillin	NET	30	Bêtalactamase	>15	13_14	<12
Ticarcillin	Tc	75	Beta Lactamines	>15	13_14	<12
Ticarcillin-clavulanic	Tcc	75+25	Beta Lactamines	>20	15_19	<14
Colistine	CL	10	Polypeptides	>16	13_17	<12
Rifampicine	Rf	5	Divers			<
Levoflaxacin	LE	5	Quinolones	>17	14_16	<13
Ceftazidine	CAZ	30	Bata Lactamines	>18	15_17	<14
Nalidixic acide	NA	30	Quinolones	>19	14_18	<13

Annexe 4 : Interprétation de l'antibiogramme de *Staphylococcus epidermidis*

Antibiotiques	**Symbole**	**Charge**	**Familles**	**Sensible**	**Intermédiaire**	**Résistance**
Cefoxitin	Fox	30	Beta Lactamines	≥18	15_17	≤17
Vancomycine	Va	30	Glycopeptides	>17	15_16	<14
Kanamycine	K	30	Aminosides	>18	14_17	<13
Teicoplamine	TEC	30	Glycopeptides	>14	11_13	≤10
Rifampicine	RF	5	Divers	>20	17_19	<16
Oxacilline	OX	5	Beta Lactamines	≥20	_	≤20
Gentamicine	GN	10	Aminosides	>16	13_14	<12
Pénicilline	P	10	Beta Lactamines	<28	_	<28
Érythromycine	E	15	Macrolides	>21	14_20	<13
Ticarcillin	TTC	85	Beta Lactamines	>20	15_19	<14

clavulanic acide						
Amikacine	Ak	30	Aminosides	≥17	15_16	≤14
Clindamycine	DA	2	Aminosides	≥19	15_18	≤15
Ticarcillin	Tc	75	Beta Lactamines	>18	_	>18
Chloramphénicol	C	30	Phénicoles	>18	13_17	<12

Annexe 5: l'interprétation diamètre des zones des antibiotiques pour Entérobactéries :

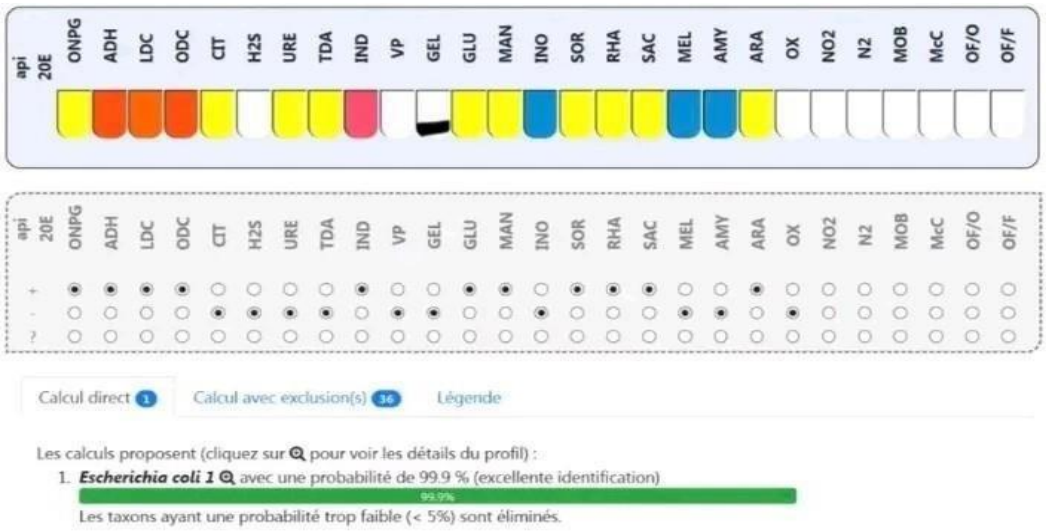
Antibiotiques	**Symbole**	**Charge**	**Familles**	**Sensible**	**Intermédiaire**	**Résistante**
Ciprofloxacine	Cip	5	Quinolones	≥20	16_20	≤15
Cefoxitine	FOX	30	Beta Lactamines	≥18	15_17	≤17
Trimethoprin	Tr	10	Sulfamides	>		<
Ampicilline	AMP	10	Beta Lactamines	>17	14_16	<13
Nitruration	F	300	Furanes	>17	15_16	<14
Fusidique acide	Fc	10	Divers	>24	_	<24
Chloramphénicolol	C	30	Phénicoles	>18	13_17	<12
Cephalothin	Cep	30	Beta Lactamines	>29	25_28	<24
Cefotaxime	CTX	30	Beta Lactamines	>23	15_22	<14
Colistine	CL	25	Polypeptides	>17	13_16	<12
Ceftriaxone	CRO	30	Beta Lactamines	>24	20_22	<17
Nalidixic acide	NA	30	Quinolones	≥19	14_18	≤13
Aeternam	ATM	30	Beta Lactamines	>21	18_20	<18
Amoxicilline	AML	30	Beta Lactamines	>26	19_25	<18
Amoxicilline clavulanic acide	AuG	30	Beta Lactamines	≥18	14_17	≤13
Amikacine	Ak	30	Aminosides	>17	15_16	<14

Annexe 6 : Tableau de lecture de l'Api20E et API Pseudo :

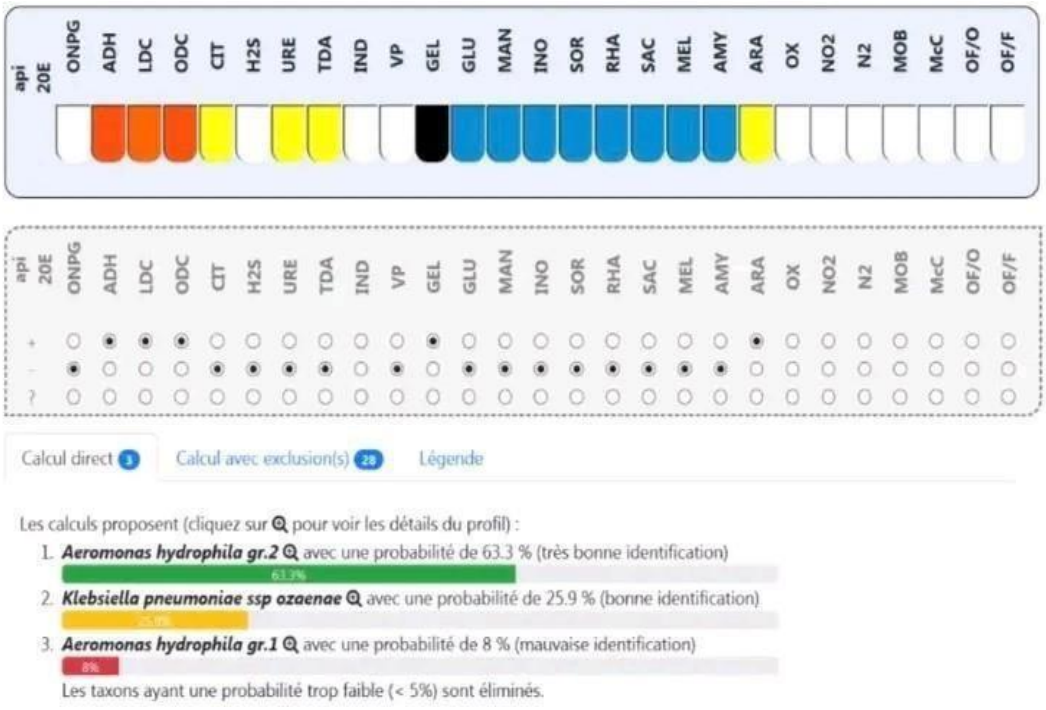
Microtube	**Substrat**	**Caractère recherché**	**Lecteur direct ou indirect** **(Test si nécessaire**	**Résultats** **Positive**	**Résultats négative**
ONPG	Ortho_Nitro_phényl_ Galactoside	B_galactosidase	Direct	Incolore	Jaune
ADH **LDC** **DH**	Arginine Lysine Omithine	Arginine déca oxydase Lysine décarboxylase Omithine décarboxylase	Direct	Jaune	Rouge orangé Orangé Rouge/orangée
CIT	Citrate	Utilisation de citrate	Direct	Vert pal/Jaune	Bleu vert/vert
H2S	Thiosulfate de sodium	Production d'H2o	Direct	Incolore/grisâtre	Dépôt noire
URE	Urée	Uréase	Direct	Jaune	Rouge orangée
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Indirect Test : ajouter 1gouttte de perchlorure de fer	Jaune	Marron fance
IND	Tryptophane	Production d' Indole	Indirect Test : ajouter une goutte de réactif Kovacs	Jaune	Anneau rouge
Vp	Pyruvate de sodium	Production d'acétone	Indirect (Attendre 10mn) ajouter 1 gouttes de Koh et d'anapthol	Incolore	Rose orangé

GEL	Gélatine emprisonnant des Partic de charbon	Gélatinasse	Direct	Non diffusion	Diffusion de pigments
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carbonés	Direct	Bleu/bleu-vert	Jaune

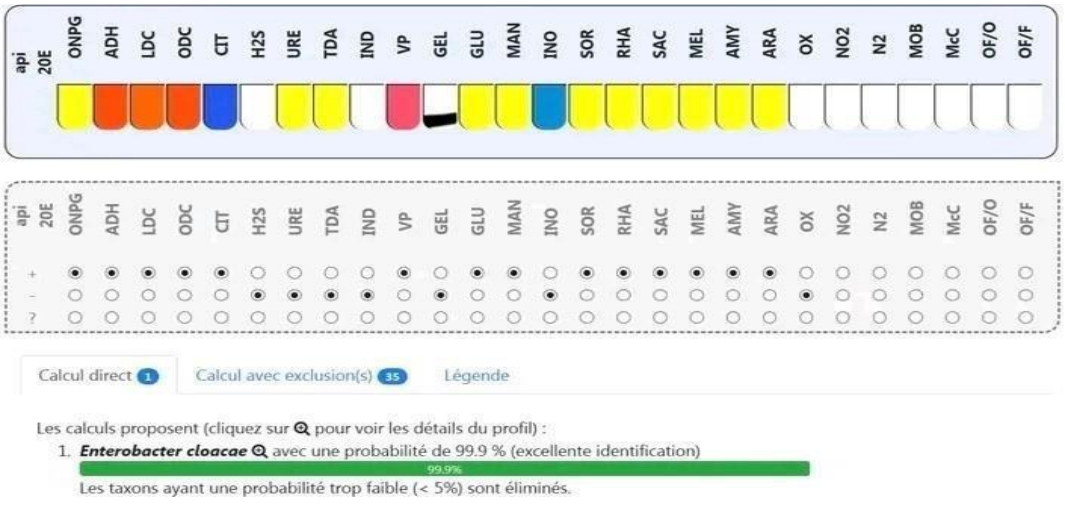
Annexe 7 : Résultat de la galerie chimique d'E.coli



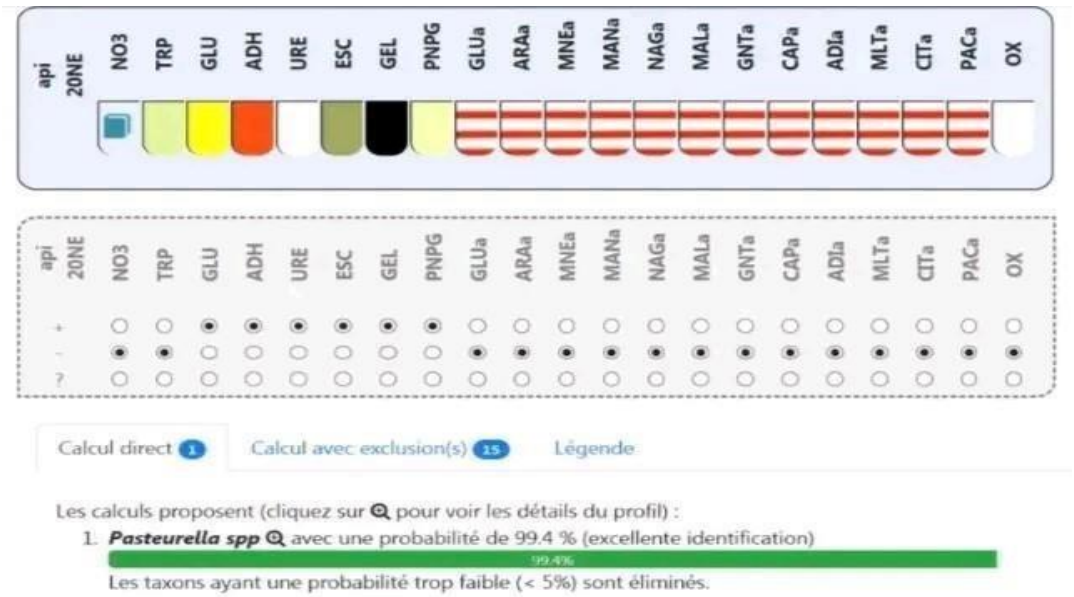
Annexe 8 : Résultat de la galerie chimique d*'Aeromonas hydrophila*



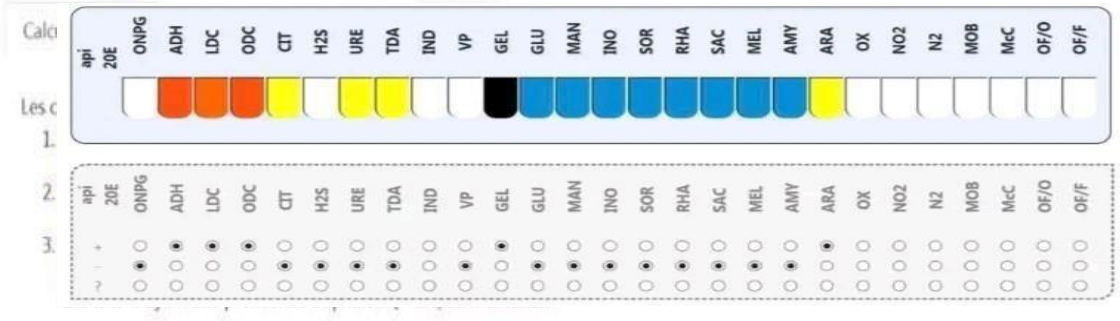
Annexe 9 : Résultat de la galerie chimique d'Enterobacter cloacae



Annexe 10 : Résultat de la galerie chimique API 20NE de *Pasteurella spp*



Annexe 11 : Résultat de la galerie chimique Api Staph de *Staphylococcus epidermidis*



Annexe 12 : Valeurs de la DO dans le milieu BHIB selon les répétitions à 37°, 35° et 28°

BHIB+ suspension 37°	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3	Moyenne
E. coli	**0.346**	**0.366**	**0.41**	**0.374**
Staphylococcus epidermidis	**0.373**	**0.302**	**0.352**	**0.342333333**
Pasteurella spp	**0.326**	**0.327**	**0.328**	**0.327**
Aeromonas hydrophila	**0.308**	**0.309**	**0.315**	**0.310666667**
Enterobacter cloacae	**0.378**	**0.35**	**0.374**	**0.36733333**

BHIB+ suspension 35°	Répétitipn1	Répétition2	Répétition3	Moyenne
E.coli	0.299	0.298	0.291	0.296
Staphylococcus epidermidis	0.521	0.524	0.525	0.52333333
Pasteurella spp	0.462	0.465	0.457	0.46133333
Aeromonas hydrophila	0.466	0.465	0.457	0.53
Enterobacter Cloacae	0.53	0.523	0.537	0.53

BHIB+suspension 28°	Répétition 1	Répétition2	Répétition3	Moyennne
E.coli	0.514	0.514	0.516	0.515666667
Staphylococcus epidermidis	0.554	0.547	0.554	0.551666667
Pasteurella spp	0.59	0.599	0.597	0.59533333
Aeromonas hydrophila	0.423	0.42	0.423	0.422
Enterobacte rCloacae	0.507	0.578	0.571	0.552

Annexe 13 : Rapports d'analyses d'*E.coli* lu par ELISA SAFAS a 28°

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	BHIB+S... 0,203	BHIB+S... 0,202	BHIB+S... 0,222	BHIB+S... 0,191	BHIB+S... 0,285	BHIB+S... 0,198	BHIB+S... 0,246	BHIB+S... 0,189	BHIB+S... 0,251	BHIB+S... 0,194	BHIB+S... 0,173	BHIB+S... 0,234
	BHIB+S... 0,262	BHIB+S... 0,206	BHIB+S... 0,171	BHIB+S... 0,250	BHIB+S... 0,180	BHIB+S... 0,200	BHIB+S... 0,192	BHIB+S... 0,169	BHIB+S... 0,175	BHIB+S... 0,191	BHIB+S... 0,203	BHIB+S... 0,184
	BHIB+S... 0,279	BHIB+S... 0,189	BHIB+S... 0,277	BHIB+S... 0,267	BHIB+S... 0,271	BHIB+S... 0,291	BHIB+S... 0,208	BHIB+S... 0,338	BHIB+S... 1,920	BHIB+S... 0,309	BHIB+S... 0,214	BHIB+S... 0,365
	BHIB+S... 0,304	BHIB+S... 0,355	BHIB+S... 0,272	BHIB+S... 0,263	BHIB+S... 0,275	BHIB+S... 0,328	BHIB+S... 0,215	BHIB+S... 0,272	BHIB+S... 0,643	BHIB+S... 0,347	BHIB+S... 0,235	BHIB+S... 0,192
	BHIB+S... 0,356	BHIB+S... 0,295	BHIB+S... 0,299	BHIB+S... 0,344	BHIB+S... 0,244	BHIB+S... 0,190	BHIB+S... 0,263	BHIB+S... 0,233	BHIB+S... 0,247	BHIB+S... 0,290	BHIB+S... 0,286	BHIB+S... 0,261
	BHIB+S... 0,418	BHIB+S... 0,289	BHIB+S... 0,298	BHIB+S... 0,321	BHIB+S... 0,291	BHIB+S... 0,284	BHIB+S... 0,243	BHIB+S... 0,226	BHIB+S... 0,265	BHIB+S... 0,292	BHIB+S... 0,269	BHIB+S... 0,258
	BHIB 0,441	BHIB 0,775	BHIB 0,420	BHIB 0,278	BHIB 0,316	BHIB 0,309	BHIB 0,260	BHIB 0,252	BHIB 0,264	BHIB 0,244	BHIB 0,269	BHIB 0,352
	BHIB+2... 0,255	BHIB+2... 0,314	BHIB+2... 0,693	BHIB+2... 0,310	BHIB+2... 0,328	BHIB+2... 0,385	BHIB+2... 0,229	BHIB+2... 0,263	BHIB+2... 0,272	BHIB+2... 0,293	BHIB+2... 0,315	BHIB+2... 0,381

MP96	**Méthode :**	**Date d'analyse :** 28/04/2023 03:26:40
	Fichier :	**Date d'impression :** 28/04/2023 03:27:49
SP2000 V 7.7.9.0		Page : 1/1

Annexe 14 : Rapports d'analyses d'*E.coli* lu par ELISA SAFAS a 35°

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	BHIB+S... 0,203	BHIB+S... 0,202	BHIB+S... 0,222	BHIB+S... 0,191	BHIB+S... 0,285	BHIB+S... 0,198	BHIB+S... 0,246	BHIB+S... 0,189	BHIB+S... 0,251	BHIB+S... 0,194	BHIB+S... 0,173	BHIB+S... 0,234
	BHIB+S... 0,262	BHIB+S... 0,206	BHIB+S... 0,171	BHIB+S... 0,250	BHIB+S... 0,180	BHIB+S... 0,200	BHIB+S... 0,192	BHIB+S... 0,169	BHIB+S... 0,175	BHIB+S... 0,191	BHIB+S... 0,203	BHIB+S... 0,184
	BHIB+S... 0,279	BHIB+S... 0,189	BHIB+S... 0,277	BHIB+S... 0,267	BHIB+S... 0,271	BHIB+S... 0,291	BHIB+S... 0,208	BHIB+S... 0,338	BHIB+S... 1,920	BHIB+S... 0,309	BHIB+S... 0,214	BHIB+S... 0,365
	BHIB+S... 0,304	BHIB+S... 0,355	BHIB+S... 0,272	BHIB+S... 0,263	BHIB+S... 0,275	BHIB+S... 0,328	BHIB+S... 0,215	BHIB+S... 0,272	BHIB+S... 0,643	BHIB+S... 0,347	BHIB+S... 0,235	BHIB+S... 0,192
	BHIB+S... 0,356	BHIB+S... 0,295	BHIB+S... 0,299	BHIB+S... 0,344	BHIB+S... 0,244	BHIB+S... 0,190	BHIB+S... 0,263	BHIB+S... 0,233	BHIB+S... 0,247	BHIB+S... 0,290	BHIB+S... 0,286	BHIB+S... 0,261
	BHIB+S... 0,418	BHIB+S... 0,289	BHIB+S... 0,298	BHIB+S... 0,321	BHIB+S... 0,291	BHIB+S... 0,284	BHIB+S... 0,243	BHIB+S... 0,226	BHIB+S... 0,265	BHIB+S... 0,292	BHIB+S... 0,269	BHIB+S... 0,258
	BHIB 0,441	BHIB 0,775	BHIB 0,420	BHIB 0,278	BHIB 0,316	BHIB 0,309	BHIB 0,260	BHIB 0,252	BHIB 0,264	BHIB 0,244	BHIB 0,269	BHIB 0,352
	BHIB+2... 0,255	BHIB+2... 0,314	BHIB+2... 0,693	BHIB+2... 0,310	BHIB+2... 0,328	BHIB+2... 0,385	BHIB+2... 0,229	BHIB+2... 0,263	BHIB+2... 0,272	BHIB+2... 0,293	BHIB+2... 0,315	BHIB+2... 0,381

MP96	**Méthode :**	**Date d'analyse :** 28/04/2023 03:26:40
	Fichier :	**Date d'impression :** 28/04/2023 03:27:49
SP2000 V 7.7.9.0		Page : 1/1

Annexe 15: Rapports d'analyses d'*E.coli* lu par ELISA SAFAS a 37°

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	BHIB+S... 0,733	BHIB+S... 0,655	BHIB+S... 0,781	BHIB+S... 0,774	BHIB+S... 0,908	BHIB+S... 0,943	BHIB+S... 0,791	BHIB+S... 1,133	BHIB+S... 0,984	BHIB+S... 0,914	BHIB+S... 1,046	BHIB+S... 1,441
	BHIB+S... 0,652	BHIB+S... 0,503	BHIB+S... 0,528	BHIB+S... 0,615	BHIB+S... 0,680	BHIB+S... 0,643	BHIB+S... 0,685	BHIB+S... 0,635	BHIB+S... 0,692	BHIB+S... 0,767	BHIB+S... 0,605	BHIB+S... 1,033
	BHIB+S... 0,471	BHIB+S... 0,529	BHIB+S... 0,561	BHIB+S... 0,759	BHIB+S... 0,625	BHIB+S... 0,665	BHIB+S... 0,889	BHIB+S... 0,766	BHIB+S... 0,892	BHIB+S... 0,695	BHIB+S... 0,651	BHIB+S... 1,113
	BHIB+S... 0,550	BHIB+S... 0,688	BHIB+S... 0,543	BHIB+S... 0,562	BHIB+S... 0,671	BHIB+S... 0,558	BHIB+S... 0,886	BHIB+S... 0,712	BHIB+S... 0,567	BHIB+S... 0,827	BHIB+S... 0,886	BHIB+S... 0,830
	BHIB+S... 0,735	BHIB+S... 0,662	BHIB+S... 0,536	BHIB+S... 0,708	BHIB+S... 0,573	BHIB+S... 0,668	BHIB+S... 0,793	BHIB+S... 0,522	BHIB+S... 0,703	BHIB+S... 0,713	BHIB+S... 0,610	BHIB+S... 1,034
	BHIB+S... 0,592	BHIB+S... 0,449	BHIB+S... 0,475	BHIB+S... 0,523	BHIB+S... 0,747	BHIB+S... 1,041	BHIB+S... 0,813	BHIB+S... 0,366	BHIB+S... 0,410	BHIB+S... 0,587	BHIB+S... 0,346	BHIB+S... 1,369
	BHIB 0,858	BHIB 0,549	BHIB 0,562	BHIB 0,581	BHIB 0,417	BHIB 0,333	BHIB 0,932	BHIB 0,445	BHIB 0,813	BHIB 0,350	BHIB 1,016	BHIB 1,022
	BHIB+2... 0,524	BHIB+2... 0,462	BHIB+2... 0,312	BHIB+2... 0,718	BHIB+2... 0,335	BHIB+2... 0,877	BHIB+2... 0,394	BHIB+2... 0,407	BHIB+2... 0,321	BHIB+2... 0,592	BHIB+2... 0,855	BHIB+2... 0,931

MP96	**Méthode :**	**Date d'analyse :** 28/04/2023 04:28:49
	Fichier :	**Date d'impression :** 28/04/2023 04:29:57
SP2000 V 7.7.9.0		Page : 1/1

Annexe 16 : Rapports d'analyses d'*Aeromonas hydrophila* lu par ELISA SAFAS a 37°

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	BHIB+S... 0,379	BHIB+S... 0,278	BHIB+S... 0,332	BHIB+S... 0,469	BHIB+S... 0,305	BHIB+S... 0,299	BHIB+S... 0,328	BHIB+S... 0,505	BHIB+S... 0,423	BHIB+S... 0,355	BHIB+S... 0,283	BHIB+S... 0,370
	BHIB+S... 0,628	BHIB+S... 0,514	BHIB+S... 0,482	BHIB+S... 0,430	BHIB+S... 0,243	BHIB+S... 0,343	BHIB+S... 0,328	BHIB+S... 0,329	BHIB+S... 0,264	BHIB+S... 0,295	BHIB+S... 0,350	BHIB+S... 0,341
	BHIB+S... 0,840	BHIB+S... 0,527	BHIB+S... 0,901	BHIB+S... 0,616	BHIB+S... 0,482	BHIB+S... 0,332	BHIB+S... 0,322	BHIB+S... 0,429	BHIB+S... 0,356	BHIB+S... 0,553	BHIB+S... 0,517	BHIB+S... 0,404
	BHIB+S... 1,373	BHIB+S... 0,519	BHIB+S... 0,632	BHIB+S... 0,274	BHIB+S... 0,585	BHIB+S... 0,582	BHIB+S... 0,398	BHIB+S... 0,417	BHIB+S... 0,326	BHIB+S... 0,485	BHIB+S... 0,478	BHIB+S... 0,514
	BHIB+S... 2,615	BHIB+S... 0,577	BHIB+S... 0,301	BHIB+S... 0,444	BHIB+S... 0,348	BHIB+S... 0,301	BHIB+S... 0,520	BHIB+S... 0,285	BHIB+S... 0,378	BHIB+S... 0,430	BHIB+S... 0,455	BHIB+S... 0,429
	BHIB+S... 0,594	BHIB+S... 0,469	BHIB+S... 0,377	BHIB+S... 0,495	BHIB+S... 0,336	BHIB+S... 0,600	BHIB+S... 0,748	BHIB+S... 0,457	BHIB+S... 0,309	BHIB+S... 0,455	BHIB+S... 0,339	BHIB+S... 0,423
	BHIB 0,628	BHIB 0,362	BHIB 0,199	BHIB 0,231	BHIB 0,212	BHIB 0,274	BHIB 0,420	BHIB 0,276	BHIB 0,337	BHIB 0,239	BHIB 0,280	BHIB 0,274
	BHIB+2... 0,265	BHIB+2... 0,334	BHIB+2... 0,203	BHIB+2... 0,235	BHIB+2... 0,248	BHIB+2... 0,222	BHIB+2... 0,355	BHIB+2... 0,286	BHIB+2... 0,229	BHIB+2... 0,199	BHIB+2... 0,278	BHIB+2... 0,294

MP96	**Méthode :**	**Date d'analyse :** 28/04/2023 03:22:42
	Fichier :	**Date d'impression :** 28/04/2023 03:24:44
SP2000 V 7.7.9.0		Page : 1/1

Annexe 17 : Rapports d'analyses d'*Aeromonas hydrophila* lu par ELISA SAFAS a 37°

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	BHIB+S... 0,433	BHIB+S... 0,415	BHIB+S... 0,451	BHIB+S... 0,289	BHIB+S... 0,261	BHIB+S... 0,249	BHIB+S... 0,248	BHIB+S... 0,222	BHIB+S... 0,210	BHIB+S... 0,290	BHIB+S... 0,233	BHIB+S... 0,373
	BHIB+S... 0,260	BHIB+S... 0,285	BHIB+S... 0,547	BHIB+S... 0,294	BHIB+S... 0,280	BHIB+S... 3,519	BHIB+S... 2,969	BHIB+S... 0,281	BHIB+S... 0,249	BHIB+S... 0,253	BHIB+S... 0,431	BHIB+S... 0,266
	BHIB+S... 0,286	BHIB+S... 0,301	BHIB+S... 0,317	BHIB+S... 0,507	BHIB+S... 0,410	BHIB+S... 0,223	BHIB+S... 0,247	BHIB+S... 0,288	BHIB+S... 0,302	BHIB+S... 0,297	BHIB+S... 0,272	BHIB+S... 0,330
	BHIB+S... 1,495	BHIB+S... 0,309	BHIB+S... 0,351	BHIB+S... 0,315	BHIB+S... 0,297	BHIB+S... 0,362	BHIB+S... 0,257	BHIB+S... 0,359	BHIB+S... 0,326	BHIB+S... 0,294	BHIB+S... 0,334	BHIB+S... 0,147
	BHIB+S... 0,197	BHIB+S... 0,496	BHIB+S... 0,313	BHIB+S... 0,270	BHIB+S... 0,282	BHIB+S... 0,409	BHIB+S... 0,365	BHIB+S... 0,268	BHIB+S... 0,437	BHIB+S... 0,259	BHIB+S... 0,260	BHIB+S... 0,319
	BHIB+S... 0,282	BHIB+S... 0,385	BHIB+S... 0,477	BHIB+S... 0,283	BHIB+S... 0,242	BHIB+S... 0,256	BHIB+S... 0,309	BHIB+S... 0,308	BHIB+S... 1,044	BHIB+S... 0,264	BHIB+S... 0,290	BHIB+S... 0,314
	BHIB 0,317	BHIB 0,498	BHIB 0,338	BHIB 0,391	BHIB 0,246	BHIB 0,320	BHIB 0,324	BHIB 0,397	BHIB 0,282	BHIB 0,260	BHIB 0,259	BHIB 0,288
	BHIB+2... 0,359	BHIB+2... 0,272	BHIB+2... 0,266	BHIB+2... 0,285	BHIB+2... 0,248	BHIB+2... 0,210	BHIB+2... 0,246	BHIB+2... 0,273	BHIB+2... 0,298	BHIB+2... 0,229	BHIB+2... 0,206	BHIB+2... 0,228

MP96

SP2000
V 7.7.9.0

Méthode :

Fichier :

Date d'analyse :
28/04/2023 03:32:06

Date d'impression :
28/04/2023 03:33:49

Annexe 18: Rapports d'analyses d'*Aeromonas hydrophila* lu par ELISA SAFAS a 35°

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	BHIB+S... 0,584	BHIB+S... 0,444	BHIB+S... 0,553	BHIB+S... 0,494	BHIB+S... 0,690	BHIB+S... 0,504	BHIB+S... 0,591	BHIB+S... 0,629	BHIB+S... 0,477	BHIB+S... 0,611	BHIB+S... 0,435	BHIB+S... 0,701
	BHIB+S... 0,466	BHIB+S... 0,346	BHIB+S... 0,409	BHIB+S... 0,375	BHIB+S... 0,421	BHIB+S... 0,548	BHIB+S... 0,501	BHIB+S... 0,386	BHIB+S... 0,421	BHIB+S... 0,428	BHIB+S... 0,470	BHIB+S... 0,595
	BHIB+S... 0,419	BHIB+S... 1,712	BHIB+S... 0,471	BHIB+S... 0,323	BHIB+S... 0,391	BHIB+S... 0,394	BHIB+S... 0,527	BHIB+S... 0,414	BHIB+S... 0,402	BHIB+S... 0,476	BHIB+S... 0,468	BHIB+S... 0,590
	BHIB+S... 0,480	BHIB+S... 0,535	BHIB+S... 0,407	BHIB+S... 0,411	BHIB+S... 0,375	BHIB+S... 0,638	BHIB+S... 0,639	BHIB+S... 0,650	BHIB+S... 0,385	BHIB+S... 0,432	BHIB+S... 0,602	BHIB+S... 0,641
	BHIB+S... 0,422	BHIB+S... 0,467	BHIB+S... 0,329	BHIB+S... 0,524	BHIB+S... 0,440	BHIB+S... 0,407	BHIB+S... 0,410	BHIB+S... 0,477	BHIB+S... 0,390	BHIB+S... 0,482	BHIB+S... 0,624	BHIB+S... 0,750
	BHIB+S... 0,477	BHIB+S... 0,567	BHIB+S... 0,421	BHIB+S... 0,396	BHIB+S... 0,410	BHIB+S... 0,446	BHIB+S... 0,443	BHIB+S... 0,510	BHIB+S... 0,436	BHIB+S... 0,543	BHIB+S... 0,405	BHIB+S... 0,486
	BHIB 0,729	BHIB 0,393	BHIB 0,526	BHIB 0,627	BHIB 0,613	BHIB 0,380	BHIB 1,795	BHIB 0,586	BHIB 0,956	BHIB 0,558	BHIB 0,750	BHIB 0,603
	BHIB+2... 1,033	BHIB+2... 0,901	BHIB+2... 0,607	BHIB+2... 0,313	BHIB+2... 0,583	BHIB+2... 0,566	BHIB+2... 0,383	BHIB+2... 0,741	BHIB+2... 0,306	BHIB+2... 0,336	BHIB+2... 0,713	BHIB+2... 0,800

MP96	**Méthode :**	**Date d'analyse :** 28/04/2023 04:31:36
	Fichier :	**Date d'impression :** 28/04/2023 04:32:30
SP2000 V 7.7.9.0		Page : 1/1

Annexe 19: Rapports d'analyses d'*Pasteurella spp* lu par ELISA SAFAS a 37°

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	0,285	0,288	0,262	0,143	0,122	0,186	0,100	0,109	0,175	0,115	0,284	0,291
	0,229	0,243	0,230	0,126	0,108	0,099	0,100	0,094	0,284	0,103	0,300	0,311
	0,262	0,287	0,260	0,102	0,108	0,094	0,111	0,115	0,268	0,304	0,311	0,302
	0,255	0,412	0,239	0,167	0,133	0,109	0,100	0,108	0,240	0,326	0,323	0,284
	0,229	0,467	0,564	0,410	0,597	0,350	0,298	0,330	0,401	0,413	0,328	0,327
	0,219	0,521	0,387	0,511	0,636	0,398	0,276	0,516	0,331	0,320	0,428	0,226
	0,459	0,682	0,660	0,512	0,793	0,460	0,369	0,554	0,807	0,426	0,454	0,108
	0,602	0,567	0,449	0,556	0,317	0,286	0,377	0,319	0,338	0,274	0,385	0,082

MP96	**Méthode :**	**Date d'analyse :** 27/04/2023 14:31:56
	Fichier : C:\Users\admin\Documents\BOUDEKHANI-SEGHIR-AMIER\YASMIN 2.amp96	**Date d'impression :** 27/04/2023 22:50:31
SP2000 V 7.7.9.0		Page : 1/1

Annexe 20: Rapports d'analyses d'*Pasteurella spp* lu par ELISA SAFAS a 35°

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	BHIUB 0,487	BHIUB 0,614	BHIUB 2,074	BHIUB 1,434	BHIUB 0,819	BHIUB 0,599	BHIUB 1,571	BHIUB 0,312	BHIUB 0,324	BHIUB 1,032	BHIUB 0,332	BHIUB 0,554
	BHIB+2... 0,597	BHIB+2... 0,885	BHIB+2... 1,058	BHIB+2... 1,207	BHIB+2... 0,442	BHIB+2... 0,765	BHIB+2... 0,774	BHIB+2... 0,570	BHIB+2... 0,655	BHIB+2... 0,669	BHIB+2... 0,486	BHIB+2... 0,541
	BHIB+S... 0,795	BHIB+S... 0,839	BHIB+S... 0,645	BHIB+S... 0,546	BHIB+S... 0,917	BHIB+S... 0,620	BHIB+S... 0,438	BHIB+S... 0,617	BHIB+S... 0,349	BHIB+S... 0,342	BHIB+S... 0,451	BHIB+S... 0,737
	BHIB+S... 0,767	BHIB+S... 0,754	BHIB+S... 0,704	BHIB+S... 0,889	BHIB+S... 0,499	BHIB+S... 0,512	BHIB+S... 0,570	BHIB+S... 0,529	BHIB+S... 0,504	BHIB+S... 0,527	BHIB+S... 0,347	BHIB+S... 0,495
	BHIB+S... 0,681	BHIB+S... 0,647	BHIB+S... 0,622	BHIB+S... 0,659	BHIB+S... 0,626	BHIB+S... 0,662	BHIB+S... 0,643	BHIB+S... 0,580	BHIB+S... 0,595	BHIB+S... 0,768	BHIB+S... 0,404	BHIB+S... 0,921
	BHIB+S... 0,710	BHIB+S... 0,642	BHIB+S... 0,659	BHIB+S... 0,559	BHIB+S... 0,621	BHIB+S... 0,590	BHIB+S... 0,606	BHIB+S... 0,534	BHIB+S... 0,447	BHIB+S... 0,512	BHIB+S... 0,581	BHIB+S... 0,394
	BHIB+S... 0,881	BHIB+S... 1,102	BHIB+S... 0,634	BHIB+S... 0,624	BHIB+S... 0,791	BHIB+S... 0,719	BHIB+S... 0,743	BHIB+S... 0,581	BHIB+S... 0,650	BHIB+S... 0,529	BHIB+S... 0,501	BHIB+S... 0,378
	BHIB+S... 0,619	BHIB+S... 0,898	BHIB+S... 0,695	BHIB+S... 0,682	BHIB+S... 0,726	BHIB+S... 1,032	BHIB+S... 0,524	BHIB+S... 2,031	BHIB+S... 3,586	BHIB+S... 3,587	BHIB+S... 0,352	BHIB+S... 0,319

MP96	**Méthode :**	**Date d'analyse :** 27/04/2023 18:30:45
	Fichier :	**Date d'impression :** 27/04/2023 18:32:48
SP2000 V 7.7.9.0		Page : 1/1

Annexe 21 : Rapports d'analyses de *Pasteurella spp* lu par ELISA SAFAS a 28°

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	BHIUB	BHIUB	BHIUB	BHIUB	BHIUB	BHIUB	BHIUB	BHIUB	BHIUB	BHIUB	BHIUB	BHIUB
	0,487	0,614	2,074	1,434	0,819	0,599	1,571	0,312	0,324	1,032	0,332	0,554
	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...
	0,597	0,885	1,058	1,207	0,442	0,765	0,774	0,570	0,655	0,669	0,486	0,541
	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...
	0,795	0,839	0,645	0,546	0,917	0,620	0,438	0,617	0,349	0,342	0,451	0,737
	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...
	0,767	0,754	0,704	0,889	0,499	0,512	0,570	0,529	0,504	0,527	0,347	0,495
	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...
	0,681	0,647	0,622	0,659	0,626	0,662	0,643	0,580	0,595	0,768	0,404	0,921
	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...
	0,710	0,642	0,659	0,559	0,621	0,590	0,606	0,534	0,447	0,512	0,581	0,394
	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...
	0,881	1,102	0,634	0,624	0,791	0,719	0,743	0,581	0,650	0,529	0,501	0,378
	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...
	0,619	0,898	0,695	0,682	0,726	1,032	0,524	2,031	3,586	3,587	0,352	0,319

MP96	**Méthode :**	**Date d'analyse :** 27/04/2023 18:30:45
	Fichier :	**Date d'impression :** 27/04/2023 18:32:48
SP2000 V 7.7.9.0		Page : 1/1

Annexe22: Rapports d'analyses de *Staphylococcus epidermidis* lu par ELISA SAFAS a 28°

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...
	0,080	0,072	0,456	1,129	0,497	0,529	0,596	0,678	0,718	0,547	0,554	0,544
	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...
	0,519	0,798	0,597	0,952	0,623	0,503	0,408	0,479	0,994	0,728	0,554	0,617
	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...
	0,676	0,492	0,485	0,479	0,938	0,534	0,528	0,508	0,459	0,632	0,987	0,908
	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...
	0,775	0,761	0,599	0,929	1,119	0,902	0,607	0,636	0,491	0,605	0,578	0,676
	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...
	0,790	0,857	0,476	0,608	0,741	0,617	0,697	0,939	0,678	1,188	0,467	0,603
	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...
	0,659	1,007	0,520	0,586	0,734	0,859	0,489	0,797	0,594	1,582	0,621	0,793
	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB
	1,142	0,390	0,536	0,493	0,754	1,692	0,936	0,882	3,202	2,018	1,486	0,826
	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...
	3,042	0,406	0,485	2,557	1,028	0,272	0,593	1,278	0,562	0,777	2,005	1,377

MP96	**Méthode :**	**Date d'analyse :** 27/04/2023 21:43:24
	Fichier :	**Date d'impression :** 27/04/2023 21:44:19
SP2000 V 7.7.9.0		Page : 1/1

Annexe23: Rapports d'analyses de *Staphylococcus epidermidis* lu par ELISA SAFAS a 28°

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	BHIB+S... 0,080	BHIB+S... 0,072	BHIB+S... 0,456	BHIB+S... 1,129	BHIB+S... 0,497	BHIB+S... 0,529	BHIB+S... 0,596	BHIB+S... 0,678	BHIB+S... 0,718	BHIB+S... 0,547	BHIB+S... 0,554	BHIB+S... 0,544
	BHIB+S... 0,519	BHIB+S... 0,798	BHIB+S... 0,597	BHIB+S... 0,952	BHIB+S... 0,623	BHIB+S... 0,503	BHIB+S... 0,408	BHIB+S... 0,479	BHIB+S... 0,994	BHIB+S... 0,728	BHIB+S... 0,554	BHIB+S... 0,617
	BHIB+S... 0,676	BHIB+S... 0,492	BHIB+S... 0,485	BHIB+S... 0,479	BHIB+S... 0,938	BHIB+S... 0,534	BHIB+S... 0,528	BHIB+S... 0,508	BHIB+S... 0,459	BHIB+S... 0,632	BHIB+S... 0,987	BHIB+S... 0,908
	BHIB+S... 0,775	BHIB+S... 0,761	BHIB+S... 0,599	BHIB+S... 0,929	BHIB+S... 1,119	BHIB+S... 0,902	BHIB+S... 0,607	BHIB+S... 0,636	BHIB+S... 0,491	BHIB+S... 0,605	BHIB+S... 0,578	BHIB+S... 0,676
	BHIB+S... 0,790	BHIB+S... 0,857	BHIB+S... 0,476	BHIB+S... 0,608	BHIB+S... 0,741	BHIB+S... 0,617	BHIB+S... 0,697	BHIB+S... 0,939	BHIB+S... 0,678	BHIB+S... 1,188	BHIB+S... 0,467	BHIB+S... 0,603
	BHIB+S... 0,659	BHIB+S... 1,007	BHIB+S... 0,520	BHIB+S... 0,586	BHIB+S... 0,734	BHIB+S... 0,859	BHIB+S... 0,489	BHIB+S... 0,797	BHIB+S... 0,594	BHIB+S... 1,582	BHIB+S... 0,621	BHIB+S... 0,793
	BHIB 1,142	BHIB 0,390	BHIB 0,536	BHIB 0,493	BHIB 0,754	BHIB 1,692	BHIB 0,936	BHIB 0,882	BHIB 3,202	BHIB 2,018	BHIB 1,486	BHIB 0,826
	BHIB+2... 3,042	BHIB+2... 0,406	BHIB+2... 0,485	BHIB+2... 2,557	BHIB+2... 1,028	BHIB+2... 0,272	BHIB+2... 0,593	BHIB+2... 1,278	BHIB+2... 0,562	BHIB+2... 0,777	BHIB+2... 2,005	BHIB+2... 1,377

MP96	**Méthode :**	**Date d'analyse :** 27/04/2023 21:43:24
	Fichier :	**Date d'impression :** 27/04/2023 21:44:19
SP2000 V 7.7.9.0		Page : 1/1

Annexe24: Rapports d'analyses de Staphylococcus epidermidis lu par ELISA SAFAS a 35°

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...
	0,080	0,072	0,456	1,129	0,497	0,529	0,596	0,678	0,718	0,547	0,554	0,544
	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...
	0,519	0,798	0,597	0,952	0,623	0,503	0,408	0,479	0,994	0,728	0,554	0,617
	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...
	0,676	0,492	0,485	0,479	0,938	0,534	0,528	0,508	0,459	0,632	0,987	0,908
	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...
	0,775	0,761	0,599	0,929	1,119	0,902	0,607	0,636	0,491	0,605	0,578	0,676
	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...
	0,790	0,857	0,476	0,608	0,741	0,617	0,697	0,939	0,678	1,188	0,467	0,603
	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...
	0,659	1,007	0,520	0,586	0,734	0,859	0,489	0,797	0,594	1,582	0,621	0,793
	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB
	1,142	0,390	0,536	0,493	0,754	1,692	0,936	0,882	3,202	2,018	1,486	0,826
	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...
	3,042	0,406	0,485	2,557	1,028	0,272	0,593	1,278	0,562	0,777	2,005	1,377

MP96	**Méthode :**	**Date d'analyse :** 27/04/2023 21:43:24
	Fichier :	**Date d'impression :** 27/04/2023 21:44:19
SP2000 V 7.7.9.0		Page : 1/1

Annexe 25: Rapports d'analyses d'*Enterobacter cloacae* lu par ELISA SAFAS a 35°

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	BHIB+S... 1,064	BHIB+S... 0,879	BHIB+S... 1,949	BHIB+S... 2,175	BHIB+S... 2,887	BHIB+S... 3,426	BHIB+S... 2,869	BHIB+S... 3,352	BHIB+S... 1,908	BHIB+S... 1,613	BHIB+S... 1,824	BHIB+S... 0,699
	BHIB+S... 3,180	BHIB+S... 0,489	BHIB+S... 1,578	BHIB+S... 0,547	BHIB+S... 0,510	BHIB+S... 2,108	BHIB+S... 1,726	BHIB+S... 1,730	BHIB+S... 0,772	BHIB+S... 0,916	BHIB+S... 1,355	BHIB+S... 2,656
	BHIB+S... 1,989	BHIB+S... 0,395	BHIB+S... 0,465	BHIB+S... 0,397	BHIB+S... 0,370	BHIB+S... 0,568	BHIB+S... 1,775	BHIB+S... 0,969	BHIB+S... 1,845	BHIB+S... 1,724	BHIB+S... 1,702	BHIB+S... 0,415
	BHIB+S... 1,226	BHIB+S... 0,364	BHIB+S... 0,473	BHIB+S... 0,425	BHIB+S... 0,433	BHIB+S... 0,591	BHIB+S... 0,588	BHIB+S... 0,898	BHIB+S... 1,265	BHIB+S... 2,060	BHIB+S... 1,738	BHIB+S... 1,514
	BHIB+S... 3,242	BHIB+S... 0,929	BHIB+S... 0,641	BHIB+S... 0,530	BHIB+S... 1,492	BHIB+S... 0,741	BHIB+S... 1,202	BHIB+S... 1,315	BHIB+S... 1,580	BHIB+S... 2,462	BHIB+S... 1,061	BHIB+S... 1,010
	BHIB+S... 1,468	BHIB+S... 0,364	BHIB+S... 0,507	BHIB+S... 0,578	BHIB+S... 0,571	BHIB+S... 0,764	BHIB+S... 1,565	BHIB+S... 1,442	BHIB+S... 1,553	BHIB+S... 2,562	BHIB+S... 1,854	BHIB+S... 2,067
	BHIB 1,463	BHIB 1,372	BHIB 1,907	BHIB 2,154	BHIB 0,745	BHIB 2,791	BHIB 2,246	BHIB 1,457	BHIB 1,112	BHIB 3,184	BHIB 2,100	BHIB 1,382
	BHIB+2... 3,767	BHIB+2... 1,678	BHIB+2... 2,304	BHIB+2... 0,824	BHIB+2... 1,022	BHIB+2... 1,560	BHIB+2... 1,130	BHIB+2... 1,806	BHIB+2... 0,842	BHIB+2... 0,800	BHIB+2... 0,884	BHIB+2... 0,478

MP96	**Méthode :**	**Date d'analyse :** 28/04/2023 05:45:09
	Fichier :	**Date d'impression :** 28/04/2023 05:46:34
SP2000 V 7.7.9.0		Page : 1/1

Annexe 26: Rapports d'analyses d'*Enterobacter cloacae* lu par ELISA SAFAS a 35°

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	BHIB+S... 0,530	BHIB+S... 1,214	BHIB+S... 1,677	BHIB+S... 1,411	BHIB+S... 0,577	BHIB+S... 0,534	BHIB+S... 0,770	BHIB+S... 1,425	BHIB+S... 0,693	BHIB+S... 1,562	BHIB+S... 1,056	BHIB+S... 1,875
	BHIB+S... 0,585	BHIB+S... 1,014	BHIB+S... 0,747	BHIB+S... 0,565	BHIB+S... 0,819	BHIB+S... 0,721	BHIB+S... 1,069	BHIB+S... 0,976	BHIB+S... 1,083	BHIB+S... 1,063	BHIB+S... 0,723	BHIB+S... 1,226
	BHIB+S... 0,587	BHIB+S... 1,077	BHIB+S... 0,882	BHIB+S... 0,906	BHIB+S... 0,571	BHIB+S... 0,585	BHIB+S... 0,859	BHIB+S... 1,304	BHIB+S... 0,763	BHIB+S... 0,710	BHIB+S... 1,505	BHIB+S... 0,989
	BHIB+S... 0,583	BHIB+S... 0,784	BHIB+S... 0,786	BHIB+S... 0,425	BHIB+S... 1,159	BHIB+S... 0,882	BHIB+S... 0,880	BHIB+S... 1,047	BHIB+S... 0,931	BHIB+S... 1,348	BHIB+S... 0,889	BHIB+S... 1,505
	BHIB+S... 0,616	BHIB+S... 0,590	BHIB+S... 1,105	BHIB+S... 0,725	BHIB+S... 0,843	BHIB+S... 0,681	BHIB+S... 0,827	BHIB+S... 0,747	BHIB+S... 1,342	BHIB+S... 0,485	BHIB+S... 0,765	BHIB+S... 1,125
	BHIB+S... 0,842	BHIB+S... 0,537	BHIB+S... 0,523	BHIB+S... 0,636	BHIB+S... 0,618	BHIB+S... 0,596	BHIB+S... 0,884	BHIB+S... 0,760	BHIB+S... 1,324	BHIB+S... 1,521	BHIB+S... 1,329	BHIB+S... 3,079
	BHIB 0,868	BHIB 0,663	BHIB 0,857	BHIB 1,016	BHIB 0,519	BHIB 0,601	BHIB 1,477	BHIB 1,940	BHIB 0,696	BHIB 0,728	BHIB 3,650	BHIB 1,373
	BHIB+2... 1,317	BHIB+2... 1,082	BHIB+2... 0,864	BHIB+2... 0,641	BHIB+2... 0,997	BHIB+2... 0,931	BHIB+2... 0,705	BHIB+2... 1,267	BHIB+2... 0,678	BHIB+2... 1,108	BHIB+2... 0,700	BHIB+2... 1,778

MP96	**Méthode :**	**Date d'analyse :** 28/04/2023 05:47:58
	Fichier :	**Date d'impression :** 28/04/2023 05:49:07
SP2000 V 7.7.9.0		Page : 1/1

Annexe 27 : Rapports d'analyses d'*Enterobacter cloacae* lu par ELISA SAFAS a 37°

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	BHIB+S... 2,188	BHIB+S... 1.092	BHIB+S... 0,697	BHIB+S... 0,748	BHIB+S... 0,718	BHIB+S... 0,460	BHIB+S... 0,728	BHIB+S... 1,229	BHIB+S... 1,267	BHIB+S... 2,965	BHIB+S... 1,064	BHIB+S... 0,930
	BHIB+S... 0,729	BHIB+S... 0,543	BHIB+S... 0,878	BHIB+S... 0,614	BHIB+S... 0,592	BHIB+S... 0,660	BHIB+S... 0,767	BHIB+S... 1,387	BHIB+S... 1,394	BHIB+S... 1,288	BHIB+S... 0,852	BHIB+S... 0,637
	BHIB+S... 0,688	BHIB+S... 0,407	BHIB+S... 0,900	BHIB+S... 0,477	BHIB+S... 0,478	BHIB+S... 0,702	BHIB+S... 1,027	BHIB+S... 0,952	BHIB+S... 0,781	BHIB+S... 1,111	BHIB+S... 0,800	BHIB+S... 0,773
	BHIB+S... 0,378	BHIB+S... 0,477	BHIB+S... 0,501	BHIB+S... 0,499	BHIB+S... 0,681	BHIB+S... 0,657	BHIB+S... 0,739	BHIB+S... 0,946	BHIB+S... 0,742	BHIB+S... 0,904	BHIB+S... 0,813	BHIB+S... 0,559
	BHIB+S... 0,350	BHIB+S... 0,374	BHIB+S... 0,462	BHIB+S... 0,635	BHIB+S... 0,574	BHIB+S... 0,431	BHIB+S... 0,753	BHIB+S... 1,159	BHIB+S... 1,192	BHIB+S... 0,576	BHIB+S... 0,947	BHIB+S... 0,894
	BHIB+S... 0,437	BHIB+S... 1.190	BHIB+S... 0,536	BHIB+S... 0,414	BHIB+S... 0,619	BHIB+S... 0,449	BHIB+S... 0,931	BHIB+S... 0,879	BHIB+S... 1,118	BHIB+S... 1,118	BHIB+S... 0,568	BHIB+S... 0,745
	BHIB 0,867	BHIB 0,833	BHIB 3,250	BHIB 1,569	BHIB 1,128	BHIB 1,506	BHIB 0,906	BHIB 1,114	BHIB 3,003	BHIB 0,888	BHIB 1,311	BHIB 1,164
	BHIB+2... 2,576	BHIB+2... 2,003	BHIB+2... 2,480	BHIB+2... 2,101	BHIB+2... 1,523	BHIB+2... 2,938	BHIB+2... 1,210	BHIB+2... 2,073	BHIB+2... 3,498	BHIB+2... 1,791	BHIB+2... 3,080	BHIB+2... 1,118

MP96	**Méthode :**	**Date d'analyse :** 28/04/2023 05:23:39
	Fichier :	**Date d'impression :** 28/04/2023 05:26:16
SP2000 V 7.7.9.0		Page : 1/1

Annexe 28 : Les valeurs de répétitions de concentration de glucose et saccharose dans le milieu BHIB par la méthode de microplaque de titration :

1. ***Pasteurella spp***

Concentration des sucres	**Répétition 1**	**Répétition 2**	**Répétition 3**	**Moyenne**
2%glu	0.22	0.33	0.266	0.272
3%glu	0.386	0.404	0.588	0.449333333
4%glu	0.518	0.472	0.477	0.489
5%glu	0.542	0.541	0.564	0.549
2%sac	0.384	0.463	0.477	0.441333333
3%sac	0.459	0.547	0.5	0.472
4%sac	0.519	0.54	0.489	0.516
5%sac	0.7	0.562	0.416	0.55933333
2%sac+2%glu	0.349	0.419	0.461	0.409666667
2%sac+3%glu	0.533	0.421	0.431	0.461666667
2%saC+4%glu	0.574	0.45	0.459	0.494333333
2%sac+5%glu	0.465	0.485	0.467	0.472333333

2. **Staphylocoque epidermidis :**

Concentration des sucres	**Répétition 1**	**Répétition 2**	**Répétition 3**	**Moyenne**
2%glu	0.408	0.464	0.461	0.4443333
3%glu	0.448	0.489	0.488	0.445
4%glu	0.687	0.748	0.526	0.653666667
5%lu	0.983	0.943	0.724	0.88333333
2%sac	0.3454	0.372	0.361	0.326333333
3%sac	0.461	0.417	0.392	0.527
4%sac	0.481	0.534	0.566	0.416666666
5%sac	0.447	0.450	0.353	0.45733333
2%sac+2%glu	0.412	0.563	0.397	0.631666667
2%sac+3%glu	0.646	0.513	0.736	0.705
2%sac+4%glu	0.683	0.5	0.932	0.631333333

2%sac+5%glu	1.455	0.315	0.124	0.628

- **Les valeurs de répétition de concentration des sucres pour souche Entérobactéries :**

Concentration des sucres	**Répétition 1**	**Répétition 2**	**Répétition 3**	**Moyenne**
2% GLU	**0.391**	**0.306**	**0.428**	**0.351**
3%glu	**0.362**	**0.478**	**0.451**	**0.430333333**
4%glu	**0.445**	**0.428**	**0.320**	**0.397666667**
5%glu	**0.440**	**0.420**	**0.353**	**0.404333333**
2%sac	**0.266**	**0.272**	**0.333**	**0.290333333**
3%sac	**0.396**	**0.385**	**0.373**	**0.384666667**
4%sac	**0.653**	**0.721**	**0.673**	**0.628333333**
5%sac	**0.541**	**0.679**	**0.665**	**0.628333333**
2%sac+2%glu	**0.334**	**0.401**	**0.402**	**0.469666667**
2%sac+3%glu	**0.473**	**0.552**	**0.384**	**0.469666667**
2%sac+4%glu	**0.614**	**0.506**	**0.399**	**0.506333333**
2%sac+5%glu	**0.795**	**0.453**	**0.379**	**0.409**

Annexe 29 : Résultats de lecture de microplaques par l'appareil SAFAS

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+5...	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+5...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...
	0,688	0,489	0,687	0,724	2,036	0,596	0,566	1,262	1,009	2,287	1,473	0,315
	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+5...	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+5...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...
	1,062	0,396	1,102	0,943	0,391	0,649	0,449	0,353	0,412	0,646	0,683	0,085
	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+5...	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+5...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...
	0,461	0,367	0,343	0,631	0,354	0,461	0,534	0,277	0,955	0,513	0,932	1,455
	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+5...	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+5...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...
	0,464	0,395	0,389	0,983	0,569	0,392	0,481	0,450	0,397	0,354	0,344	0,106
	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+5...	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+5...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...
	0,408	0,321	0,526	0,582	0,369	0,363	0,904	0,289	0,910	0,995	0,217	0,061
	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+5...	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+5...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...
	0,519	0,448	0,748	0,635	0,372	0,417	0,423	0,449	0,563	0,736	0,500	0,124
	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB
	0,405	0,424	0,403	0,524	0,717	0,854	0,520	0,942	0,950	0,643	0,773	0,152
	2%SAC...	2%SAC...	2%SAC...	2%SAC...	2%SAC...	2%SAC...	2%SAC...	2%SAC...	2%SAC...	2%SAC...	2%SAC...	2%SAC...
	0,846	0,720	0,800	0,288	0,470	3,699	0,286	0,307	0,566	0,473	0,281	0,194

MP96	**Méthode :**	**Date d'analyse :** 27/04/2023 21:54:03
	Fichier :	**Date d'impression :** 27/04/2023 21:54:40
SP2000 V 7.7.9.0		Page : 1/1

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+5...	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+2...	BHIB+...	BHIB+...	BHIB+...	BHIB+...
	0,439	0,365	0,406	0,386	0,481	0,434	0,421	0,441	0,361	0,401	0,381	0,426
	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+5...	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+2...	BHIB+...	BHIB+...	BHIB+...	BHIB+...
	0,377	0,374	0,381	0,400	0,595	0,503	0,481	0,454	0,386	0,403	0,614	0,347
	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+5...	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+2...	BHIB+...	BHIB+...	BHIB+...	BHIB+...
	0,482	0,488	0,443	0,457	0,486	0,549	0,370	0,467	0,391	0,427	0,406	0,464
	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+5...	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+2...	BHIB+...	BHIB+...	BHIB+...	BHIB+...
	0,498	0,522	0,443	0,422	0,531	0,488	0,428	0,521	0,460	0,467	0,432	0,543
	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+5...	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+2...	BHIB+...	BHIB+...	BHIB+...	BHIB+...
	0,600	0,440	0,641	0,440	0,584	0,913	0,431	0,393	0,383	0,436	0,460	0,431
	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+5...	BHIB+2...	BHIB+3...	BHIB+4...	BHIB+2...	BHIB+...	BHIB+...	BHIB+...	BHIB+...
	0,607	0,378	0,676	0,577	0,412	0,562	0,506	0,423	0,330	0,454	0,378	0,526
	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB
	0,702	0,570	0,563	1,028	0,992	1,155	1,129	1,196	1,318	1,192	1,648	1,992
	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...	BHIB+2...
	1,028	0,783	0,870	1,117	0,953	0,942	0,787	0,745	1,051	1,094	0,741	2,229

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	GLU 2...	GLU3%...	GLU4%...	GLU5%...	SACCH...	SACCH...	SACCH...	SACCH...	GLU2%...	GLU3%...	GLU4%...	GLU5%...
	0,180	0,220	0,775	0,879	0,501	0,552	0,403	0,908	1,009	0,874	0,480	0,563
	GLU 2...	GLU3%...	GLU4%...	GLU5%...	SACCH...	SACCH...	SACCH...	SACCH...	GLU2%...	GLU3%...	GLU4%...	GLU5%...
	0,355	0,443	0,495	0,853	0,463	0,423	0,334	0,403	0,737	0,436	0,535	0,738
	GLU 2...	GLU3%...	GLU4%...	GLU5%...	SACCH...	SACCH...	SACCH...	SACCH...	GLU2%...	GLU3%...	GLU4%...	GLU5%...
	0,547	0,708	0,665	0,549	0,231	0,519	1,268	0,435	0,501	0,688	0,336	0,610
	GLU 2...	GLU3%...	GLU4%...	GLU5%...	SACCH...	SACCH...	SACCH...	SACCH...	GLU2%...	GLU3%...	GLU4%...	GLU5%...
	0,600	0,833	0,568	0,779	0,487	0,411	0,707	0,415	0,652	0,316	0,457	0,537
	GLU 2...	GLU3%...	GLU4%...	GLU5%...	SACCH...	SACCH...	SACCH...	SACCH...	GLU2%...	GLU3%...	GLU4%...	GLU5%...
	0,852	0,514	0,502	0,417	0,539	0,323	0,820	0,446	0,594	0,442	0,441	0,545
	GLU 2...	GLU3%...	GLU4%...	GLU5%...	SACCH...	SACCH...	SACCH...	SACCH...	GLU2%...	GLU3%...	GLU4%...	GLU5%...
	0,840	0,399	0,590	0,612	1,424	0,401	0,419	0,366	0,478	0,400	1,267	0,551
	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB
	0,950	0,866	0,748	0,951	0,860	0,715	1,181	0,641	2,042	0,600	1,343	0,564
	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...	BHIB+S...
	2,252	1,031	0,305	0,613	0,337	0,613	0,352	1,110	0,873	0,561	0,530	0,326

Annexe 30 : les valeurs de la DO de l'huile essentielle d'Eucalyptus diluée + la suspension bactérienne

- **Les valeurs d'absorbance de *Pasteurella spp***

	Répétition	Répétition 1	Répétition 2	Répétition3	Moyenne
Dilution	100ul	2.894	2.953	3.167	3,004666667
	10^{-1}	3.208	3.418	3.418	3,169
	10^{-2}	1.254	2.437	2.437	2,153
	10^{-}t	1.625	0.392	1.63	1,215666667
	10^{-4}	01.625	0.367	0.377	0,789666667
	10^{-5}	0.793	0.731	0.68	0,734666667
	10^{-6}	0.745	0.616	0.615	0,658666667
	10^{-7}	0.759	0.308	0.76	0,609
	10^{-8}	0.443	0.43	0.446	0,439666667
	10^{-7}	0.362	0.431	0.364	0,385666667
	10^{-10}	0.411	0.298	0.41	0,373
	10^{-11}	0.543	0.453	0.445	0,366333333

- **Les valeurs d'absorbance des *Staphylococcus epidermidis***

		Répétition 1	Répétition 2	Répétition3	Moyenne
	100ul	3.317	2 .085	2.923	2.775
	10^{-1}	2.776	2.712	2.71	2.732666667
	10^{-2}	0.675	2.777	22.345	1.932333333
	10^{-}t	1.947	0.947	0.948	1.280666667
	10^{-4}	0.774	1.706	0.774	1.085666667
	10^{-5}	1.894	0.671	0.677	1.080666667
	10^{-6}	1.114	0.627	0.628	0.789666667
	10^{-7}	0.844	0.666	0.0.667	0.7555
	10^{-8}	0.844	0.353	0.355	0.517333333
	10^{-9}	0.707	0.708	0.094	0.503
	10^{-10}	0.536	0.529	0.388	0.48433333
	10^{-11}	0.162	0.808	0.159	0.376333333

- **Les valeurs d'absorbance d'Aeromonas hydrophila**

		Répétition 1	Répétition 2	Répétition3	Moyenne
	100ul	3.997	2.598	3.999	3.531
	10^{-1}	3.544	3.575	3.576	3.655
	10^{-2}	2.8	2.848	2.849	2.15
	10^{-}t	3.656	0.308	2.515	1.12
	10^{-4}	1.047	0.833	1.5	1.151
	10^{-5}	1.38	1.036	1.037	0.997
	10^{-6}	0.976	0.977	0.978	0.977
	10^{-7}	1.054	1.059	0.558	0.890333333
	10^{-6}	0.976	0.977	0.978	0.977
	10^{-7}	1.054	1.059	0.558	0.890333333
	10^{-8}	0.971	0.879	0.811	0.887
	10^{-9}	1.114	0.57	0.573	0.75233333
	10^{-10}	0.662	0.633	0.634	0.629666667
	10^{-11}	0.6	0.553	0.555	0.56933333

Annexe 31 : Résultat de la lecture des microplaques par ELISA SAFAS

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	HUILE	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...
	2,317	0,426	2,848	3,656	3,661	2,270	0,976	2,602	0,971	1,114	0,910	0,810
	HUILE	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...
	2,598	3,574	0,442	3,615	0,833	1,380	1,406	0,558	2,321	1,817	0,900	0,553
	HUILE	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...	SUSPE...
	2,556	3,541	2,414	0,308	1,047	3,034	2,068	1,054	3,591	1,382	0,622	0,600
	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB
	0,859	2,417	2,600	1,281	1,592	1,168	1,128	0,865	0,652	0,702	0,724	0,711

MP96	**Méthode :**	**Date d'analyse :** 28/04/2023 16:53:15
	Fichier :	**Date d'impression :** 28/04/2023 16:54:33
SP2000 V 7.7.9.0		Page : 1/1

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	HUILE	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...
	2,317	2,766	0,675	1,947	1,826	1,212	1,290	1,172	2,863	1,792	0,763	2,384
	HUILE	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...
	2,085	2,712	0,277	0,401	0,792	1,894	1,627	0,798	0,844	1,093	0,536	3,159
	HUILE	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...	STAPH...
	1,923	2,710	0,345	0,408	1,706	0,671	1,114	0,844	1,354	1,707	0,637	0,808
	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB
	0,773	1,386	2,794	1,452	2,029	2,921	3,049	2,902	0,890	2,138	1,122	0,942

Rapport d'analyse

Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

	HUILE 2,894	PSEUD... 3,208	PSEUD... 0,768	PSEUD... 0,386	PSEUD... 3,663	PSEUD... 3,793	PSEUD... 3,745	PSEUD... 1,144	PSEUD... 0,430	PSEUD... 3,212	PSEUD... 0,863	PSEUD... 0,916
	HUILE 2,953	PSEUD... 2,881	PSEUD... 0,473	PSEUD... 0,334	PSEUD... 1,625	PSEUD... 3,731	PSEUD... 3,617	PSEUD... 3,759	PSEUD... 0,443	PSEUD... 0,431	PSEUD... 0,411	PSEUD... 0,543
	HUILE 3,167	PSEUD... 3,418	PSEUD... 1,254	PSEUD... 0,392	PSEUD... 0,367	PSEUD... 3,580	PSEUD... 3,678	PSEUD... 3,308	PSEUD... 0,312	PSEUD... 0,362	PSEUD... 0,774	PSEUD... 0,758
	BHIB 3,079	BHIB 0,719	BHIB 0,440	BHIB 0,953	BHIB 1,080	BHIB 0,439	BHIB 0,434	BHIB 0,463	BHIB 1,002	BHIB 0,987	BHIB 0,399	BHIB 1,249

Rapport d'analyse

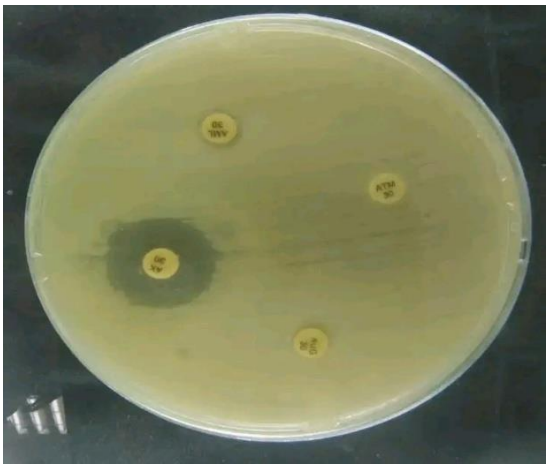
Mesures brutes - LO : 600 nm

Unité : ABS

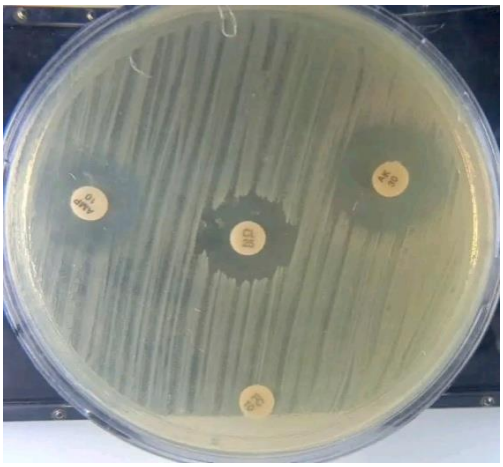
	HUILE	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...
	2,894	3,208	0,768	0,386	3,663	3,793	3,745	1,144	0,430	3,212	0,863	0,916
	HUILE	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...
	2,953	2,881	0,473	0,334	1,625	3,731	3,617	3,759	0,443	0,431	0,411	0,543
	HUILE	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...	PSEUD...
	3,167	3,418	1,254	0,392	0,367	3,580	3,678	3,308	0,312	0,362	0,774	0,758
	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB	BHIB
	3,079	0,719	0,440	0,953	1,080	0,439	0,434	0,463	1,002	0,987	0,399	1,249

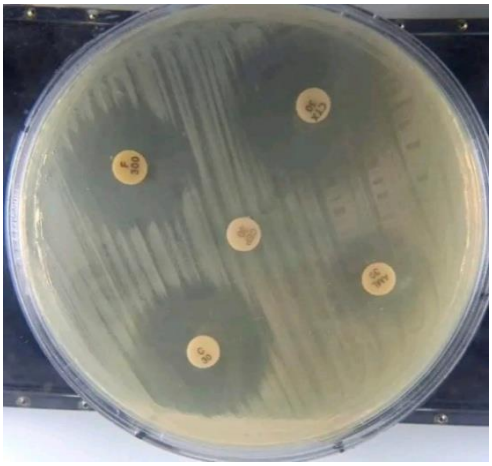
Annexe 32 : Résultats d'antibiogramme d'Escherichia coli :





Annexe 33 : Résultats d'antibiogramme d'Enterobacter cloacae serratia marcescence :





Annexe 34 : Résultats d'antibiogramme de Pasteurella spp :

