

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEM
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement
« LAMAABE »

Mémoire

Présenté par

BOUHADJAR Abdelkader Adlan

TERBECHE Mohamed

En vue de l'obtention du diplôme de MASTER LMD en Biologie cellulaire et Moléculaire
Option : **MICROBIOLOGIE**

Intitulé du Thème

**Evaluation de la formation du biofilm par *Staphylococcus aureus*
isolées du cathéter veineux périphérique -CHU Tlemcen-**

Soutenu le 28/06/2017

Devant le Jury composé de :

Président	Hassaine H.	Professeur	U. de Tlemcen
Examinatrice	Kara TERKI I.	MCB	U. de Sidi-Bel-Abbès
Encadreur	Bellifa S.	MCB	U. de Tlemcen

Année universitaire 2016-2017

البيوفيلم هو مجتمع من الكائنات الحية الدقيقة التي تلتصق بالأسطح الحيوية أو غير الحيوية. والغرض من هذه الدراسة هو اختبار قدرة سلالات المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من القسطرة الوريدية الطرفية التي تم جمعها في قسم العناية المركزة بمستشفى تلمسان الجامعي على تشكيل البيوفيلم من خلال تقنيات مختلفة وتحت ظروف مختلفة.

من جميع العينات المختبرة، وعن طريق تقنية (TCP) وجدنا سلالة واحدة لها قدرة عالية للغاية على تكوين البيوفيلم (DO de 4.3) وثلاثة سلالات أخرى متوسطة القدرة. أربع سلالات من بكتيريا المكورة العنقودية الذهبية كانت تنتج (slime) عن طريق تقنية (RCA) وقد تم اختبار السلالة الأكثر تشكلا لتقييم قدرتها على تشكيل البيوفيلم على القسطرة في وضع ديناميكي حيوي مزود بمحلول ملحي (كلوريد الصوديوم) و آخر مزود بالجلوكوز. هذه السلالة لديها قدرة التصاق عالية في وجود كلوريد الصوديوم تصل إلى $(1.7 \cdot 10^7 \text{ UFC / cm}^2)$ فيما يتعلق باستخدام محلول الجلوكوز $(4 \cdot 10^5 \text{ UFC/cm}^2)$. أظهرت دراسة تأثير العسل على تشكيل البيوفيلم في وضع ديناميكي للقسطرة انخفاضا في الالتصاق ب $(4.4 \cdot 10^4 \text{ UFC/cm}^2)$ في وجود كلوريد الصوديوم و $(2.3 \cdot 10^4 \text{ UFC/cm}^2)$ في وجود الجلوكوز. في حين أظهر العسل المخفف تثبيط كاملا (100%) على البيوفيلم في الوضع الثابت (mode statique).

الكلمات المفتاحية : المكورات العنقودية الذهبية، البيوفيلم، القسطرة الوريدية الطرفية، العسل.

Evaluation de la formation du biofilm par *Staphylococcus aureus* isolées du cathéter veineux périphérique CHU- Tlemcen

Résumé

Le biofilm est une communauté de micro-organismes qui s'adhèrent aux surfaces biotiques ou abiotiques. Le but de cette étude est de tester la capacité des souches de *Staphylococcus aureus* isolées des cathéters veineux périphériques collectées chez des personnes hospitalisées au service de réanimation au niveau du CHU Tlemcen, à former le biofilm par différentes techniques et sous différentes conditions.

Sur l'ensemble des isolats testés, une souche était fortement formatrice du biofilm par la méthode de Plaque de Culture de Tissus (TCP) avec une DO de 4.3 et trois autres étaient modérément formatrices. Quatre souches de *S. aureus* étaient productrices de slim par la méthode Rouge Congo Agar (RCA). La souche la plus formatrice était choisie pour évaluer sa capacité à former le biofilm sur un cathéter en mode dynamique avec l'utilisation d'un sérum salé (NaCl) et un autre glucosé. Cette souche pathogène présente une forte adhésion en présence de NaCl avec une charge de $(1.7 \cdot 10^7 \text{ UFC / cm}^2)$ par rapport à l'utilisation du sérum glucosé $(4 \cdot 10^5 \text{ UFC/cm}^2)$. L'étude de l'effet du miel sur la formation du biofilm en mode dynamique sur un cathéter a montré une diminution d'adhésion de $(4.4 \cdot 10^4 \text{ UFC/cm}^2)$ en présence de NaCl et de $(2.3 \cdot 10^4 \text{ UFC/cm}^2)$ en présence de glucose. Le miel dilué a révélé une inhibition totale (100%) sur le biofilm en mode statique.

Mots clé : *Staphylococcus aureus*, biofilm, cathéters veineux périphérique, miel.

Evaluation of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from a peripheral venous catheter Tlemcen university CH

Abstract

Biofilm is a community of micro-organisms that adhere to biotic or abiotic surfaces. The purpose of this study is to test the ability the strains of *Staphylococcus aureus* isolated from peripheral venous catheters collected from resuscitation service at the (Tlemcen University Hospital) to form biofilm by different techniques. Of the isolates tested, one strain was strongly biofilm-forming using the Tissue Culture Plate (TCP) method with an OD of 4.3 and three moderately- forming. Four strains of *S. aureus* were slim-producing by the Congo Agar (RCA) method. The most formative strain was chosen to evaluate its ability to form the biofilm on a catheter in dynamic mode with a saline serum (NaCl) and another with glucose.

This pathogenic strain has a strong adhesion in the presence of NaCl with $(1.7 \cdot 10^7 \text{ CFU / cm}^2)$ relative to the use of glucose serum $(4 \cdot 10^5 \text{ CFU / cm}^2)$. The study of the effect of honey on the formation of biofilm on a catheter showed a decrease in adhesion of $(4.4 \cdot 10^4 \text{ CFU / cm}^2)$ in the presence of NaCl and $(2.3 \cdot 10^4 \text{ CFU / cm}^2)$ in the presence of glucose, whereas The diluted honey revealed a total inhibition (100%) on the biofilm in static mode.

Key words: *Staphylococcus aureus*, biofilm, peripheral venous catheters, honey.

Remerciements

*A notre présidente de thèse
Mme H. Hassaine Professeur à l'université de Tlemcen.*

*Nous avons eu le privilège de travailler parmi votre équipe et d'apprécier
vos qualités et vos valeurs.*

*Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir nous ont énormément marqués.
Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration
pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.*

Ce travail est pour nous l'occasion de vous témoigner notre profonde gratitude.

*A notre maître et Encadreur de Mémoire
Mme Bellifa S. maitre de conférences B.*

*Vous avez bien voulu nous confier ce travail riche d'intérêt et nous guider à chaque
étape de sa réalisation.*

*Vous nous avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos obligations professionnelles.
Vos encouragements inlassables, votre amabilité, votre gentillesse méritent toute admiration.*

*Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre profonde gratitude
tout en vous témoignant notre respect.*

*A notre maître et juge de Mémoire
Mme Kara Terki I. maitre de conférences B.*

*Vous nous faites l'honneur d'accepter avec une très grande amabilité de siéger parmi
notre jury de Mémoire.*

*Veuillez accepter ce travail maître, en gage de notre grand respect et notre
profonde reconnaissance.*

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes parents, Sans qui je ne serai pas là aujourd'hui. Tout ce que j'ai accompli dans ma vie, c'est grâce à vous, à votre soutien, votre amour et vos sacrifices. Merci infiniment...

*A mon frère et sœur, Hamza et Sabiha pour
l'amour, l'attention et l'aide qu'ils m'apportent.*

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

A ma belle-famille pour leurs encouragements

Et à tout(e)s mes ami(e)s

Abdelkader Adlan

 *Je dédie ce Mémoire à ...* 

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

A ma très chère mère Rahma

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

A mon cher Père Abderrahmane

*Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.
Ce travail est le fruit des sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation.*

A mon très cher frère Mustapha

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A tous les membres de ma famille, petits et grands

Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection

A mes chères ami(e)s

Mohamed

*A coeur vaillant rien d'impossible
A conscience tranquille tout est accessible*

*Quand il y a le souci de réaliser un dessein
Tout devient facile pour arriver à nos fins*

*Malgré les obstacles qui s'opposent
En dépit des difficultés qui s'interposent*

*Les études sont avant tout
Notre unique et seul atout*

*Ils représentent la lumière de notre existence
L'étoile brillante de notre réjouissance*

*Espérant des lendemains épiques
Un avenir glorieux et magique*

*Souhaitant que le fruit de nos efforts fournis
Jour et nuit, nous mènera vers le bonheur fleuri*

*Aujourd'hui, ici rassemblés auprès des jurys,
Nous prions dieu que cette soutenance
Fera signe de persévérance
Et que nous serions enchantés
Par notre travail honoré*



Liste des abréviations

AAP: Accumulation-Associated Protein

Agr: accessory gene regulator

AN: Amikacine

AtIE: autolysine

Bap: Biofilm associated protein

BHIB : Bouillon Coeur cerveau

C : Chloramphénicol

CHU: Centre Hospitalier Universitaire

ClfA: Clumping factor A

ClfB: Clumping factor B

CV : Cristal violet

CVC : cathéter veineux central

CVP : cathéter veineux périphérique

DO : Densité Optique

E: Erythromycine

FnbpA,Fnbp B :fibronectin-binding proteins

Fos : Fosfomycine

GN : Gentamicine

ILC : infection liée au cathéter

L : Lincomycine

MSCRAMM : Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecule

OMS : Organisation mondiale de santé

OX:Oxacilline

PIA: polysaccharide intercellular adhesion

QS: Quorum Sensing

RCA: Red Congo Agar

TCP : culture de tissu en plaque

UFC : Unité Formant Colonie

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Cathéter vasculaire : principales voies d'acquisition des micro-organismes (Florence et al., 2010)	08
2	Aspect de <i>Staphylococcus aureus</i> observé par microscopie électronique (X 20000)	12
3	Facteurs de virulence chez <i>Staphylococcus aureus</i> (Al alam, 2008)	13
4	Visualisation par microscope confocal d'un biofilm formé par <i>Staphylococcus spp</i> sur la surface d'un cathéter veineux (Liesse Iyamba, 2012)	15
5	Principales étapes de la formation des biofilms. (Lebeaux et al., 2016)	17
6	Système WalkAway® 96 plus	24
7	Plaque PC31 : Staphylocoques	24
8	les étapes de formation du biofilm par la technique TCP	25
9	Phénotypes de production de slime (Touati et al., 2007)	26
10	Inoculation de la partie soupape ventilée du cathéter	27
11	Désinfection de la surface externe de la soupape	27
12	Simulation de cathétérisme	28
13	Emplacement des morceaux sectionnés	29
14	Les étapes du dépistage du biofilm sur cathéter	29
15	Procédés réalisés en mode statique	30
17	Distribution des bactéries isolées de cathéters veineux périphériques	33
18	<i>Staphylocoques</i> sur le milieu de Chapman	34
19	Résultats d'évaluation de la formation du biofilm par la méthode TCP	36
20	Culture de <i>S.aureus</i> sur gélose Rouge Congo	37
21	Résultat du dénombrement en présence du Na Cl à 0.9% après 48h	39
22	Résultat de la formation du biofilm par <i>S. aureus</i> sur cathéter <i>in vitro</i> en présence du Nacl à 0.9% pendant 48h	39
23	Résultat du dénombrement en présence du Glucose à 5% après 48h	41
24	Résultat de la cinétique de la formation du biofilm par <i>S. aureus</i> sur cathéter <i>in vitro</i> en présence du Glucose à 5% pendant 48h.	41
25	Résultat de la formation du biofilm par <i>S. aureus</i> sur cathéter <i>in vitro</i> en présence du Glucose à 5% et Nacl 0.9% pendant 48h	42
26	Résultat du dénombrement en mode statique	47
27	Les résultats d'inhibition de la formation du biofilm par le miel	47

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Fréquence relative des microorganismes isolés dans les bactériémies nosocomiales à porte d'entrée potentiellement associée à un dispositif invasif [(RAISIN , 2004) ; (Espinasse et <i>al.</i>, 2010)].	05
2	Etiologie des Bactéries des cathéters veineux périphérique (Boudelale, 2013)	10
3	Résultat de L'identification par L'automate	34
4	Sensibilité des souches de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques	35

Tables des matières

INTRODUCTION	11
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	5
Chapitre I : généralité sur infections liées aux soins	4
1. les infections associées aux dispositifs médicaux	4
2. Les cathéters veineux périphériques.....	5
3. Contamination et colonisation du cathéter	6
3.1. Les voies de contaminations.....	6
3.1.1 Contamination extraluminale	6
3.1.2 Contamination endoluminale.....	6
3.1.3 Contamination hématogène	7
3.2 Colonisation du cathéter	8
4. Les types infections liées aux cathéters.....	8
4.1. Infections « cliniques » sur cathéter	8
4.2. Infections « bactériémiques » sur cathéter	8
5. Bactéries impliquées dans les Infections liées au cathéter	9
Chapitre II : <i>Staphylococcus aureus</i> et biofilm sur cathéter veineux périphérique.....	10
1. Historique	10
2. Habitat	10
3. Caractères morphologiques et structuraux	10
4. Caractères cultureux	11
5. Pouvoir pathogène de <i>S. aureus</i>	11
5.1 Les facteurs de virulence.....	12
5.2 Les protéines de surface et facteurs d'adhérence (MSCRAMM).....	13
5.3 La formation du biofilm par <i>S. aureus</i>	14
5.3.1 Historique	14
5.3.2 Définition du biofilm.....	15
5.3.3 Etapes de formation des biofilms	15
➤ L'adhérence réversible	16
➤ L'adhérence irréversible	16
➤ Le développement précoce du biofilm	17
➤ La maturation du biofilm	17
➤ Le détachement de bactéries	17
5.4 Résistance des staphylocoques aux antibiotiques.....	17
Chapitre III : L'activité antibactérienne du miel sur les cellules planctoniques et sessiles.....	18
MATÉRIEL ET MÉTHODES	19
1. Lieu d'étude.....	20

2.	Prélèvements et isolement	20
3.1	Identification par automate (walkaway)	20
3.2	Principe.....	20
4	Evaluation de la formation du biofilm <i>in vitro</i>	21
4.1	Méthode de plaque de culture de tissus (TCP).....	21
4.1.1	Technique	21
4.1.2	Lecture.....	22
4.2	La méthode du Rouge Congo Agar	23
4.2.1	Technique	23
4.2.2	Lecture.....	23
5	Formation du biofilm <i>in vitro</i> en système dynamique sur cathéter en présence de deux substrats (sérum glucose et salé)	23
6	. Formation du biofilm sur des morceaux de cathéters en mode statique avec et sans miel.....	26
6.1	Sans miel	26
6.2	Avec miel	27
6.2.1	L'addition du miel dans la suspension bactérienne	27
6.2.2	L'addition du miel après formation du biofilm	27
	<i>RESULTATS ET DISCUSSION</i>	28
1.	Prélèvements	30
2.	Identification	30
2.1	Identification macroscopique	30
2.2	Identification biochimique par l'automate	31
2.	Sensibilité des souches isolées	31
4.	Evaluation de la formation du biofilm <i>in vitro</i>	32
4.1	Microplaque TCP	32
4.2	Rouge Congo Agar (RCA).....	33
5.	Evaluation de la formation du biofilm <i>in vitro</i> (en mode dynamique).....	34
5.1	Sérum salé à 0.9%	35
5.2	Sérum Glucosé à 05%	36
6.	Comparaison des résultats de la formation du biofilm en présence du sérum Glucose et salé	38
7.	Etude de l'effet du miel sur des souches de <i>staphylococcus aureus</i>	39
7.1	L'effet du miel en mode statique.....	39
	<i>CONCLUSION</i>	43
	<i>RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	47
	<i>ANNEXES</i>	61
1.	Milieux de culture	61
1.1	Milieux de culture liquides	61
1.2	Milieux de culture solides	61
2.	Tableaux	62

INTRODUCTION

Les infections acquises à l'hôpital sont une réalité préoccupante surtout dans des services à haut risque qui recrutent des patients extrêmement vulnérables à la colonisation bactérienne et par conséquent à l'infection. **(Rebiahi, 2012).**

Les infections liées aux soins sont généralement dues au large usage des dispositifs médicaux vus leur importance dans le traitement des maladies chroniques.

Les cathéters veineux périphériques (CVP) sont les dispositifs médicaux les plus utilisés dans les hôpitaux du monde entier **(Zhang et al., 2013)**. Ils sont de plus en plus utilisés. Cela est due à leurs mise en place aisée et rapide qui permet l'administration des traitements et des solutés de remplissage. Ces solutés peuvent être une source nutritionnelle importante favorisant la survie et la multiplication des bactéries au sein de ce dispositif. Ces bactéries colonisant ces écosystèmes peuvent être à l'origine de nombreuses pathologies nosocomiales.

Parmi les micro-organismes les plus incriminés dans ces infections, *Staphylococcus aureus* occupe une place privilégiée. Son caractère ubiquiste et l'absence d'exigences nutritionnelles, font de cette bactérie un exemple d'adaptation et de dissémination. De plus son principal facteur de virulence est sa capacité à former un biofilm, qui lui confère une résistance importante aux antibiotiques et aux attaques du système immunitaire.

Des études impliquant la microscopie électronique à balayage ont montré que presque tous les cathéters vasculaires même ceux qui pour des cultures négatives, sont colonisés par des microorganismes, habituellement intégrés dans le biofilm **(Marti et al., 2011)**.

Dans ce contexte et en tenant compte du pouvoir pathogène de *Staphylococcus aureus* cette étude vise à montrer :

- L'implication de ce germe dans les infections associées aux dispositifs médicaux au service de réanimation du CHU de Tlemcen.
- Évaluer sa capacité à former un biofilm *in vitro* en mode statique sur la plaque 96 puits et en mode dynamique sur cathéter en présence de 2 solutés très souvent utilisés en milieu hospitalier et qui sont des sérums glucose et salé.
- Enfin évaluer la formation du biofilm en mode dynamique en présence du miel.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : généralité sur infections liées aux soins

1. les infections associées aux dispositifs médicaux

Les infections associées aux soins (IAS), reconnues à travers le monde comme un problème de santé publique, sont à l'origine d'un accroissement significatif de la mortalité, de la morbidité et du coût de prise en charge des patients (Njall et al., 2013). Leur fréquence et leur gravité sont particulièrement élevées en milieu de soins intensifs en raison des pathologies présentées par les patients, des comorbidités associées ainsi que la densité des techniques invasives utilisées

(Tableau 1) (Brun-Buisson et al., 2005).

L'OMS estime qu'entre 5 et 12 % des patients hospitalisés dans le monde développent une infection associée aux soins (IAS) dont plus de 60 % sont associées à l'implantation d'un dispositif médical ou chirurgical (Espinasse et al., 2010). Parmi les 190 millions de patients hospitalisés chaque année dans le monde, environ 9 millions sont touchés par des infections nosocomiales avec un taux de mortalité près de 10% (Togo et al., 2010).

Tableau 1 : Fréquence relative des microorganismes isolés dans les bactériémies nosocomiales à porte d'entrée potentiellement associée à un dispositif invasif [(RAISIN, 2004) ; (Espinasse et al., 2010)].

Porte d'entrée (nombre)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylocoque à coagulase négative	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Autres
Urinaire (n=100)	7	3	52	15	6	17
Cathéter central (n=549)	27	40	3	9	5	17
Cathéter veineux périphérique (n=249)	37	33	4	12	4	10

Chambre à cathéter implantable (n=229)	17	38	4	12	4	10
Pleure-pulmonaire (n=477=	22	9	9	18	14	28

2. Les cathéters veineux périphériques

Les cathéters sont des tubes en matière plastique ou en élastomère, d'une longueur inférieure ou égale à 80 mm introduits par effraction dans le système vasculaire pour une durée limitée dans le temps. Le cathéter est composé d'un élément souple ou rigide introduit dans la veine et d'une embase sur laquelle se connecte Le dispositif de perfusion (Aulagner et Demoré, 2007).

Les cathéters veineux périphériques (CVP) sont les dispositifs médicaux les plus utilisés dans les hôpitaux du monde entier (Zhang et al., 2013). Ils sont vitaux pour l'administration des liquides et des médicaments et pour la transfusion sanguine. Sa mise en place aisée et rapide permet l'administration des traitements et des solutés de remplissage ce qui explique leurs grandes utilisations. [(Veysier et al., 1998) ; (Brun-Buisson et Parienti, 2013)].

Plus de la moitié des patients hospitalisés sont porteurs d'un cathéter veineux, le plus souvent périphérique. (Brun-Buisson et Parienti, 2013).

En deux décennies, la proportion des patients porteurs d'un cathéter veineux périphérique au moins une fois au cours de leur hospitalisation est passée de 25 % en 1970 à plus de 80 % en 1990 (Veysier et al., 1998).

Les cathéters périphériques sont introduits par effraction dans le système vasculaire pour une durée limitée (maximum 96 heures), au cours de laquelle il est en contact avec le milieu sanguin. Les indications de pose et de maintien du cathéter périphérique doivent être limitées au strict nécessaire et discutées quotidiennement par l'équipe soignante (Aïssata, 2007).

3. Contamination et colonisation du cathéter

3.1. Les voies de contaminations

L'insertion du cathéter intraveineux fournit un portail d'entrée pour les bactéries d'un environnement extérieur non stérile à environnement intérieur stérile (**Figure 1**). Le précurseur de l'infection sanguine est habituellement la colonisation de dispositif, les bactéries trouvées adhérant aux surfaces extra-ou intra-luminales des cathéters sont la principale source et cause de septicémie. [(Widmer ,2005) ; (Mermel, 2011) ; (Zhang et al., 2013)]. Post-attachement, De nombreuses communautés microbiennes forment des biofilms. En raison d'une résistance accrue aux antibiotiques, les bactéries dans les biofilms sont difficiles à traiter efficacement (**Zhang et al, 2013**).

3.1.1 Contamination extraluminale

La colonisation par voie extraluminale du cathéter est le mécanisme le plus fréquemment évoqué pour les cathéters à émergence cutanée (65%). Celle-ci survient le plus souvent lors de la pose du cathéter, et serait alors évitable par une asepsie rigoureuse (**Mimoz et al., 2001**).

La contamination se fait par migration des micro-organismes sur la surface externe du cathéter à partir du point d'insertion cutanée (**Figure 1**). C'est la principale voie de contamination et de colonisation (**Pourreau,2008**).

Les bactéries des flores cutanées du patient ou oropharyngées du professionnel, ou provenant d'un antiseptique contaminé migrent via le site d'insertion (**Figure 1**), suivant la surface externe du cathéter le long du trajet sous-cutané. Cette contamination peut aussi survenir secondairement lors de la réalisation des pansements du site d'insertion (**Espinasse et al., 2010**).

3.1.2 Contamination endoluminale

La contamination endoluminale ou intraluminale (**35%**) se fait par migration des micro-organismes par l'intérieur de la lumière du cathéter depuis les lignes de perfusion (**Figure 1**). Ce mode de contamination est dû principalement à l'introduction de micro-organismes dans les tubulures lors des manipulations (**Pourreau.,2008**).

Les micro-organismes présents sur les mains du personnel soignant et venant contaminer le pavillon et la lumière du cathéter, à partir du contact lors de la manipulation des raccords sur la ligne veineuse (injection, déconnexion) ou par une préparation injectable contaminée (**Figure 1**) (**Mimoz et al., 2001**).

Elle devient prépondérante pour les cathéters maintenus au-delà de 4 jours (CVP) ou de 7-10 jours (CVC), soit les cathéters qui ont été le plus manipulés [(**Pourreau,2008**) ; (**Espinasse et al., 2010**)].

Cette contamination est majoritairement due à des staphylocoques à coagulase négative (Espinasse et al., 2010).

3.1.3 Contamination hématogène

La contamination du cathéter se fait à distance du cathéter, à partir d'un foyer infectieux profond. Ce mode de contamination est le plus rare des trois (Pourreau, 2008).

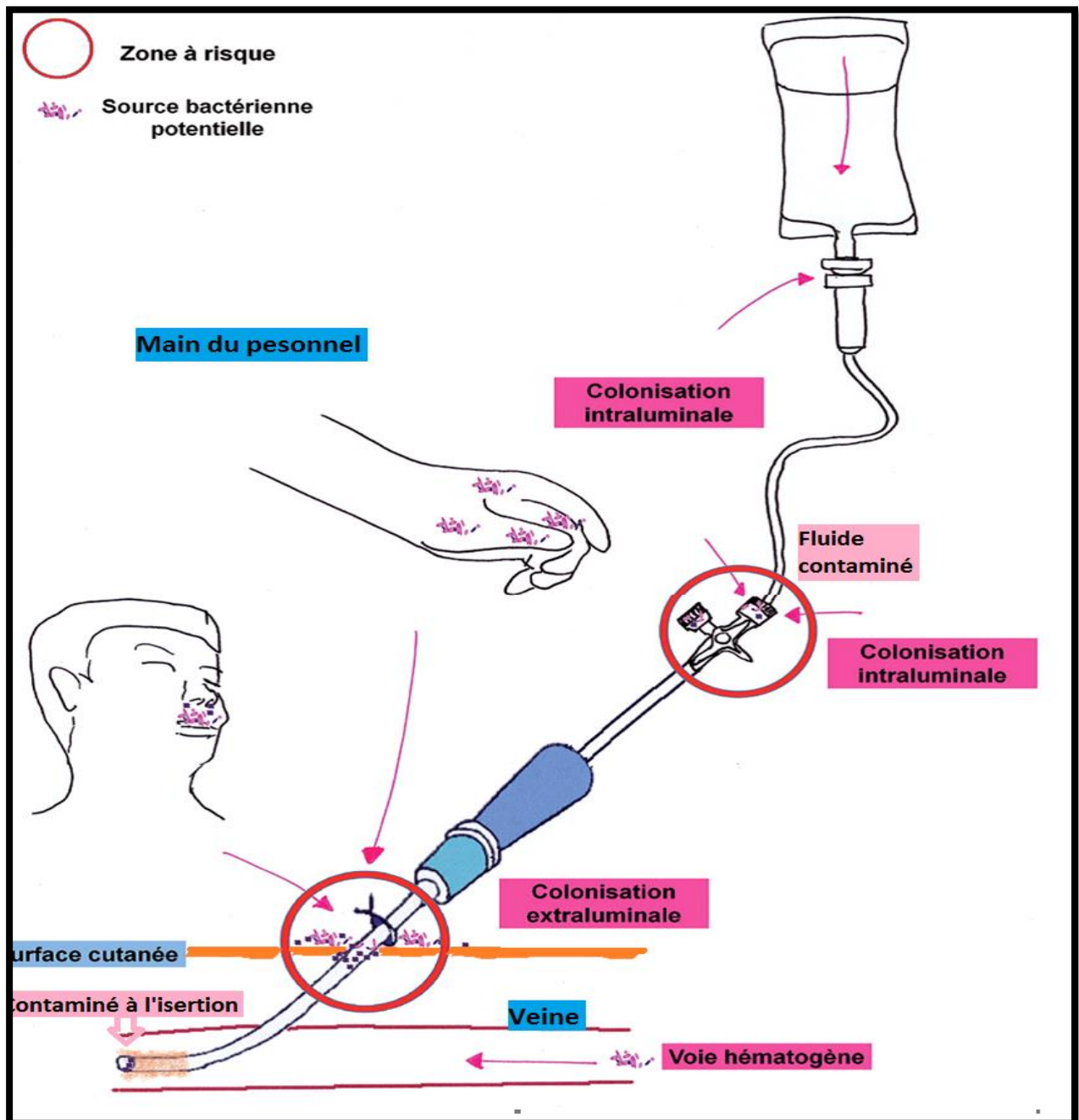


Figure 1 : Cathéter vasculaire : principales voies d'acquisition des micro-organismes (Espinasse et al., 2010).

3.2 Colonisation du cathéter

La présence d'une culture positive de l'extrémité du cathéter, en « quantité significative » (> 15 UFC par la technique semi quantitative, > 1000 UFC/mL en technique quantitative), en l'absence de signes généraux d'infections attribués au cathéter. Localement, il peut exister un érythème, mais sans suppuration locale franche. La colonisation peut provenir d'un foyer à distance aux mêmes germes que celui isolé du cathéter (**Figure 1**) (**Pourreau, 2008**).

4. Les types infections liées aux cathéters

Les infections liées au CVP augmentent la mortalité et les coûts du traitement. Les surfaces internes des CVP sont rarement examinées pour la population structurée des bactéries, car il est généralement admis que les bactéries à cette niche sont similaires à celles sur la surface externe Des CVP (**Zhang et al., 2013**).

La thrombophlébite sur CVP en est la complication la plus fréquente et est considérée par certains comme le premier stade de la complication infectieuse. La fréquence des thrombophlébites varie dans la littérature entre 5 et 42 % des CVP.

Les infections documentées sur CVP cellulites, abcès locaux ou bactériémies (**Brun-Buisson et Parienti, 2013**).

4.1. Infections « cliniques » sur cathéter

La présence d'une culture positive de l'extrémité du cathéter (>15 UFC par la technique semi quantitative, >1000 UFC/mL en technique quantitative), en présence de signes généraux ou locaux d'infection, avec révélation au moins partielle des symptômes lors de l'ablation du cathéter (**Aïssata, 2007**).

4.2. Infections « bactériémiques » sur cathéter

La présence d'une culture positive de l'extrémité du cathéter (>15 UFC par la technique semi quantitative, >1000 UFC/mL en technique quantitative), associée à une bactériémie secondaire due au même germe que celui isolé du cathéter, en l'absence d'autres foyers infectieux au même germe. En l'absence de retrait possible du cathéter, une infection sur cathéter peut aussi être identifiée si le nombre de UFC dans le sang prélevé par le cathéter contient plus de 5 à 10 fois le même germe que le sang prélevé en périphérie (**Aïssata, 2007**).

5. Bactéries impliquées dans les Infections liées au cathéter

Pour les cathéters à émergence cutanée, les microorganismes les plus fréquemment impliqués dans les bactériémies associées sont principalement ceux de la flore cutanée, essentiellement les *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* suivies des bacilles à Gram négatif et des entérocoques, (Tableau 2) [(RAISIN, 2008) ; (Mermel et al., 2009) ; (Charbonneau et Wolff, 2013)].

Tableau 2 : Etiologie des Bactéries des cathéters veineux périphérique (Boudelal, 2013)

	Bactéries	Pourcentage d'infection (%)
Gram positif	Staphylocoques blancs	32.5
	<i>S. aureus</i>	19.1
	Autres Gram+	4.8
Gram négatif	Entérobactéries	34.9
	<i>P. aeruginosa</i>	25.3
	Autres Bactéries à Gram-	2.4

Chapitre II : *Staphylococcus aureus* et biofilm sur cathéter veineux périphérique

1. Historique

Les staphylocoques ont été observés par Pasteur et Koch en 1877-1878 à partir du pus et de furoncle (Corne,2004). En 1880, Alexander Ogston propose le nom « Staphylococcus » (staphylê : grappe et kokkos : grain) car les bactéries se regroupent en amas irréguliers ressemblant à une grappe de raisin (Hennekinne, 2009).

En 1884, Rosenbach était capable d'isoler ces bactéries et de produire une culture pure. Il décrivait *Staphylococcus aureus* à cause de l'apparence jaune-orangée ou dorée des colonies (aureus signifie doré en latin) (van belkum et al.,2008).

2. Habitat

Les staphylocoques sont des bactéries commensales de la peau et des muqueuses de l'homme et de l'animal. L'habitat préférentiel de *Staphylococcus aureus* chez l'homme est la muqueuse nasale avec 10 à 40% d'individus porteurs de façon permanente (porteur sain) et environ 60% qui hébergent *Staphylococcus aureus* de façon intermittente [(Foster, 2004) ;(Sung et al.,2008)].

3. Caractères morphologiques et structuraux

Staphylococcus aureus est une coccobactérie à Gram positif, catalase positive appartenant à la famille des Staphylococcaceae [(Dasgupta et al.,2000) ; (Willcox, 2007)]. de forme sphérique de 0,5 à 1,5 μ de diamètre ,immobile, asporulée, ne possédant pas de capsule visible au microscope optique sauf pour de très rares souches, d'autres forment des colonies mucoïdes et sont entourées d'une pseudocapsule (Couture, 1990), anaérobie facultative. Elle est habituellement disposé en grappes (Figure 2), ce n'est qu'au cours de la lyse ou de la dégénérescence (veilles cellules), que parfois les cellules perdent leur affinité tinctoriale et peuvent devenir à Gram variable (El Kouir, 2003).

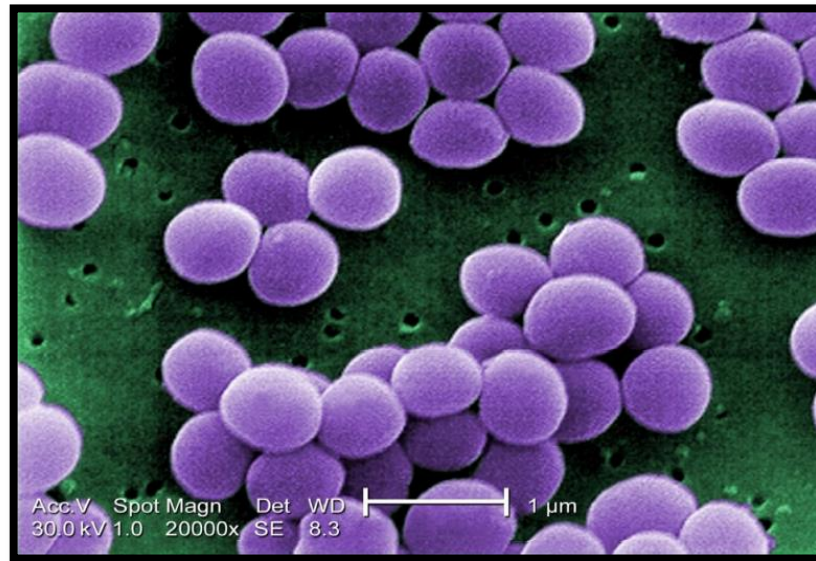


Figure 2 : Aspect de *Staphylococcus aureus* observé par microscopie électronique (X 20000)

4. Caractères culturels

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

En bouillon, la culture est rapide, en quelques heures un trouble homogène puis un dépôt sont observés, il n'y a pas de production de pigment en milieu liquide [(Kloos et al., 1975) ;(Chibi, 2015)].

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

5. Pouvoir pathogène de *S. aureus*

5.1 Les facteurs de virulence

Staphylococcus aureus est un pathogène opportuniste responsable de nombreux types d'infections chez l'homme et compte parmi les agents pathogènes les plus souvent isolés des infections nosocomiales et communautaires [(Vincenot *et al.*, 2008) ; (Kurlenda et Grinholc, 2012) ; (Otto, 2012)].

S. aureus est capable de produire plus d'une trentaine de super antigènes, comprenant entre autres des entérotoxines (dont l'entérotoxine staphylococcique A), la toxine 1 du choc toxique (TSST-1) et les toxines exfoliatives [(Dasgupta *et al.*,2000) ;(Hamidou et Belizna.,2003) ;(Batard *et al.*,2007)]

Les toxines PFTs (port-forming toxins). Ces toxines cytotolytiques ont la capacité de détruire les cellules de défense de l'hôte en formant des pores au niveau des membranes cellulaires. (Figure 3) (Parker et Feil, 2005).

Les toxines à activité protéolytique les épidermolysines : Elles font parties des protéases à sérine active, *S. aureus* sécrète la sérine protéase V8 qui clive spécifiquement la liaison peptidique des résidus aspartate et glutamate. Et Autres protéases tell que les Staphopaines A et B, sont des protéases à cystéines. (Figure 3) (Vincenot *et al.*, 2008).

S. aureus possède de nombreuses enzymes impliquées dans sa virulence, ayant une activité protéase, hyaluronidase, collagénase, lipase, nucléase et coagulase qui lui permettent de dégrader les tissus humains et qui favorisent l'extension du foyer infectieux. (Figure 3) [(Dinges *et al.*, 2000) ; (Bien *et al.*, 2011) ;(Liesse lyamba, 2012)].

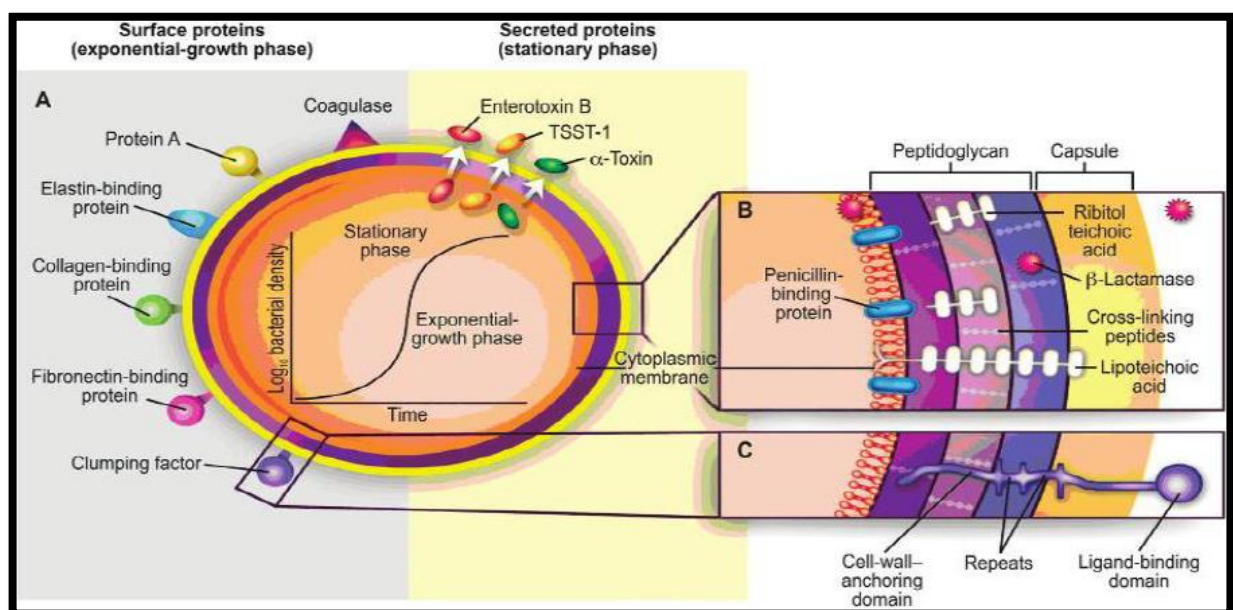


Figure 3 : Facteurs de virulence chez *Staphylococcus aureus* (Al alam, 2008)

5.2 Les protéines de surface et facteurs d'adhérence (MSCRAMM)

L'adhérence bactérienne à la surface des cellules épithéliales des muqueuses représente la première étape menant à la colonisation et, éventuellement, à l'invasion de l'hôte. L'adhésion de *S. aureus* aux molécules de l'hôte (ou aux surfaces inertes de type cathéters) est médiée par des adhésines qui sont aussi appelées MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules). Les adhésines de *S. aureus* les mieux caractérisées sont les protéines de liaison à la fibronectine, FnBPA et FnBPB, la protéine de liaison au collagène Cna, les protéines de liaison au fibrinogène (Clumping factor) ClfA et ClfB, et la protéine A (SpA pour staphylococcal protein A) et l'élastine (Ebps), elles sont solidement ancrées au peptidoglycane (**Figure 4**) [(Foster et Hööker, 1998) ;(Corrigan et al., 2009) ; (Burke et al., 2010) ;(Liesse Iyamba, 2012)].

Ces composés de surface servent de récepteurs aux protéines du plasma adsorbées à la surface du matériel médical (cathéters, prothèses...) expliquant ainsi la colonisation par les staphylocoques. La formation du biofilm se produit aussi lors de l'infection des tissus par l'adhésion bactérienne aux molécules de la matrice extracellulaire de l'hôte (**Planchon, 2006**).

Parmi les molécules impliquées dans l'adhésion directe in vitro aux surfaces abiotiques on retrouve l'autolisine Atl E (**Planchon, 2006**), l'acide téchoïques (**Otto, 2004**), les protéines de surface SSP-1 (280 kDa) et SSP-2 (250 kDa), la protéine BAP (Biofilm Associated Protein) qui contribue à la formation de biofilm (**Cucarella et al, 2001**).

En plus des infections aiguës, *S. aureus* peut provoquer des infections chroniques. La plupart d'entre elles sont dues à la capacité de ce pathogène à adhérer sur les implants médicaux temporaires (ex : cathéters) ou permanents (ex : prothèses orthopédiques, valves cardiaques) et à former un biofilm (**Figure 4**). [(Von Eiff et al., 2005) ; (Harris et Richards, 2006) ; (Bernard, 2006)]. Ces infections sont plus difficiles à traiter et nécessitent un remplacement plus fréquent des implants médicaux (**Liesse Iyamba, 2012**).

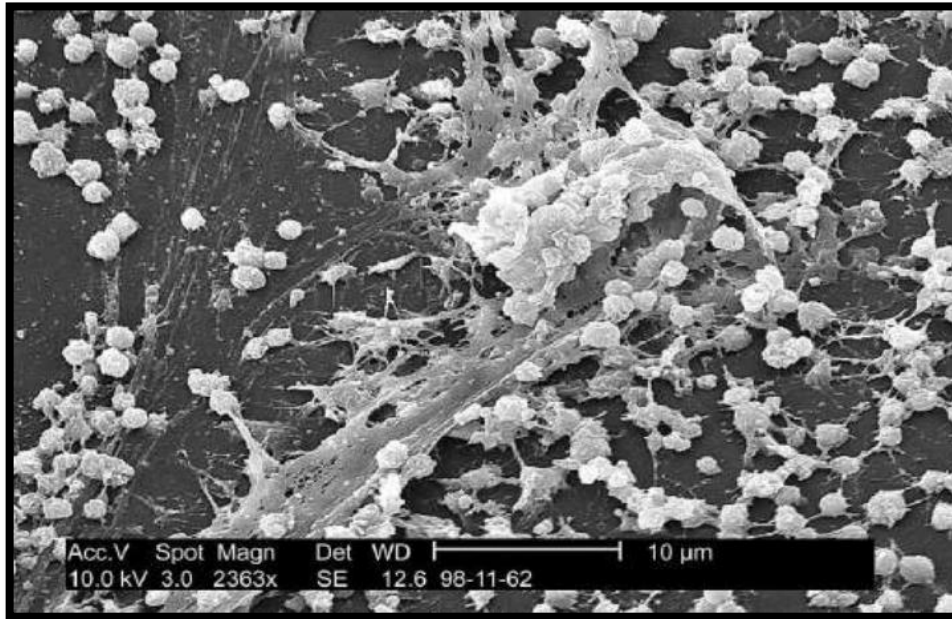


Figure 4 : Visualisation par microscope confocal d'un biofilm formé par *Staphylococcus spp* sur la surface d'un cathéter veineux (Liesse Iyamba, 2012)

5.3 La formation du biofilm par *S. aureus*

5.3.1 Historique

Les bactéries peuvent adopter deux modes de vie différents : elles sont soit libres et isolées dans un milieu (état planctonique), soit attachées à une surface ou elles vivent en communauté au sein d'un biofilm (état sessile). **Claude E. Zobell** a été l'un des premiers chercheurs à observer des biofilms en 1943.

Le terme de biofilm a été proposé en 1978 par **Costerton J. W** pour désigner une communauté de micro-organismes enrobés d'une matrice hydratée, riche en polymères extracellulaires, et en contact avec une surface.

En dépit de la diversité des situations écologiques, industrielles ou médicales concernées par la formation des biofilms, toutes ces entités biologiques partagent des caractéristiques communes.

Christensen et ses collaborateurs (1982) ont été les premiers à observer la formation d'un biofilm chez une souche de *Staphylococcus spp* isolée d'un cathéter. Ils ont suggéré que la formation du biofilm était un facteur critique dans la pathogénèse de *Staphylococcus spp*. Ces faits ont été confirmés la même année par **Peters et al. (1982)** qui ont montré une corrélation entre la capacité de colonisation du matériel médical par *Staphylococcus spp* et les infections nosocomiales (**Planchon, 2006**).

Mack et al. (1994) ont proposé un modèle de formation du biofilm en deux phases chez les staphylocoques. Ils ont montré que ces deux phases peuvent être génétiquement séparées :

- La première phase consiste en l'attachement initial des cellules sur une surface.
- La seconde phase : la multiplication et à la formation d'une communauté structurée, mature et multicouche des cellules bactériennes.

Ces deux phases sont physiologiquement différentes l'une de l'autre et requièrent chacune des facteurs spécifiques. Le détachement de cellules du biofilm mature permet la dissémination des bactéries et la colonisation de nouveaux sites d'infection chez l'homme (**Otto, 2008**).

5.3.2 Définition du biofilm

Les biofilms sont des communautés de micro-organismes en contact avec une surface et enrobés par une matrice extracellulaire qui les protège des agressions extérieures. Bien que bénéfiques dans la plupart des environnements, les biofilms bactériens se développant sur des implants ou lors d'infections chroniques constituent des réservoirs de pathogènes à l'origine de nombreuses infections liées aux soins (**Lebeaux et al., 2014**).

Les bactéries acquièrent un mode de croissance, une physiologie et un métabolisme différent des bactéries planctoniques. Ces changements phénotypiques résultent d'une révolution du profil d'expression de leurs gènes. Toutes ces transformations sont coordonnées grâce à un système de communication entre les bactéries d'une même espèce au sein du biofilm, appelé *quorum sensing* (**Behlau et Gilmore, 2008**).

5.3.3 Etapes de formation des biofilms

Principales étapes de la formation des biofilms. Après les phases d'adhésion réversible puis irréversible, la bactérie fonde une micro-colonie qui produit une matrice extracellulaire (en jaune) et qui peut accueillir d'autres espèces microbiennes par accréation.

Le biofilm peut se disperser et libérer des bactéries mobiles (dispersion active) ou des agrégats bactériens entourés de matrice (dispersion passive). D'après Lebeaux et Ghigo (**Figure 5**) [(**Lebeaux et Ghigo.,2012**) ;(**Lebeaux et al., 2016**)].

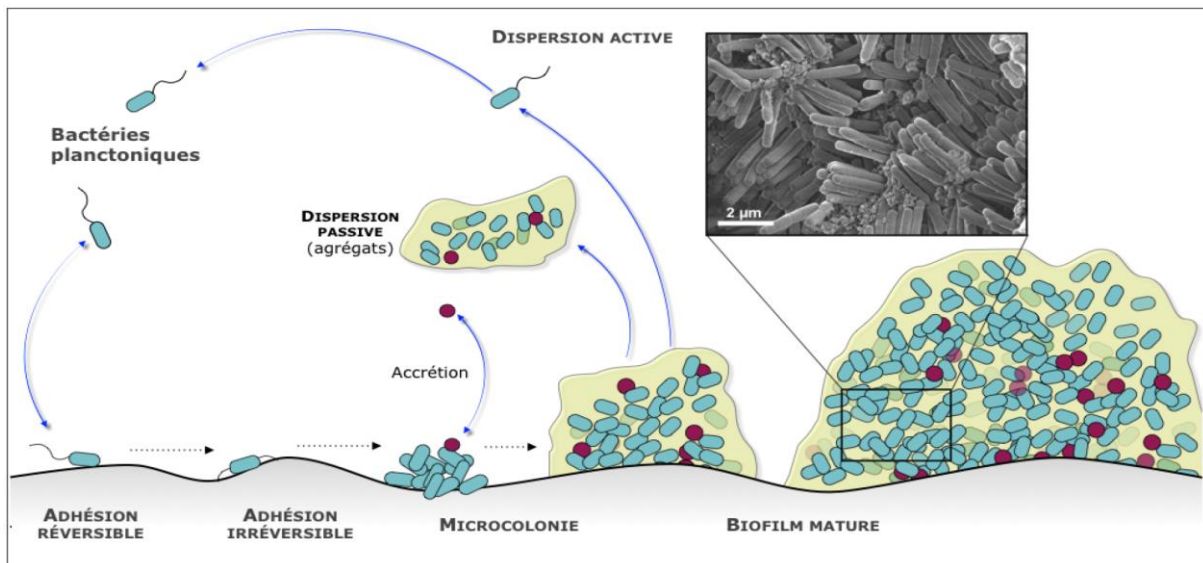


Figure 5 : Principales étapes de la formation des biofilms. (Lebeaux et al., 2016)

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

➤ L'adhérence réversible

Les bactéries s'y attachent de manière réversible par des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques (interactions hydrophobes, liaisons de Van der Waals, forces hydrodynamiques et interactions répulsives électrostatiques) (Figure 5) [(Knobloch et al., 2001) ; (Dunne, 2002)].

Cette étape est influencée par des conditions environnementales impliquant le pH, l'osmolarité, la température, la concentration en oxygène et en nutriments et l'hydrodynamique de fluide (Beloin et al., 2008).

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

➤ L'adhérence irréversible

Grace à la sécrétion d'exopolymères par les bactéries favorisant leur fixation à un support et conduisant à des fortes interactions avec des liaisons covalentes entre les bactéries et la surface. La présence des flagelles, des pilis et des adhésives permettant à la bactérie de consolider leur fixation au support (Figure 5) (Vallet et al., 2001).

➤ Le développement précoce du biofilm

Les bactéries se multiplient lentement et continuent de produire des exopolysaccharides.

Elles s'agrègent entre elles et forment des micro-colonies, qui sont protégées par la matrice exopolysaccharidique (**Figure 5**) (**Jacobsen et al., 2008**).

➤ La maturation du biofilm

L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation de canaux aqueux et de pores entre les micro-colonies (**Folkesson et al., 2008**), qui forment un réseau de circulation permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance de micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets [(**Vallet, 2003**) ;(**Tenke et al.,2006**)],

La production et la sécrétion d'enzymes ou de toxines provoque la dégradation des résidus présents dans les surfaces environnantes et permet ainsi la libération de nutriments (**Figure 5**) (**Jacobsen et al., 2008**).

➤ Le détachement de bactéries

Les bactéries se détachent du biofilm et se dispersent dans le milieu environnant après un retour à l'état planctonique. Dépendant notamment des forces du flux du milieu dans lequel le biofilm se trouve et des conditions environnementales lorsqu'elles deviennent défavorables : limitation de la disponibilité en oxygène dans les biofilms épais, apparition de forces de cisaillement dues aux conditions hydrodynamiques, diminution de la concentration ou modification de la nature des nutriments disponibles (**Figure 5**) [(**Sauer et al.,2002**) ; (**Sauer et al., 2004**)].

Cependant, le détachement des bactéries peut aussi être une stratégie active, initiée par les bactéries elles-mêmes, leur permettant de coloniser de nouvelles surfaces et de survivre lorsque l'espace et les nutriments deviennent limités. Les bactéries peuvent se détacher seules ou par petits ou gros amas selon les mécanismes impliqués (**Kaplan, 2010**).

5.4 Résistance des staphylocoques aux antibiotiques

S. aureus a développé des résistances à quasiment tous les antibiotiques mis sur le marché. Les mécanismes impliqués comprennent la synthèse d'enzymes inactivatrices, la modification de la cible des antibiotiques et des systèmes d'efflux qui diminuent la concentration de l'antibiotique dans la bactérie (**Corne, 2004**).

Chapitre III : L'activité antibactérienne du miel sur les cellules planctoniques et sessiles

C'est depuis l'Antiquité que les médecins et guérisseurs connaissent les effets antibactériens du miel. Ceci est principalement dû à sa forte teneur en sucre et sa très faible teneur en eau et par conséquent empêche la prolifération bactérienne. De plus, l'hyper-osmolarité du miel contribue à l'extraction de l'eau contenue dans les bactéries conduisant à leur déshydratation et leur élimination **(Bessas,2008)**.

Cependant, même dilués les miels restent actifs face aux bactéries, ceci est dû à la production et à l'activation d'une glucose oxydase, qui a pour rôle d'oxyder le glucose en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est alors le composant principal responsable de l'activité antiseptique et antibactérienne du miel [(**Siess et al., 1996**) ;(**Brudzynski, 2006**)].

Certains chercheurs ont montré que cette activité du miel est due principalement à la présence des protéines défensives qui confèrent la majorité de l'activité antimicrobienne du miel. (**Kwakman et al., 2010**).

Le peroxyde d'hydrogène empêche le développement des bactéries au sein du miel. Le miel garde son activité grâce à d'autres constituants tels que le méthyl syringate ou le methylglyoxal (MGO), la concentration de MGO peut aller de **3 à 4** µg par gramme du miel. Ce dernier joue un rôle antibactérien (**Molan ,1992**) ;(**Kilty et al.,2011**).

Jervis-Bardy et Wormald ; en 2011 ont montré qu'à une concentration **530** µg/g de MGO le biofilm de *S aureus* est éradiqué.

Le miel aura une activité plus ou moins grande sur un spectre de bactéries plus ou moins large, particulièrement sur les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline, les Entérocoques résistants à la vancomycine, le *Pseudomonas aeruginosa* et contre lesquelles les antibiotiques actuels sont inopérants. (**Kwakman et al., 2008**).

MATETIEL

ET

METHODES

1. Lieu d'étude

Notre étude a été menée au laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) de Tlemcen. L'identification des souches a été réalisée au niveau du laboratoire central du CHU Tlemcen.

2. Prélèvements et isolement

Vingt-huit cathéters périphériques ont été soigneusement prélevés de patients hospitalisés plus de 48h au service de réanimation du CHU de Tlemcen dans des conditions d'asepsie. Ils sont placés individuellement dans des tubes en verre stériles puis transportés immédiatement au laboratoire pour être analysés.

Selon la technique quantitative de **Brun Buisson, (1987)** l'extrémité distale des cathéters est coupée puis mise dans un tube contenant 1mL de sérum physiologique. Après un traitement avec l'ultrason et un passage au vortex, un volume de 0,1mL est ensemencé par étalement en surface du milieu gélose Chapman sélectif des staphylocoques. Les boîtes ensemencées sont incubées à 37°C pendant 48 heures.

3. Identification

L'identification des souches est contrôlée, après vérification de leur pureté par :

- L'étude des caractères macroscopiques.
- L'étude des caractères microscopiques (forme des colonies, mobilité, coloration de Gram).

3.1 Identification par automate (walkaway)

Après l'identification primaire des souches isolées celles-ci vont être non seulement identifiées grâce à un automate connu sous le nom de *Walkaway 96 plus* (Siemens) mais également un antibiogramme est réalisé en même temps.

3.2 Principe

Des plaques spéciales Micro-Scan ® qui contiennent des milieux déshydratés dans des cupules qui sont réhydratées lors de l'ajout de la suspension bactérienne.

Des unes sont conçues pour la détermination de la sensibilité aux antibiotiques et/ou l'identification au niveau de l'espèce des bacilles Gram négatifs aérobies et anaérobies facultatifs et d'autres sont conçues pour la détermination de la sensibilité aux ATB et /ou l'identification au niveau des espèces des Cocci Gram positif aérobies et anaérobies facultatifs.

Les tests de sensibilité aux ATB sont des micro-méthodes de la méthode de la dilution en milieu liquide qui a été déshydraté. Différents ATB sont dilués dans un bouillon Mueller –Hinton supplémenté en calcium et en magnésium permettant d’obtenir des concentrations d’intérêt clinique. Le bouillon triméthoprimine et triméthoprimine/sulfaméthoxazole contient la thymidine phosphorylase pour réduire les niveaux de thymidine dans le milieu. Après inoculation et réhydratation avec une suspension standardisée de germes et après incubation à **35°C** pendant une durée minimale de **16** heures, la concentration minimale inhibitrice (CMI) du germe testé est déterminée par la plus basse concentration d’ATB montrant une inhibition de croissance.

Les souches obtenues sont conservées sur gélose inclinée, et sont ensuite transportées au laboratoire LAMAABE dans une glacière (**Figure 6 et 7**).



Figure 6 : Système WalkAway® 96 plus

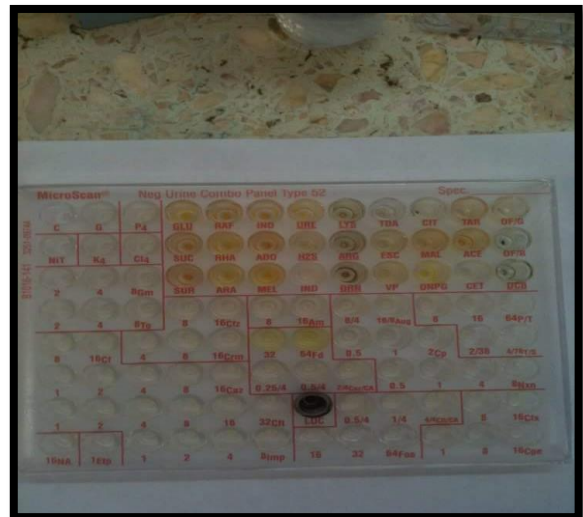


Figure 7 : Plaque PC31 : Staphylocoques

4 Evaluation de la formation du biofilm *in vitro*

4.1 Méthode de plaque de culture de tissus (TCP)

4.1.1 Technique

Le test TCP décrit par **O'Toole *et al.*, (2000)** permet une évaluation quantitative de la formation du biofilm.

A partir d’une culture de **18** heures dans le milieu BHIB, les puits d’une microplaque de **96** puits (polystyrène) sont inoculés avec **150** μ L de la suspension bactérienne ajustée à une DO de **0,1**. Les microplaques sont incubées pendant **24** heures à **37°C**. Les puits sont lavés trois fois avec l’eau distillée stérile afin d’éliminer les bactéries libres (planctoniques). Les biofilms formés par

l'adhérence des organismes sessiles sont colorés avec du cristal violet (0,1%) pendant 15 min. L'excès du colorant est ensuite rincé par un lavage en profondeur avec de l'eau distillée et les plaques sont laissées pour le séchage afin d'évaluer l'importance de la coloration du biofilm (Figure 8) (Stepanovic *et al.*, 2000).

4.1.2 Lecture

La classification des résultats obtenus présente sur la base du DO témoin. Les souches ont été classées comme suit : $DO \leq DO_t(\text{Témoin})$: non formatrice du biofilm, $DO_t \times 2 \leq DO \leq DO_t \times 4$: Modérée, $DO_t \times 4 \leq DO$: Fortement formatrice du biofilm (Christensen *et al.*, 1985).

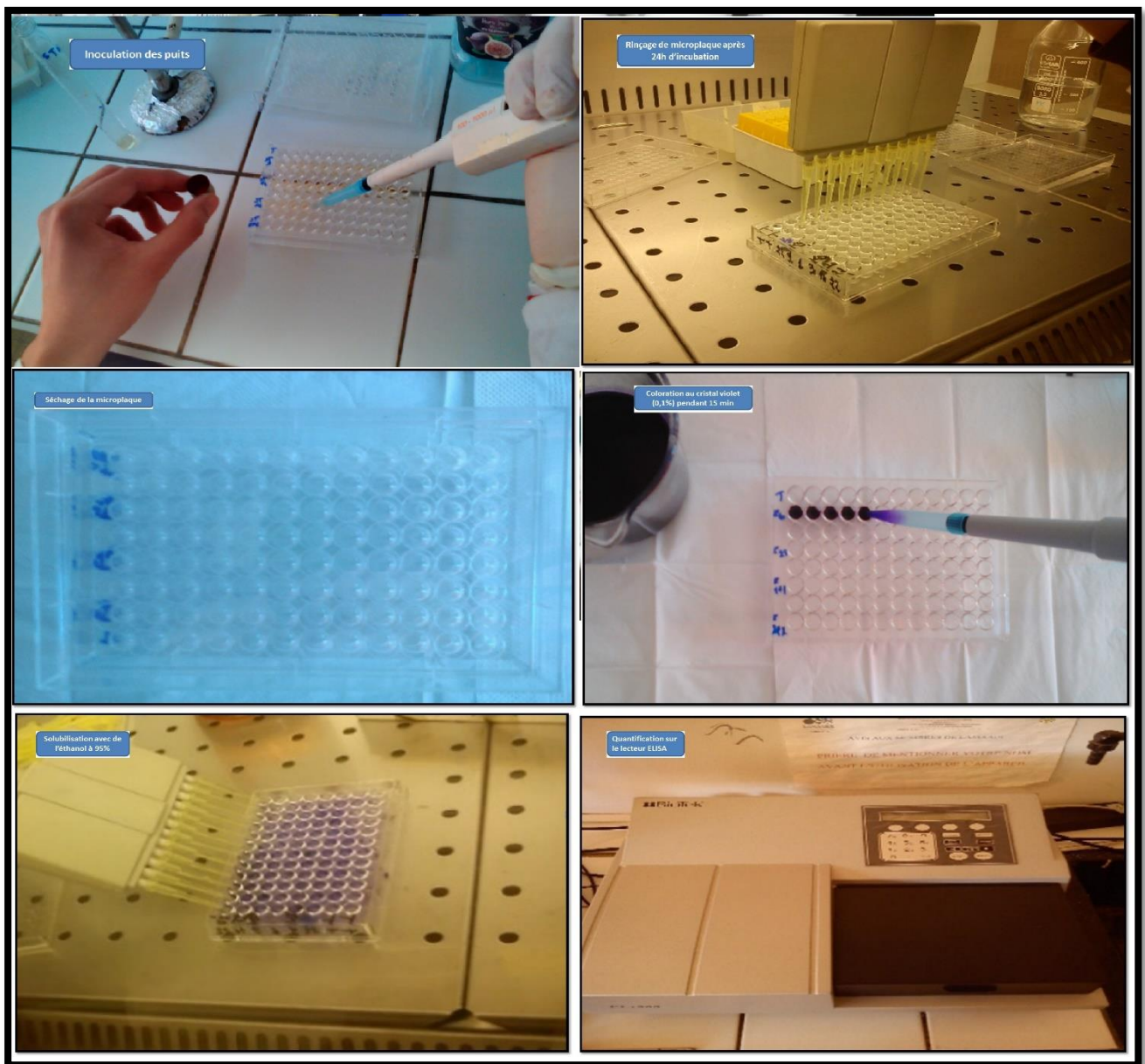


Figure 8 : Les étapes de formation du biofilm par la technique TCP

4.2 La méthode du Rouge Congo Agar

La gélose Rouge Congo Agar est un milieu très convenable pour la détection des souches productrices de slime. Sur ce milieu les souches exprimant le PIA (Polysaccharide Inter-cellular 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).

4.2.1 Technique

La production de slime a été recherchée sur le milieu Rouge Congo Agar (RCA). Selon Freeman *et al.*, (1989), le milieu a été préparé avec 37 g/L BHIB, 50 g/L de saccharose, 10 g/L d'agar et 0,8 g/L du Rouge Congo Agar, puis autoclavé à 121°C pendant 15 minutes (Figure 09) (Nasr *et al.*, 2012). Le milieu est ensemencé avec une anse d'une suspension de notre souche. La lecture a été faite après 24 heures à 37°C et (Jain et Agarwal, 2009).

4.2.2 Lecture

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



Figure 9 : Phénotypes de production de slime (Touati *et al.*, 2007)

5 Formation du biofilm *in vitro* en système dynamique sur cathéter en présence de deux substrats (sérum glucose et salé)

Les biofilms peuvent être cultivés *in vitro* dans un système en flux continu à un débit spécifique pour les solutés standards. Celui-ci est un système ouvert qui permet l'approvisionnement en continu des nutriments d'une manière similaire à l'environnement réel qu'il soit médical, naturel ou

industriel. Une fois le cathéter stérile retiré de son emballage, dans les conditions aseptiques, seule la partie soupape ventilée de cathéter en PVC (partie qui, normalement est en contact avec la peau du malade) est inoculée par trempage dans une suspension bactérienne de *S. aureus* 2 à une DO 0,1 réalisée à partir d'une culture de 18h en milieu BHIB (Figure 10).

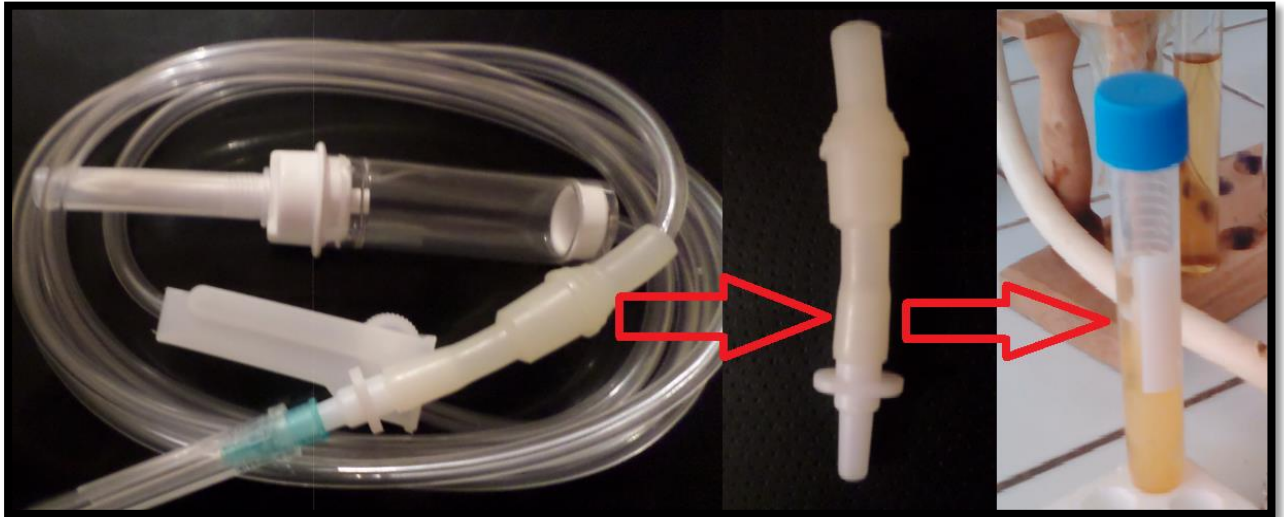


Figure 10 : Inoculation de la soupape ventilée du cathéter

Après un temps de contact de 20 minutes avec suspension bactérienne, la surface externe de partie « soupape » est aseptisée par un détergent (eau de javel) et un désinfectant (Figure11).

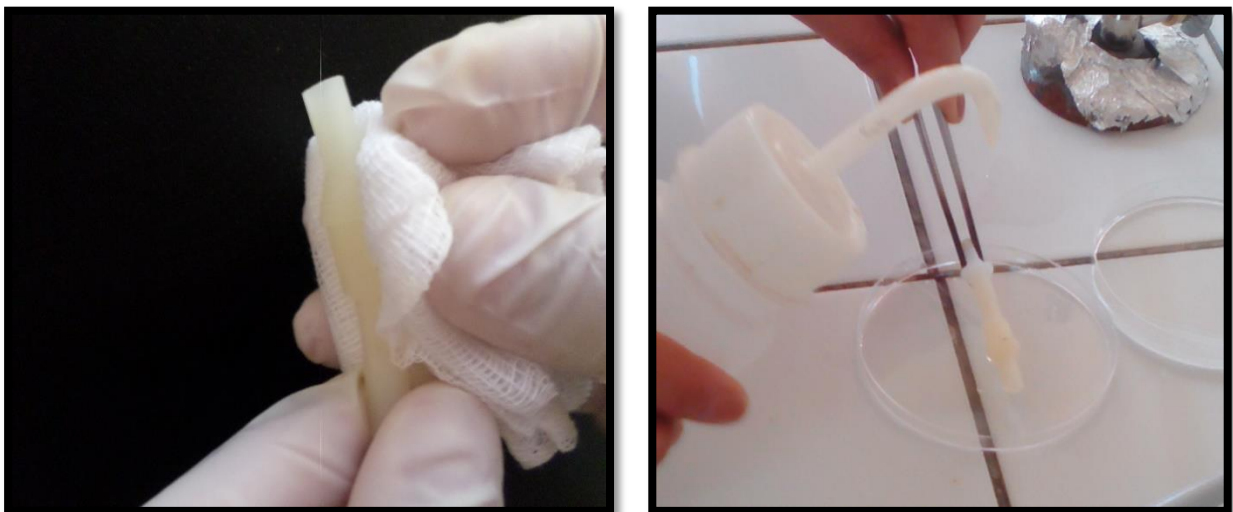


Figure 11 : Désinfection de la surface externe de la soupape

Celle-ci est remplacée avec l'ensemble du cathéter est accrochée à une potence afin de simuler un vrai acte de cathétérisme de **48h** et d'assurer le bon écoulement du soluté en un flux continu. L'écoulement du soluté que ça soit un sérum salé ou un sérum glucosé est réglé à un débit spécifique pour les solutés standards qui est normalement d'une goutte par seconde (**1mL** est l'équivalent de **20** gouttes). Le dispositif est maintenu et géré pendant **48h** à une température ambiante (**Figure 12**).



Figure 12 : Simulation de cathétérisme

Après un écoulement de 48h d'une goutte à goutte de soluté (**48h** d'écoulement), le dispositif (cathéter), est décroché et toute sa surface externe est aseptisée à l'aide d'un détergent de type hypochlorite de sodium.

Tout de suite après et à côté de bec benzène, des morceaux de **1cm²** de différentes parties du dispositif (cathéter) sont sectionnés trois morceaux de la soupape ventilée et trois autres morceaux sur la longueur du cathéter à **10 cm**, **75 cm** et **140 cm** du bout distal. (**Figure 13**), rincés trois fois avec de l'eau distillée stérile, et mis dans des tubes contenant 1mL d'eau physiologique. Après agitation au vortex et sonication, **0,1 mL** de la solution est repris avec une micropipette puis étalé sur une gélose nutritive. Une série de dilutions de **10⁻¹** jusqu'au **10⁻⁵** est effectuée pour chaque

échantillon, puis ensemencée sur gélose nutritive dans un but de faire un dénombrement des souches adhérees (**Figure 14**).

Dénombrement : cas généraux des boîtes contenant de **30** à **300** colonies

Retenir les boîtes contenant au plus **300** colonies, au niveau de deux dilutions successives.

Il faut qu'une boîte renferme au moins **30** colonies.

Calculez le nombre N de microorganismes par millilitre ou par gramme de produit, en tant que moyenne pondérée, à l'aide de l'équation suivante :

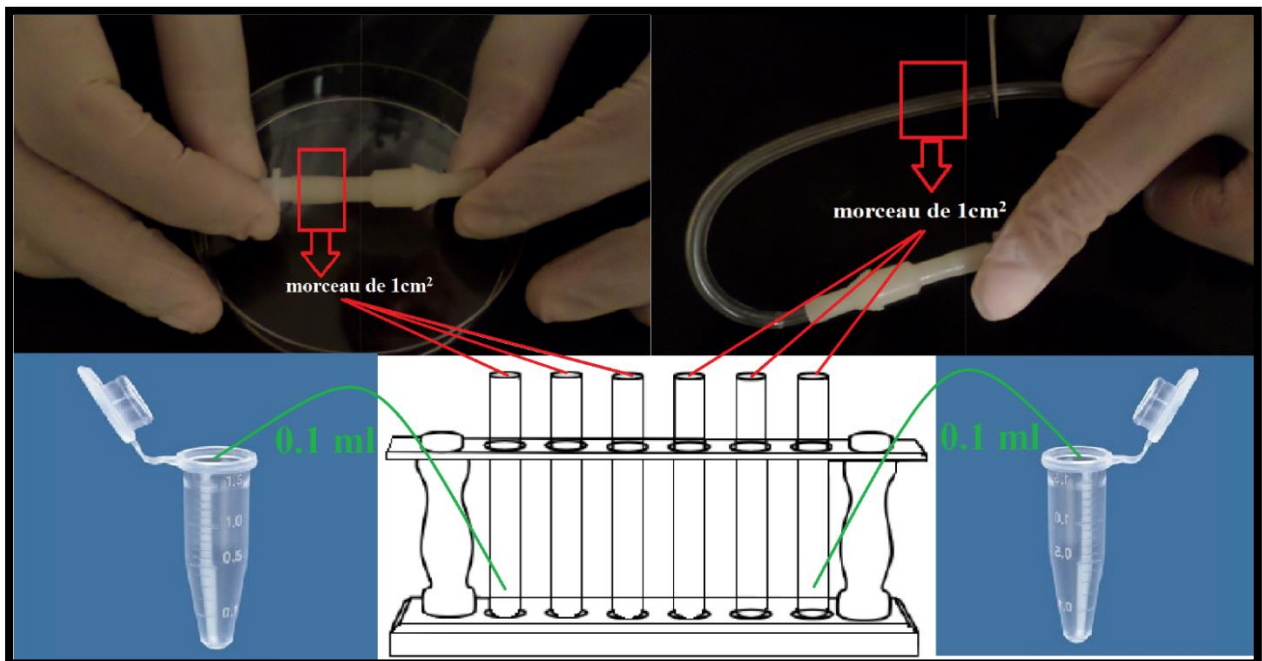


Figure 13 : les étapes du dépistage du biofilm sur cathéter

6 . Formation du biofilm sur des morceaux de cathéters en mode statique avec et sans miel

6.1 Sans miel

Des coupes de **1cm²** du cathéter périphérique sont introduites dans des tubes contenant **5mL** d'une suspension bactérienne de *S aureus* ajustée à une DO=600 de **0,1** puis incubées à **37°C** pendant 48h. Les supports sont récupérés, lavés abondamment avec l'eau distillée stérile puis placés dans 1mL de l'eau physiologique. La sonication est effectuée **3** fois à l'aide de l'ultrason model WiseClean WUC-D06H pendant **5** min intercalée par un passage de **20** sec au vortex (**Figure16**). Une série de dilutions est effectuée pour chaque échantillon, puis ensemencée sur gélose nutritive. Le dénombrement des colonies est réalisé après **24h** d'incubation à **37°C**.



Figure 14 : Procédés réalisés en mode statique

6.2 Avec miel

6.2.1 L'addition du miel dans la suspension bactérienne

Des morceaux de **1 cm²** de la soupape ventilée du cathéter périphérique sont mis dans des tubes contenant 1mL de la suspension bactérienne à une DO de **0.1** et 1mL du miel puis incubés à **37°C** pendant **48h**. Les morceaux sont récupérés, lavés abondamment à l'eau distillée stérile puis placés dans 1mL de l'eau physiologique. La sonication est effectuée **3** fois à l'aide de l'ultrason model Wise Clean WUC-D06H pendant **5** min intercalée par un passage de **20** sec au vortex. Une série de dilutions est effectuée pour chaque échantillon, puisensemencée sur gélose nutritive. Le dénombrement des colonies est réalisé après **24h** d'incubation à **37°C**.

6.2.2 L'addition du miel après formation du biofilm

Après la formation du biofilm sur des morceaux de **1cm²** du cathéter périphérique (soupape ventilée) comme décrit précédemment.

Les morceaux récupérés, rincés avec l'eau distillée stérile et placés dans des tubes contenant 1mL d'eau physiologique et d'un **1** mL du miel puis incubés à **37°C** pendant **24h**.

Après l'incubation les morceaux sont rincés et traités par passage successif sur l'ultrason et le vortex pour détacher les bactéries adhérees sur le morceau du KT. Une série de dilutions est effectuée pour chaque échantillon, puis un ensemencement sur gélose nutritive. Le dénombrement des colonies est réalisé après **24h** d'incubation à **37°C**.

RESULTATS

ET

DISCUSSION

1. Prélèvements

Pendant le mois de février 2017, **28** cathéters veineux périphériques ont été prélevés de **28** patients hospitalisés plus de 48h dans le service de réanimation du CHU de Tlemcen. L'âge des patients varie de **23** à **76** ans. Les patients porteurs de ces cathéters présentaient des signes d'infection.

Une culture quantitative après vortexage à un seuil supérieur ou égal à 10^3 UFC/cm² définit l'infection sur dispositifs médicaux (**Brun Buisson, en 1987**).

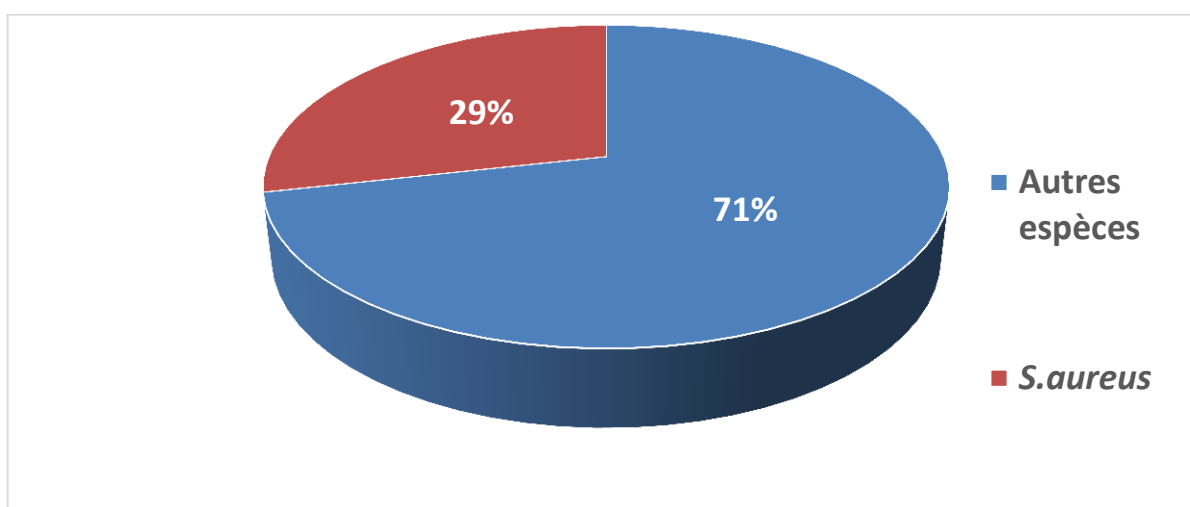


Figure 15 : Distribution des bactéries isolées de cathéters veineux périphériques

La confirmation de la colonisation ou de l'infection liée à tous ces cathéters a été réalisée pour l'ensemble des prélèvements. Un total de **14** prélèvements positifs étaient infecté avec un dénombrement $\geq 10^3$ UFC/cm².

2. Identification

2.1 Identification macroscopique

Sur le milieu de Chapman, les colonies présentant l'aspect macroscopique caractéristique du genre *Staphylocoques*, le développement bactérien sur le milieu de Chapman ne constitue qu'une indication des *Staphylocoques*, d'autres bactéries (enterocoques) peuvent s'y cultiver. Sur ce milieu, les colonies de *Staphylocoques* sont apparues souvent pigmentées et entourées d'une auréole jaune dans le cas où le mannitol est fermenté, sinon les colonies sont de couleur blanche. Les colonies sont arrondies à bords réguliers de **1** à **2** mm de diamètre après 48h d'incubation à **37°** (**Figure 18**).



Figure 16 : Staphylocoques sur le milieu de Chapman

2.2 Identification biochimique par l'automate

L'identification par L'automate a permis de caractériser 4 souches de *S.aureus*, avec profils numériques différents .

Tableau 3 : Résultat de L'identification par L'automate

<i>S. aureus 1 SARM</i>	<i>S. aureus 2 SARM</i>	<i>S. aureus 3</i>	<i>S. aureus 4</i>
6736153	6736153	6336153	6736153

2. Sensibilité des souches isolées

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches *S. aureus* isolés par l'automate montre un taux de résistance important vis-à-vis la plupart des antibiotiques utilisés dont 2 étaient des SARM. Selon le tableau 4 on a constaté que deux souches (*S.aureus 1, 2*) sont résistantes au méticilline les souches *S.aureus 1,2* et 3 résistent à la majorité des antibiotiques testés dont la Pénicilline G (P), l'Oxacilline (OX), la Gentamycine(GN) , le Kanamycine(K), l'Oflaxacine(OFX) et la Tétracycline (TE).

Tandis que la souche *S.aureus 4* révèle une sensibilité vis-à-vis la plus part des antibiotiques testés, avec une résistance à la Kanamycine (K) et l'Oflaxacine (OFX).

Tableau 4 : sensibilité des souches de *S. aureus* aux antibiotiques

	<i>S. aureus 1</i> <i>SARM</i>	<i>S. aureus 2</i> <i>SARM</i>	<i>S. aureus 3</i>	<i>S. aureus 4</i>
Vancomycine (VA)	S	S	S	S
Pénicilline G (P)	R	R	R	R
Oxacilline (OX)	R	R	R	S
Erythromycine (E)	S	S	S	S
Gentamycine(GN)	R	R	R	S
Kanamycine(K)	R	R	R	R
Oflaxacine(OFX)	R	R	R	R
Clindamycine(Cmn)	I	S	S	S
Rifampicine(RIF)	I	S	S	S
Tétracycline(TE)	I	R	R	S
Triméthopriime+sulfamide(STX)	S	S	S	S
Pristinamycine(PTN)	S	S	S	S

4. Evaluation de la formation du biofilm *in vitro*

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

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

Les 4 souches isolées lors de cette étude ont été testées pour leur capacité à former des biofilms par deux techniques.

4.1 Microplaque TCP

Après la quantification de DO avec le lecteur ELISA, la technique de microplaque 96 puits a montré que la plupart des souches isolées des cathéters sont de bonnes formatrices du biofilm avec une DO de **0.43** pour la *S.aureus 2* qui était fortement formatrice de biofilm et les trois autres souches étaient modérément formatrice du biofilm avec des DO entre **0.18** et **0.39** (Figure 19).

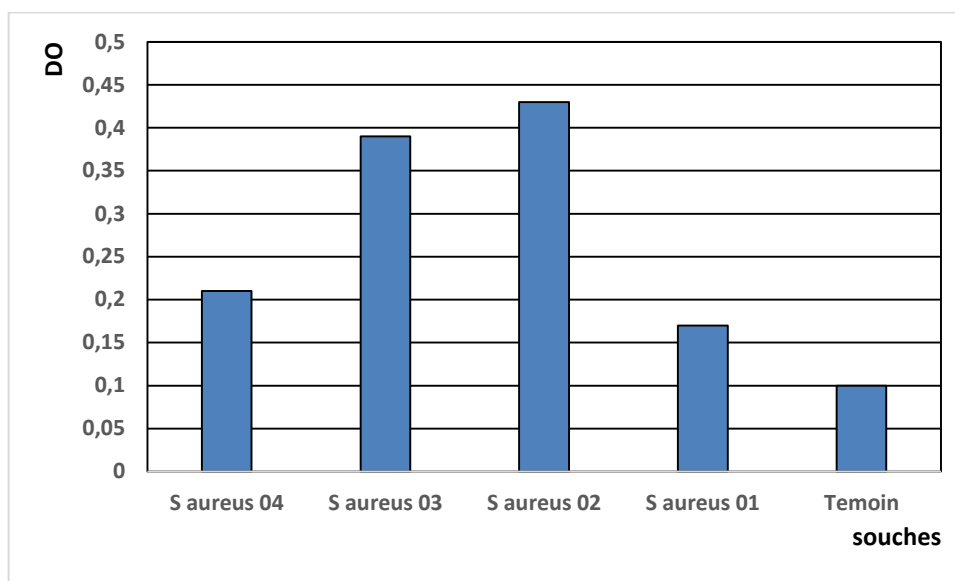


Figure 17 : Résultats d'évaluation de la formation du biofilm par la méthode TCP

La technique TCP décrite par **Christensen et al., (1985)** est considérée comme un test standard pour la détection de la formation du biofilm. Cette méthode a été rapportée comme étant la plus sensible, précise et reproductible pour la détermination de la formation du biofilm à staphylocoques *in vitro* (**Rasha et al., 2012**). C'est une technique pratique et économique pour l'identification des facteurs et des conditions de cultures optimales pour la formation du biofilm (**Castro Melo et al., 2013**).

Elle permet une détermination quantitative pour comparer l'adhésion des différentes souches et aussi examiner un grand nombre d'isolats simultanément. (**Rasha et al., 2012**).

Pour cette raison **Rasha et ses collaborateurs en 2012** ont proposé la méthode de culture sur RCA comme une alternative à la méthode TCP pour le dépistage de la formation du biofilm par les staphylocoques étant plutôt facile à réaliser, elle prend moins de temps, elle est sensible et spécifique.

4.2 Rouge Congo Agar (RCA)

La recherche de la production de slime sur le milieu Rouge Congo a révélé que les 4 souches de *Staphylococcus aureus* isolées des cathéters veineux périphériques sont productrices de slime soit **100%** des souches (**Figure 20**).

Nos résultats sont en accord avec celles obtenus par **Chibi, en (2015)** ou elle a trouvé que **100%** des souches *Staphylococcus aureus* isolées des surfaces sont productrices de slime.

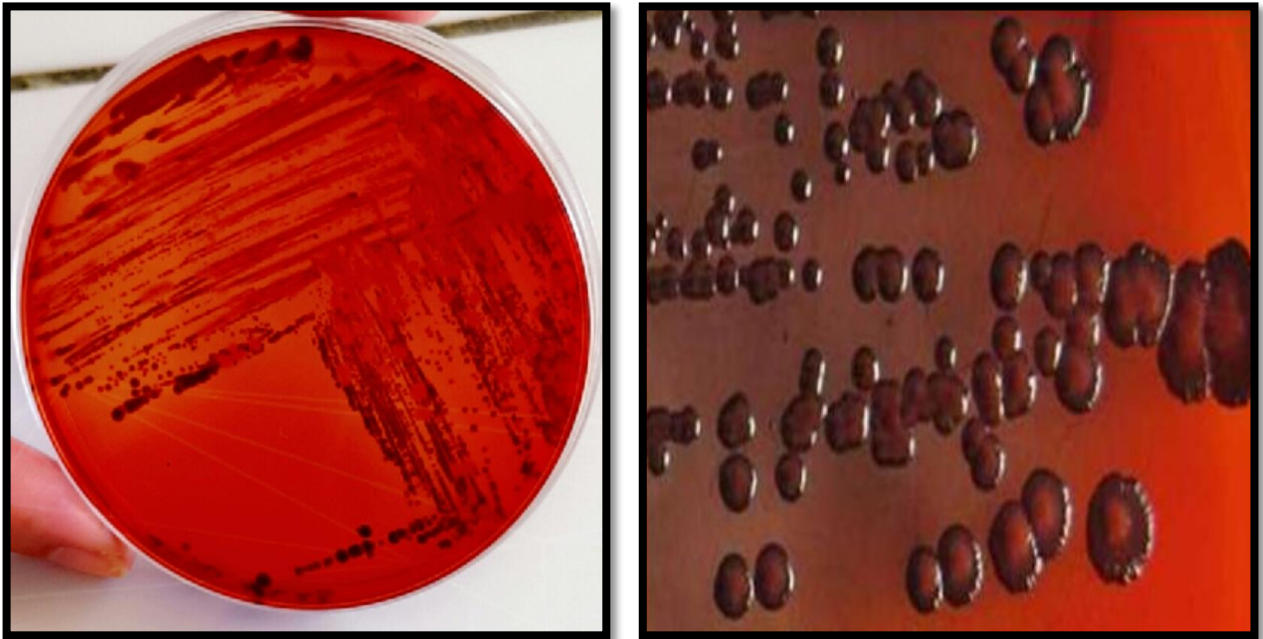


Figure 18 : Culture de *S.aureus* sur gélose Rouge Congo

Suite à ces techniques et selon plusieurs auteurs [(Mathur *et al.*, 2006) ;(Oli *et al.*,2012)], la méthode du Rouge Congo semble être moins efficace pour détecter la formation du biofilm *in vitro*. Taj *et al.*, (2012) ont montré que le dépistage par la technique du Rouge Congo n'est pas recommandé pour l'étude de la formation du biofilm.

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

5. Evaluation de la formation du biofilm *in vitro* (en mode dynamique)

L'incidence des infections liées aux cathéters augmente avec la durée du cathétérisme (Armstrong *et al.*, 1986). Certains auteurs préconisent le changement des lignes de perfusion toutes les 48 à 72 heures, ainsi qu'après toute perfusion du produit sanguin ou de solutés de nutrition parentérale (Elliott et Tebbs, 1998).

Il est également démontré que le risque infectieux augmente avec la durée d'implantation du cathéter (Nitenberg *et al.*,1996).

La seconde manière d'étudier la formation du biofilm, est le système dynamique en flux continu. Nous avons essayé de reproduire *in vitro* (au laboratoire), la réalisation d'une perfusion sur des cathéters en silicone stériles avec deux solutés différents très souvent utilisés en milieu hospitalier à savoir le sérum salé (NaCl 0.9%) et le sérum glucosé à 5%. Une fois les cathéters stériles retirés de

leur emballage, dans les conditions aseptiques seule la soupape ventilée de cathéter en silicone (partie qui, normalement est en contact avec la peau du malade) est contaminée par trempage dans la suspension bactérienne *S.aureus* 2 à une DO 0,1 réalisée à partir d'une culture de 18h en milieu BHIB (Figure10). Après un temps de 15 minutes, la surface externe de la « soupape » est aseptisée par un détergent (eau de javel) et un désinfectant (Figure11), celle-ci avec l'ensemble du cathéter est mise sur une potence (Figure 12) afin d'assurer le bon écoulement du soluté et d'avoir un flux continu et de simuler le cathétérisme.

Après la réalisation d'une reproduction des conditions d'utilisation de ces substrats en milieu hospitalier et d'une simulation d'une perfusion et d'un écoulement de goutte à goutte du sérum salé à 0.9% et du sérum Glucosé à 5%, le dispositif est géré pendant 48h et nécessitant pour cela trois flacons de 500 mL pour chaque dispositif. (Figure 13 et 14).

trois morceaux(1cm²) de la soupape ventilée et trois autres morceaux (1cm²) sur la longueur du cathéter à 10 cm,

75 cm et 140 cm du bout distal ont subi une sonication, et des dilutions afin de réaliser un dénombrement des bactéries adhérees.

Différentes dilutions sont réalisées dans un but de faire un dénombrement des souches adhérees.

5.1 Sérum salé à 0.9%

La figure 22 montre qu'il y a une très forte adhésion de *S.aureus* au niveau de soupape ventilée (6.24 log UFC/cm² morceau 1 de la soupape ventilée) l'adhésion diminue dans le bout distal jusqu'à l'annulation au niveau de 6 -ème morceau.

Cette adhésion pourrait être due au caractère halophile de *S aureus*, et/ou le NaCl 0.9% a favorisé la formation du biofilm.

Nos résultats concordent avec ceux de (Lim et al., 2004), ou l'utilisation de NaCl a favorisé la formation du biofilm de *S.aureus* .

De même, plusieurs auteurs ont montré que des concentrations sous-inhibitrices en antibiotiques ainsi que des concentrations importantes en NaCl augmentent la formation du biofilm. La présence de cations divalents tels que le calcium et le magnésium accroît la production de polysaccharides conduisant à une amplification de la formation des biofilms. [(Mempel et al., 1994); (Cramton et al., 2001); (Knobloch et al., 2001) ; (Chaieb et al., 2005)].

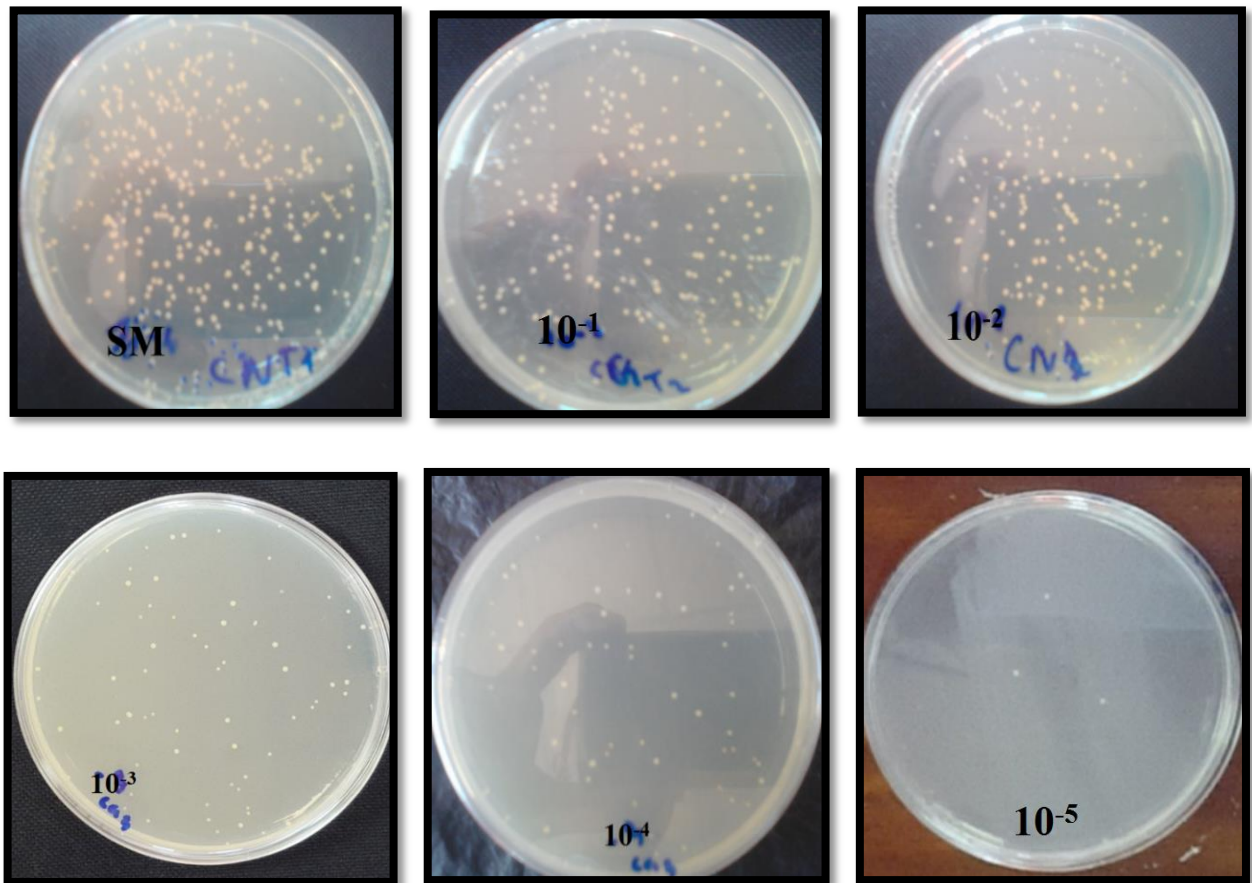


Figure 19 : Résultat du dénombrement des bactéries adhérees sur cathéters après 48h en présence du sérum salé à 0.9%

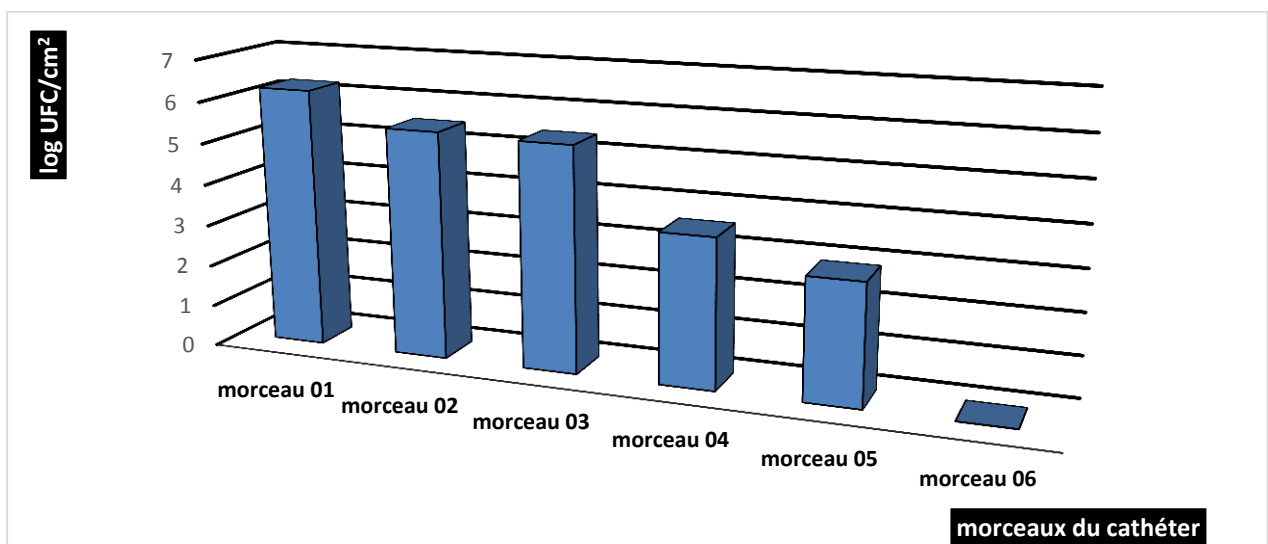


Figure 20 : Résultat de la formation du biofilm après 48h par *S. aureus* sur cathéter *in vitro* en présence du sérum salé à 0.9%

5.2 Sérum Glucosé à 05%

Les résultats obtenus (Figure 24) montrent une adhésion tout au long du cathéter avec une forte capacité de former le biofilm dans la soupape ventilée avec une charge de ($4.6 \log \text{UFC/cm}^2$).

Résultats et Discussion

Les études de **Rasha** et ses collaborateurs (2012) ainsi que celle d'**Agarwal et Jain** en (2013) ont montré une augmentation significative de la production du biofilm par des isolats cliniques de Staphylocoques lorsqu'ils sont exposés à de différentes concentrations du glucose.

De plus on a remarqué que même au niveau du 6^{em} morceau (140 cm du bout distale) la bactérie a pu croître et s'adhérer à cette distance avec un dénombrement de (2.6 log UFC/cm²). L'utilisation du sérum glucosé comme nutriment a sûrement favorise le développement et l'adhésion de la bactérie, ce qui lui a permis d'envahir tout le cathéter et d'atteindre 140 cm du bout distal en 48h.

Ces observations suggèrent une forte dépendance entre les conditions de croissance et la formation du biofilm chez les staphylocoques et que l'utilisation de diverses suppléments est essentielle à sa formation.

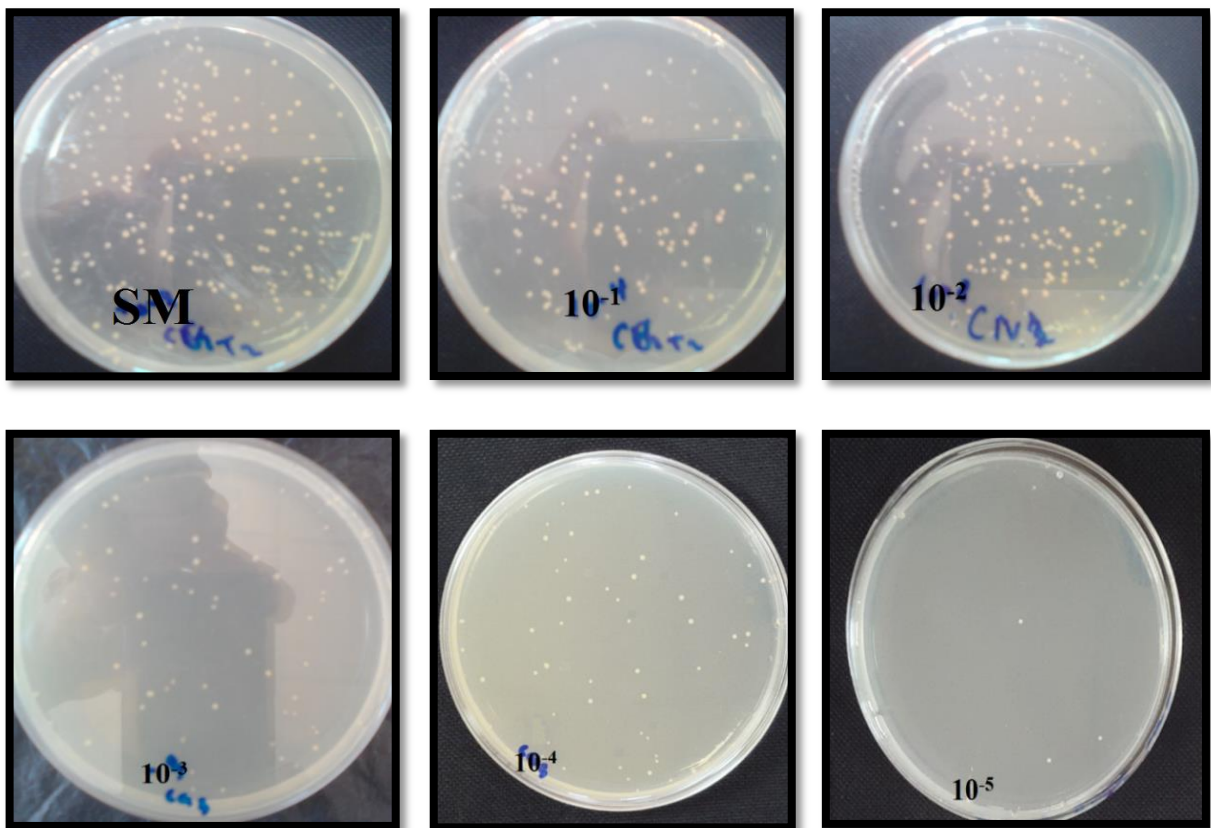


Figure 21 : Résultat du dénombrement des bactéries adhérees sur cathéter après 48h en présence du sérum Glucosé à 5%

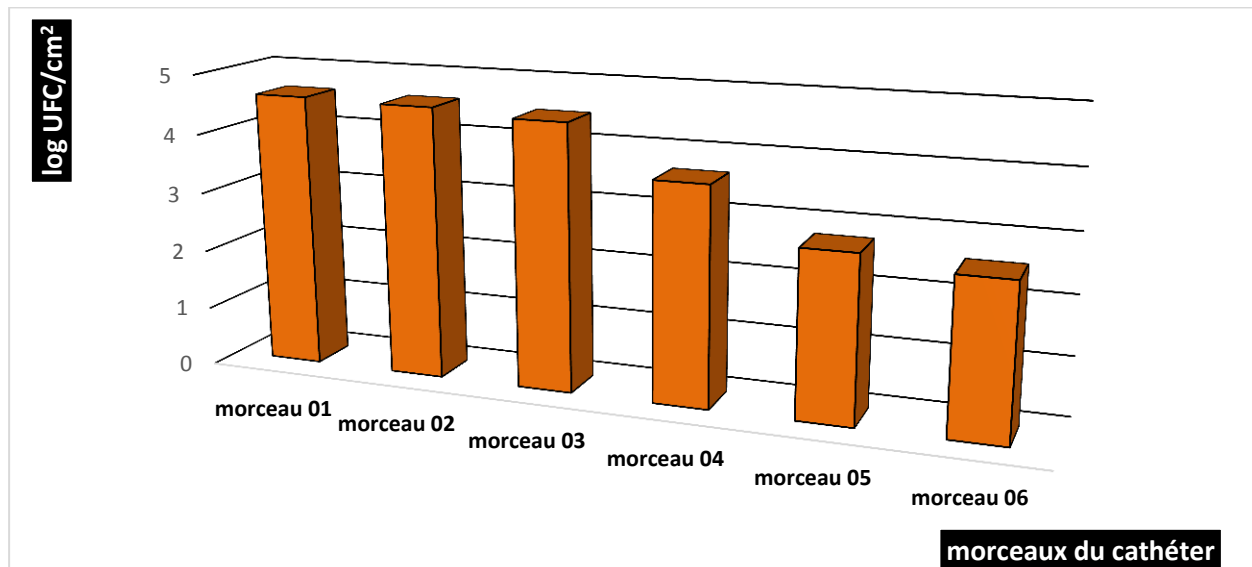


Figure 22 : Résultat de la formation du biofilm après 48h par *S. aureus* sur cathéter *in vitro* en présence du sérum Glucosé à 0.9%

6. Comparaison des résultats de la formation du biofilm en présence du sérum Glucose et salé

La figure 25 montre que l'adhésion par *S. aureus* en présence de NaCl ($3.9 \log \text{ UFC/cm}^2$) est supérieure à celle en présence de glucose ($3.8 \log \text{ UFC/cm}^2$).

En (2001), Cramton et collaborateurs ont montré qu'à des concentrations supérieures à 0.1% la production de PIA est inhibée ce qui influe sur la formation du biofilm. Ce qui peut expliquer la diminution de la formation du biofilm en présence du glucose avec une concentration de 0,5%.

Les résultats obtenus sont en accord avec les observations d'autres auteurs qui montrent que peu de souches sont formatrices des biofilms dans un milieu de croissance sans supplément (sucre, antibiotiques ou NaCl) [(Cho et al., 2002) ; (Johannes et al., 2002) ; (Mathur et al., 2006)].

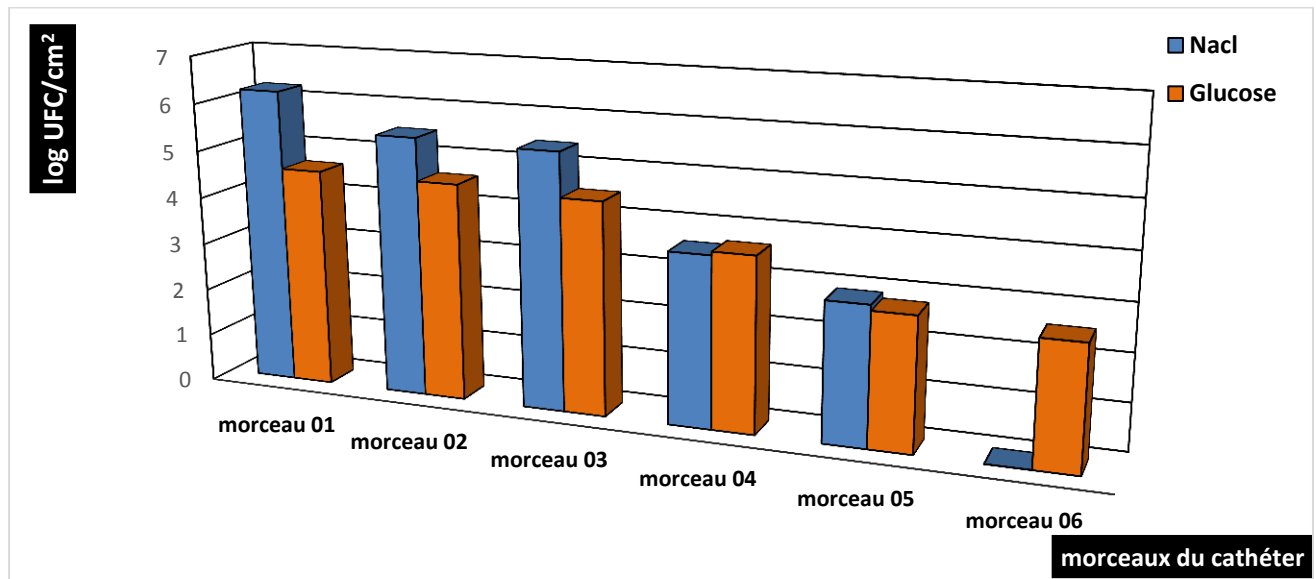


Figure 23 : Résultat de la formation du biofilm par *S. aureus* sur cathéter in vitro en présence du Glucose à 5% et NaCl 0.9% après 48h

7. Etude de l'effet du miel sur des souches de *staphylococcus aureus*

Plusieurs études ont confirmé la nature bactéricide des miels thérapeutiques contre de nombreuses espèces bactériennes, y compris les souches résistantes aux antibiotiques [(cooper et al., 2002) ;(kwakman et al., 2008)].

7.1 L'effet du miel en mode statique

Afin de confirmer l'effet du miel sur la formation du biofilm sur la soupape du cathéter, on a essayé de tester ce dernier à des concentrations différentes en mode statique.

Des morceaux du cathéter d'une surface de 1cm^2 contaminés par une charge de 10^7 de *S. aureus* incubés puis quantifiés :

- Deux morceaux ont été utilisé pour étudier l'adhésion des bactéries avec l'addition du miel (pur et dilué) avant formation du biofilm.
- Deux autres morceaux ont été contaminés et incubés à 37°C pendant 48h pour former un biofilm puis traités par du miel (pur et dilué) et incubés pendant 24h.
- Deux autres morceaux ont été contaminés et incubés à 37°C pendant 48h pour former le biofilm sans traitement pour la comparaison.

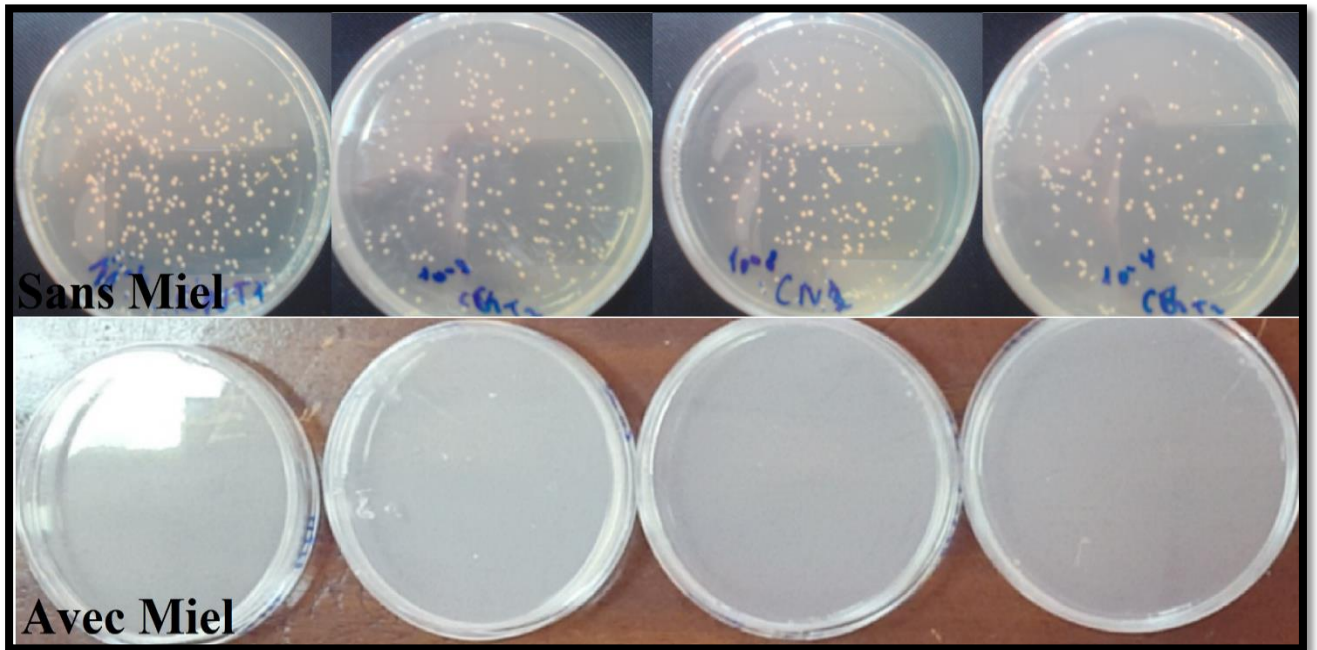


Figure 26 : Résultat du dénombrement en mode statique

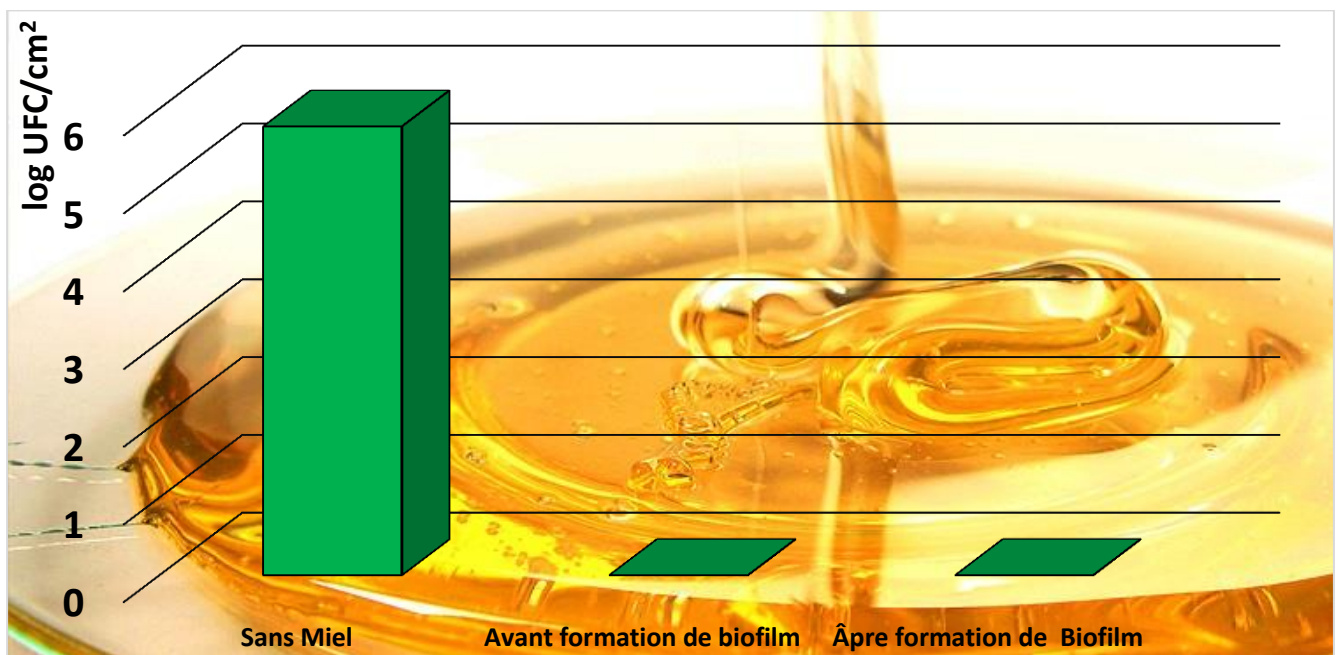


Figure 27 : les résultats d'inhibition de la formation du biofilm par le miel

Selon la figure 27, les résultats sont impressionnant, ou on constate que :

L'addition du miel dans la suspension bactérienne avant formation du biofilm a totalement inhibé l'adhésion des bactéries.

De même l'addition du miel après formation du biofilm a éliminé le biofilm et a stoppé l'adhésion de nouvelles cellules bactériennes.

Contrairement aux morceaux exempts de miel témoins où on a constaté une forte adhésion des bactéries dépassant (**5 log UFC/cm²**).

Le miel a donc présenté une forte activité antibactérienne puisque non seulement il a agi sur formation de biofilm en empêchant l'adhésion des cellules mais également comme un agent a activité anti-biofilm en éliminant ce dernier même après sa phase de maturation cad après 48h de sa formation

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Bissati** et collaborateurs en (**2014**) où ils ont testé l'effet antimicrobien de différents types du miels sur des souches cliniques résistants aux antibiotiques dont *S.aureus*, où ils ont trouvé par la technique de diffusion du miel sur gélose que le même miel a donné une zone de > **20** mm. Ce miel est considéré comme un miel efficace contre la forme planctonique de *S aureus*.

De même, nos résultats sont en accord avec ceux obtenu par **alandejani** et collaborateurs en (**2009**) qui ont travaillé sur effet du miel sur la forme planctonique et biofilm. Ils annoncent que le miel pur a été efficace pour tuer **100%** des isolats sous forme planctonique, mais que celui-ci était moins sensibles sur les bactéries en mode biofilm.

Alors qu'avec une concentration de **50%** il s'est révélé efficace pour éliminer **7** des **11** biofilms SASM avec un taux de **63%** et avec un taux de **73%** contre le biofilm de SARM, où il a éliminé **8** des **11** biofilm.

Cependant, même dilués les miels restent actifs face aux bactéries, ceci est dû à la production et à l'activation d'une glucose oxydase, qui a pour rôle d'oxyder le glucose en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est alors le composant principal responsable de l'activité antiseptique et antibactérienne du miel [(**Siess et al., 1996**) ;(**Brudzynski, 2006**)].

Certains chercheurs ont montré que cette activité du miel est due principalement à la présence des protéines défensines qui confèrent la majorité de l'activité antimicrobienne du miel. (**Kwakman et al., 2010**).

Le miel contient différents composants dont Le peroxyde d'hydrogène qui empêche les bactéries de se développer au sein du miel riche en eau l'activité du peroxyde d'hydrogène du miel peut être inhibée facilement par la chaleur ou par la présence d'une catalase. Pourtant on a pu constater que le miel conserve son activité antimicrobienne malgré la présence de cette catalase. Le miel persiste son activité grâce à d'autres constituants tels que le méthyl syringate ou le methylglyoxal (MGO), Selon la concentration en MGO qui peut aller de **3** à **4** µg par gramme de miel à **750** à **800** µg par

gramme. Une forte concentration ne semble pas nécessaire, on peut dire qu'à partir de 10µg par gramme de miel le MGO joue son rôle antibactérien (**Molan ,1992**) ;(**Kilty et al.,2011**).

Jervis-Bardy et Wormald ; en 2011 ont montré qu'à une concentration 530 µg/g de MGO le biofilm de *S aureus* est éradiqué.

CONCLUSION

Les infections bactériennes sont la cause majeure de la morbidité et de la mortalité en milieu hospitalier dont la majorité peut être due aux staphylocoques. L'importance médicale de ces espèces bactériennes est leur capacité à provoquer de nombreux types d'infections chez l'homme et à persister à la surface de dispositifs médicaux. Ces infections aggravées, dues au développement du biofilms à staphylocoques constituent actuellement un vrai problème de santé publique. La capacité de *staphylococcus aureus* à former du biofilm est reconnue comme étant un important facteur de virulence, Le rôle pathogène des biofilms est maintenant bien établi dans les associés aux dispositifs médicaux.

Sur l'ensemble des cathéters veineux périphériques récoltés, 50% présentaient une infection avec un total de 4 souches de *Staphylococcus aureus*.

La surveillance des dispositifs invasifs et de leurs infections reste un objectif prioritaire des services à grand risque afin de croire la crédibilité de la structure hospitalière et de diminuer les infections nosocomiales.

La majorité de souches isolées présentent une résistance élevée vis-à-vis la plupart des antibiotiques testés. Sur l'ensemble des isolats deux souches étaient des SARM.

L'évaluation de la formation du biofilm par la technique TCP a révélé que 80% des souches de *Staphylococcus aureus* isolées sont des bonnes formatrices du biofilm,

La seconde manière d'étudier la formation du biofilm, est le système dynamique en flux continu. Ce dernier a montré que l'adhésion par *S. aureus* en présence du sérum salé est supérieure à celle en présence du glucose. Nos résultats suggèrent une forte dépendance entre les conditions de croissance et la formation du biofilm chez *S.aureus*.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'effet du miel sur la formation du biofilm de cette souche pathogène.

Le miel à des dilutions de **50%** p/v a complètement éliminé le biofilm de *S aureus* sur les morceaux du cathéter (mode statique).

Le miel testé était efficace contre des souche clinique SARM et multirésistante isolée à d'un cathéter chez un patient hospitalise au service de réanimation chu de Tlemcen, effectivement le miel confirme l'expression qui dit : là où les antibiotiques échouent le miel fait des miracles.

Compte tenu de nos résultats, des précautions visant à maîtriser la dissémination et la formation du biofilm chez les souches de *S.aureus* doivent être entreprises par le service de réanimation de notre structure hospitalière. Ces précautions incluent un respect strict des règles d'hygiène des mains, une application infaillible de procédures de désinfection des équipements hospitaliers, la prescription réfléchie des antibiotiques, ainsi que la surveillance continue de la résistance de ces souches aux

antibiotiques afin d'optimiser le traitement des infections dues à cette bactérie. La réduction de la durée d'implantation du cathétérisme constitue l'étape clé dans la maîtrise de la formation du biofilm et par conséquent les infections qui lui sont liées.

En perspectives de ce travail, il serait intéressant de pouvoir approfondir nos recherches sur l'effet du miel sur d'autres espèces pathogènes responsables de formation de biofilm et des infections liées aux soins.

RÉFÉRENCE
BIBLIOGRAPHIQUE

A

1. **Agarwal A., Jain, A. (2013).** Glucose & sodium chloride induced biofilm production & ica operon in clinical isolates of staphylococci. *Indian Journal of Medical Research*, 138(2), 262.
2. **Aïssata C.O.T. (2007).** Thèse de doctorat. Les infections nosocomiales liées aux cathéters veineux centraux et périphériques dans le service de néphrologie et d'hémodialyse du CHU du point G Mali. P 28.
3. **Al alam D. (2008).** Thèse de doctorat. Impacte de l'interaction entre les cellules epithéliale bronchique et staphylococcus aureus sur le chimiotactisme des lymphocytes T dans la mucovisidose. Université de REIMS Champagne Ardenne UFR de Pharmacie.185P.
4. **Alandejani T., Marsan J., Ferris W., Slinger R., & Chan F. (2009).** Effectiveness of honey on Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Otolaryngology--Head and Neck Surgery*, 141(1), 114-118.
5. **Annous B., Fratamico P., and Smith J. L. (2009).** Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do, *Journal of Food Science*, Vol. 74 No. 1, pp. 24–37.
6. **Archer G. L. (1998).** *Staphylococcus aureus: A Well-Armed Pathogen. Clinical Infectious Diseases*; 26:1179-1181.
7. **Armstrong C.W., Mayhali G., Miller K.B. (1986).** Prospective study of catheter replacement, and other risk factors for infection of hyper alimentation catheters. *Journal Infectious Diseases*; 154: 808-816.
8. **Aulagner G., Demoré B. (2007).** Dispositifs médicaux stériles. *Travaux dirigés de 5ème année officine, année, 2008*, p46-52.

B

9. **Bessas A., Benmoussa L., Kerarma M. (2008).** Dosage biochimique des polyphénols dans les dattes et le miel récoltés dans le sud algérien. Mémoire d'ingénieur en Biologie. Université Djillali Liabes -Sidi Bel Abbes, p.45.
10. **Batard E., El Kouri D., Potel G. (2007).** Infections à staphylocoques: aspects cliniques et bactériologiques. *EMC Maladies Infectieuses. Paris: Elsevier*, 1-8.
11. **Behlou I., Gilmore M. S.(2008).** Microbiol biofilms in ophthalmologie and infectious diseases. *Arch Ophthalmol* 126,1572-1581.
12. **Beloin C., Roux A., Ghigo J. M. (2008).** Escherichia coli biofilms. In *Bacterial Biofilms* (pp. 249-289). Springer Berlin Heidelberg.

13. **Belkum A. V., Melles D. C., Peeters J. K., Van Leeuwen W. B., Duijkeren E. V., Huijsdens X. W., Verbrugh H. A. (2008).** Methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in pigs and humans. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 14, No. 3.
14. **Bernard L. (2006).** Mécanismes physiopathologiques des infections orthopédiques. *Revue du rhumatisme*. **73**: 327-331.
15. **Bien J., Sokolova O., Bozko P. (2011).** Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus*: novel function of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response. *Journal of pathogens*.
16. **Bissati S., Laallam H., Boughediri L., Hammoudi R. (2014).** Activite Bacteriostatique des Miels du Sud Algerien. *Revue des Bioressources*, 4(1), 68-74.
17. **Boudelal, K. (2013).** Mémoire Master. Evaluation de la Contamination des Dispositifs Médicaux (Cathéters et Sondes) à l'hôpital de Ain_Témouchentj p10-55.
18. **Brudzynski K. (2006).** Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys, *Canadian journal of microbiology*.52: 1228-1237.
19. **Brun-Buisson C., Abrouk F., Legrand P., Huet Y., Larabi S., Rapin M. (1987).** Diagnosis of central venous catheter-related sepsis. Critical level of quantitative tip cultures. *Archives of Internal Medicine*.147: 873-7 .
20. **Brun-Buisson C., Bonmarchand G., Carlet J., Chastre J., Durocher A., Fagon J.Y. (2005).** et al. Risques et maîtrise des infections nosocomiales en réanimation : texte d'orientation SRLF/SFAR. *Réanimation*. 2005;**14**:463-71.
21. **Brun-Buisson C., Parienti J. J. (2013).** Infections de cathéters intravasculaires en réanimation. In *Infectiologie en réanimation* (pp. 423-439). Springer Paris.
22. **Burke F. M., McComack N., Rindi S., Speziale P., et Foster T. J. (2010).** Fibronectin-binding protein B variation in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology*. **10**: 160-175.

C

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

24. **Chaieb K., Mahdouania K., Bakhrouf A. (2005).** Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. *Journal of Hospital Infection* 61: 225-230.
25. **Cheung A. L. (2001).** Global regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. In *Staphylococcus aureus Infection and Disease* (pp. 295-322). Springer US.
26. **Chibi A. (2015).** Thèse de doctorat. Evaluation de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* isolées de CHU Tlemcen. 79p.
27. **Cho S., Naber K., Hacker J., Ziebuhr W. (2002).** Detection of the *ica* ADBC gene cluster and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from catheter-related urinary tract infections. *International Journal of Antimicrobial Agent*. 19:570-575.
28. **Charbonneau P., Wolff M. (2013).** *Infectiologie en réanimation*. Springer Science & Business Media.
29. **Christensen GD., Simpson WA., Younger JA., Baddour LM., Barrett FF., Melton DM. (1985).** Adherence of coagulase negative Staphylococci to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*. 22:996-1006.
30. **Cooper R. A., Halas E., Molan P. C. (2002).** The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *Journal of Burn Care & Research*, 23(6), 366-370.
31. **Corne P. (2004).** Thèse de doctorat. *Staphylococcus aureus* dans un service de réanimation: étude génétique, phénotypique et épidémiologique. Montpellier: université Montpellier I U.F.R. de médecine.
32. **Couture B. (1990).** Bactériologie médicale «Etude et méthodes d'identification des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical». Vigot, Paris. 15-32.
33. **Corrigan R. M., Rigby D., Hadley P., Foster T. J. 2007.** The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiology*. **153**: 2435-2446.
34. **Costerton J. W., Geesey G. G., Cheng K. J. (1978).** How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1), 86-95.
35. **Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**:1318-22.
36. **Cramton S.E., Ulrich M., Gotz F. (2001).** Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infection Immunology*. 69:4079-4085.

37. Cucarella C., Solano C., Valle J., Amorena B., Lasa I., Penades J.R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*. **183**: 2888- 2896.

D

38. Dasgupta N., Arora S. K., Ramphal R. (2000). fleN, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 182(2), 357-364.
39. Dinges M. M., Orwin P .M., et Schlievert P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology reviews*. **13**: 16-34.
40. Donlan R. M. (2002), Biofilms: Microbial life on surfaces, *Emerging Infectious Diseases*. **8** (9).
41. Dunne W.M. Jr. (2002). Bacterial adhesion : seen any good biofilms lately. *Clinical Microbiology reviews*. **15** (2): 155-166.

E

42. El Kouri D., Pottier M. A., Trewick D., Le Gallou F., Baron D., Potel G. (1998). Infections à staphylocoques: aspects cliniques et bactériologiques. *Encycl Méd Chir Mal Infect*, 8, 1-10.
43. Elliott J., Tebbs E. (1998). Prevention of central venous catheter-related infection. *Journal of hospital infection*; 40: 193-201.
44. Espinasse F., Page B., Cottard-Boulle B. (2010). Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Revue francophone des laboratoires*, 2010(426), 51-63.

F

45. Francolini I., Donelli G., (2010). Prevention and control of biofilm based medical-device-related infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*.59(3):227–238.
46. Folkesson A., Haagensen J. A. J., Zampaloni C., Sternberg C., Molin S. (2008). Biofilm induced tolerance towards antimicrobial peptides, *Public Library of Science*, Vol.3 No. 4, pp. 1-11.
47. Foster T. J., Höök M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*. **6**: 484-488.
48. Foster T.J. (2004). The *Staphylococcus aureus* "superbug". *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 114, No. 12, p. 1693-1695.
49. Freeman D.J., Falkiner FR., Keane CT. (1989). New method of detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*. 42: 87-84.

H

- 50. Hamidou M, Belizna C (2003).** Superantigènes et vascularites primitives. *Annales de médecine interne (Paris)*; **154**:96-100.
- 51. Harris L. G., Richards R. G. (2006).** Staphylococci and implants surfaces: a review. *Injury* .**37**: S3-S14.
- 52. Hennekinne J. A. (2009).** Thèse de doctorat. Nouvelles approches pour la caractérisation des toxi-infections alimentaires à staphylocoques à coagulase positive (Doctoral dissertation, Thèse, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Paris, France).

J

- 53. Jacobsen S.M., Stickler D.J., Mobley M.L., shitiliff M.E. (2008).** Complicated Catheterassociated urinary tract infectious due to Echerichia coli and Proteus mirabilis. *Clinical microbiology reviews*. **21**,26-59.
- 54. Jain A., Agarwal A. (2009).** Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *Journal of Microbiology and Methods*. 76: 88–92.
- 55. Jefferson K.K. (2004).** What drives bacteria to produce a biofilm?. *FEMS microbiology letters*.**236**(2):163–173.
- 56. Jervis-Bardy J., Wormald PJ. (2011).** Microbiological outcomes following mupirocin nasal washes for symptomatic, *Staphylococcus aureus*–positive chronic rhinosinusitis following endoscopic sinus surgery. *International forum of allergy & rhinology*.;2:111–115.
- 57. Johannes K.M., Knobloch M.A., Horstkotte H., Dietrich M. (2002).** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology*. 191: 101–106.

K

- 58. Kaplan J. B., (2010),** Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses, *Journal of Dental Research*, **89** (3): 205-215.

- 59. KARA TERKI I. (2014).** Thèse de doctorat. Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen.132p.
- 60. Kayser F. H., Bienz K. A., Eckert J., Zingernagel R. M. (Eds.). (2001).** *Medical Microbiology* (10th ed.). Stuttgart, Germany : Georg Thieme Verlag.
- 61. Kilty, S. J., Duval, M., Chan, F. T., Ferris, W., & Slinger, R. (2011).** Methylglyoxal:(active agent of manuka honey) in vitro activity against bacterial biofilms. In *International forum of allergy & rhinology* (Vol. 1, No. 5, pp. 348-350). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.
- 62. Kloos W.E., Veron M. (1990).** Bactériologie Médicale «*Staphylococcus* et *Micrococcus*» J.Fleurette 2ème édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 773-794.
- 63. Knobloch J.K ., Bartscht K ., Sabottke A ., Rohde H ., Feucht H.H ., Mack D. (2001).** Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the sigB operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *Journal of Bacteriology*. **183**: 2624-2633.
- 64. Kurlenda J., Grinholc M. (2012).** Alternative therapies in *Staphylococcus aureus* diseases. *Acta Biochimica Polonica*. **59**:171-184.
- 65. Kwakman P. H., Van den Akker J. P., Güçlü A., Aslami H., Binnekade J. M., de Boer L., Vandenbroucke-Grauls C. M. (2008).** Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria in vitro and eradicates skin colonization. *Clinical Infectious Diseases*, *46*(11), 1677-1682.
- 66. Kwakman P. H ., te Velde A. A., de Boer L., Speijer D., Vandenbroucke-Grauls C. M., Zaat S. A. (2010).** How honey kills bacteria. *The FASEB Journal*, *24*(7), 2576-2582.

L

- 67. Lebeaux D., Ghigo J.M (2012).** Management of biofilm-associated infections: what can we expect from recent research on biofilm lifestyles? *médecine/sciences*, (Paris) **28**:727–39.
- 68. Lebeaux D., Ghigo J.M., Beloin C. (2014).** Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **78**:510–43.
- 69. Lebeaux,d . Lucet, J-C . Barbier, F.S.(2016).** Nouvelles recommandations pour les infections associées au biofilm : implications en réanimation. *Réanimation* **25**:308-317.

- 70. Liesse Iyamba J M. (2012).** Thèse de doctorat. Etude de l'interaction des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* avec une surface abiotique. Thèse de doctorat : Université libre de Bruxelles, Faculté de Pharmacie, Ecole Doctorale en Sciences Pharmaceutiques. 226p.
- 71. Lim Y., Jana M., Luong T.T., Lee C.Y. (2004).** Control of glucose-and NaCl-induced biofilm formation by rbf in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*. 186 : 722-729.

M

- 72. Mack D., Nedelmann M., Krokotsch A., Schwarzkopf A., Heesemann J. Laufs R.(1994).** Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infection and immunity*.62, 3244-3253.
- 73. Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay DJ., Fatma T., Rattan A. (2006).** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: An evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology* .24 (1):25-9.
- 74. Martí S., Rodríguez-Baño J., Catel-Ferreira M., Jouenne T., Vila J., Seifert H., Dé E. (2011).** Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter species*. *BMC research notes*. 4: 5.
- 75. Mempel M . Feucht H. Ziebuhr W. Endres M. Laufs R. Gruter L .(1994).** Lack of *mecA* transcription in slime-negative phase variants of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 38:1251-1255.
- 76. Mermel L. A., Allon M., Bouza E., Craven D .E., Flynn P., O'Grady N., Raad I. I., Rijnders B., Sherertz R. J., Warren D.(2009)** Clinical Practice - Guidelines for the Diagnosis and Management of Intravascular Catheter-Related Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 49:1-45.
- 77. Mermel, LA. (2011).** What is the predominant source of intravascular catheter infections? *Clinical Infectious Diseases*. **52**(2):211–212.
- 78. Mimos O., Rayeh F., Debaene, B. (2001).** Infections liées aux cathéters veineux en réanimation. Physiopathologie, diagnostic, traitement et prévention. In *Annales francaises d'anesthésie et de réanimation* (Vol. 20, No. 6, pp. 520-536). Elsevier Masson.
- 79. Molan P.C. (1992).** The antibacterial activity of honey. 1. The nature of antibacterial activity. *Bee World* 73: 5-28.

N

- 80. Nasr SA., AbuShady H M., Hussein HS. (2012).** Biofilm formation and presence of *ica* AD gene in clinical isolates of staphylococci. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 1110-8630.
- 81. Nitenberg G., Bussy C., Lherm T., Leclercq B. (1996).** Les infections nosocomiales liées aux cathéters veineux centraux: prévention et conduite à tenir en cas de suspicion d'infection. *HygièneS*, 13, 31-8.
- 82. Njall C., Adiogo D., Bitá A., Ateba N., Sume G., Kollo B. (2013).** Écologie bactérienne de l'infection nosocomiale au service de réanimation de l'hôpital Laquintinie de Douala, Cameroun. *The Pan African Medical Journal*. 2013; **14**:140.

O

- 83. O'Toole G. A., Kaplan H. B., Kolter R. (2000).** Biofilm formation as microbial development. *The Annual Review of Microbiology*. 54: 49- 79.
- 84. Oli A. K., Raju S., Nagaveni S., Kelmani Chandrakanth R. (2012).** Biofilm formation by Multidrug resistant *Enterococcus faecalis* (MDEF) originated from clinical samples. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 2(2).
- 85. Otto M. (2004).** Quorum-sensing control in *Staphylococci* a target for antimicrobial drug therapy? *Microbioly Letter*. 241, 135-141.
- 86. Otto M. (2008)** .Staphylococcal biofilms. *Microbiology and immunology*.322: 207-228.
- 87. Otto, M. (2012).** MRSA virulence and spread. *Cellular microbiology*. **14**: 1513-1521.

P

- 88. Parker M. W., Feil S. C.** Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2005; **88**:91-142.
- 89. Planchon S. (2006).** Thèse de doctorat. Aptitude de *Staphylococcus carnosus* et *Staphylococcus xylosus* à former des biofilms. Etude d'une souche "biofilm-positif" par une approche protéomique. Université Baise Pascal, école doctorales sciences de la vie et de la santé .237P.

- 90. Peters G., Locci R., Pulverer G. (1982).** Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *Journal of Infeciology and Disease*. 146: 479-482.
- 91. Pourreau A. (2008)** .Thèse de doctorat. Analyse systémique des risques liés aux cathéters veineux centraux en service de réanimation (Doctoral dissertation, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne).

R

- 92. Racha A. N., Abu Shady H.M., Hussein H.S. (2012).**Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. *Egyptian Journal of Medica. Human and Genetic* .13: 269–274.
- 93. RAISIN.(2008).** Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales. Surveillance des bactériémies nosocomiales en France. Résultats 2004. www.invs.sante.fr.
- 94. Réseau Réa-RAISIN.2007.** Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte. France, résultats 2007. INVS, 2009:60 .
- 95. REBIAHI S. A. (2012).** Thèse de doctorat. Caractérisation de souches de *Staphylococcus aureus* et étude de leur antibioresistance au niveau du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen.158p.

S

- 96. Saitou K., Furuhashi K., Kawakami Y., Fukuyama M. (2009).** Biofilm formation abilities and disinfectant resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cockroaches captured in hospitals. *Biocontrol Science*. 14: 65-68.
- 97. Sauer K., Camper A.K., Eherlich G.D., Costerton J.W., Davies D.G. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology*, **184**, 1140-1154.
- 98. Sauer K., Cullen M.C., Rickard A.H., Zeef L.A.H., Davies D.G., Gilbert P. (2004).** Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm. *Journal of bacteriology*, **186**: 7312–7326.
- 99. Siess M.H., Le bon AM., Canivenc- lavier M.C., Amiot M.J., Sabatier S., Aubert S.Y., Suschetet M. (1996).** Flavonoids of Honey and Propolis, Characterization and effects on

hepatic drug-metabolizing enzymes and benzo[a]pyrene-DNA binding in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 2297–2301.

- 100. Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B.S., Vabic-Vlahovic M. (2000).** A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 40: 175–179.
- 101. Sung L. M. J., Lloyd H. D., Lindsay A.J. (2008).** *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. *Microbiology*, 154: 1949-1959.

T

- 102. Taj Y., Essa F., Aziz F., Kazmi S. U. (2012).** Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of infection in developing countries*. 6(5).
- 103. Tenke P., Kovacs B., Jackel M., Nagy E. (2006).** The role of biofilm infection in urology. *World journal of urology*. 24,13-20.
- 104. Togo A., Coulibaly Y., Keita M., Traore A., Kante L., Diakite I., Diallo G. (2009).** Infections nosocomiales en chirurgie pédiatrique au Mali. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, 22(6), 273-277.

V

- 105. Vallet I., Olson J. W., Lory S., Lazdunski A., Filloux A., (2001),** The chaperone usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gen clusters (cup) and their involvement in biofilm formation, *Processing of the National Academy of Science of USA*, **98** (12), 6911–6916.
- 106. Veyssier P., Domart Y., Liebbe A.M. (1998).** Infections nosocomiales. 2e Edt. Masson.p.75-77, 80-81.
- 107. Vincenot F., Saleh M., Prévost G.(2008).** Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Revue francophone des laboratoires*,**407**:61-69.
- 108. von Eiff C., Jansen B., Kohnen W.,Becker K. (2005).** Infections associated with medical devices. Pathogenesis, management and prophylaxis. *Drugs* **65**: 179-214.
- 109. Vu B., Chen M., Crawford R. J., and Ivanova E. P. (2009),** —Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation, *Molecules*, Vol. **14** No. 7, pp. 2535-2554.

W

110. **Widmer AF. (2005).** Infections and sepsis from intravascular catheters. *Der Internist.* **46**(6):643–651.
111. **Willcox, M. D. (2007).** *Pseudomonas aeruginosa* infection and inflammation during contact lens wear : a review. *Optometry and Vision Science : Official Publication of the American Academy of Optometry*, **84**(4), 273-278. doi : 10.1097/OPX.0b013e3180439c3e.

Z

112. **Zhang L., Gowardman J., Rickard C. M. (2011).** Impact of microbial attachment on intravascular catheter-related infections. *International journal of antimicrobial agents.* **38**(1):9–15.
113. **Zhang I., Morrison M., Nimmo G.R., Sriprakash K.S., Mondot S., Gowardman J.R., George N., Marsh N., Rickard C.M. (2013).** Molecular investigation of bacterial communities on the inner and outer surfaces of peripheral venous catheters. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases.* **32**:1083–1090.
114. **Ziebuhr W., Lobner I., Krimmer V., Hacker J. (2001).** Methods to detect and analyse phenotypic variation in biofilm-forming. *Methods in Enzymology.* **336**: 195-203.
115. **Zobell C. E. (1943).** The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of bacteriology*, **46**(1), 39.

ANNEXES

1. Milieux de culture

1.1 Milieux de culture liquides

➤ Bouillon coeur cervelle (BHIB)

Composition :

Infusion de cervelle de veau.....	12.5g
Infusion de coeur de boeuf.....	05g
Peptone.....	10g
Glucose.....	02g
Chlorure de sodium.....	02g
Phosphatase di sodique.....	05g

pH= 7.4

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

➤ Bouillon nutritif (BN)

1.2 Milieux de culture solides

- **Le milieu de Chapman** : est un milieu sélectif, surtout, permettant la croissance des germes halophiles, La forte concentration en chlorure de sodium inhibe la croissance de la plupart des bactéries autres que les staphylocoques (**BIO-RAD ,2007**).

Composition:

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

Extrait de viande (bovin ou porcin).....	01g
Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin).....	10g
Chlorure de sodium.....	75g
Mannitol.....	10g
Agar.....	15g
Rouge de phénol.....	0,025g

pH=7,6

- **Gélose nutritive** : pour la conservation des souches à courte terme et faire le dénombrement sur boites de pétrie.

Composition :

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	05g
Chlorure de sodium.....	05g
Agar.....	10g

pH=7.3

Préparation : 28g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C, 20min

2. Tableaux

Tableau 01 : Résultat de dénombrement en présence du sérum salé à 0.9% après 48h

Dilution	SM	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Morceau 01	+300(IND)	+300(IND)	+300(IND)	81	72	43
Morceau 02	+300(IND)	+300(IND)	224	43	36	32
Morceau 03	+300(IND)	+300(IND)	94	83	65	45
Morceau 04	275	70	55	52	28(IND)	19(IND)
Morceau 05	80	19(IND)	09(IND)	03(IND)	0	0
Morceau 06	28(IND)	18(IND)	12(IND)	04(IND)	0	0

Tableau 02 : Résultat de dénombrement en présence du sérum Glucose à 05% après 48h

Dilution	SM	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Morceau 01	+300(IND)	196	144	58	57	17(IND)
Morceau 02	+300(IND)	182	131	63	44	27(IND)
Morceau 03	+300(IND)	137	105	57	34	12(IND)
Morceau 04	200	155	102	50	23(IND)	4(IND)
Morceau 05	61	20(IND)	14(IND)	13(IND)	0(IND)	0(IND)
Morceau 06	39	12(IND)	8(IND)	3(IND)	0(IND)	0(IND)

Tableau 03 : Résultat de dénombrement d'un cathéter imprégné de miel en présence du sérum Glucose à 05% après 48h

Dilution	SM	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Morceau 01	172	58	0	0	0	0
Morceau 02	43	32	0	0	0	0
Morceau 03	42	30	0	0	0	0
Morceau 04	52	0	0	0	0	0
Morceau 05	0	0	0	0	0	0
Morceau 06	0	0	0	0	0	0

Tableau 04 : Résultat de dénombrement d'un cathéter imprégné de miel en présence du sérum salé 0.9% après 48h

Dilution	SM	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Morceau 01	236	150	63	07	0	0
Morceau 02	202	56	32	03	0	0
Morceau 03	66	18	0	0	0	0
Morceau 04	0	0	0	0	0	0
Morceau 05	0	0	0	0	0	0
Morceau 06	0	0	0	0	0	0

Les résultats d'inhibition de la formation de biofilm par le miel

Tableau 01 : Sans Miel

Dilution	SM	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Morceau 01	+300(IND)	+300(IND)	273	177	98	45
Morceau 02	+300(IND)	+300(IND)	289	178	120	69

Tableau 02 : Avant formation de biofilm

Dilution	SM	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Morceau 01	0	0	0	0	0	0
Morceau 02	0	0	0	0	0	0

Tableau 02 : Après formation de biofilm

Dilution	SM	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Morceau 01	13	7	0	0	0	0
Morceau 02	22	11	3	0	0	0