

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



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMEN
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE 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 de MASTER

Présenté par :

ACHOUI Meriem
DICH Hakima

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie
Option : Microbiologie fondamentale

**Etude de quelques paramètres influençant la formation de
biofilm *in vitro* de souches bactériennes**

Soutenue le : 04/07/2019

Devant le jury :

Boublenza L.	Maître de Conférences A	Président	Université de Tlemcen
Bellifa S.	Maître de Conférences B	Examinatrice	Université de Tlemcen
Hassaine H.	Professeur	Encadreur	Université d Tlemcen
Gaouar S.	Doctorante	Invitée	Université de Tlemcen

Année Universitaire : 2018-2019

Remerciements

Remerciements

«Nous tenons à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail ».

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement « **LAMAABE** » de l'Université Abou Bekr Belkaid sous la direction du Madame Hassaine Hafida Professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers, Université AbouBekr Belkaid- Tlemcen.

Nous tenons particulièrement à remercier notre directrice de mémoire Professeur **Hassaine Hafida**, à la faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers, Université AbouBekr Belkaid- Tlemcen, pour nous avoir guider dans le chemin extraordinaire de la recherche, nous vous remercions Pour votre simplicité, votre spontanéité, votre disponibilité, votre rigueur scientifique en plus de vos compétences scientifiques et vos qualités humaines qui ont fait de ce laboratoire un environnement de travail. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance et de notre respect.

Nous adressons nos sincères remerciements à la doctorante **Gaouar Sara** pour sa gentillesse, son rire communicatif, ses pertinents conseils et les efforts qu'elle a consentie durant la réalisation de ce mémoire. Merci de nous avoir permis de découvrir le monde de la recherche à vos côtés. Qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance et respectueuse gratitude.

Nos plus vifs remerciements vont aux membres du jury qui ont accepté de lire et juger ce travail :

Madame **Boublenza Lamia** pour l'honneur qu'elle nous fait a présidé le jury de ce mémoire. Veuillez trouver ici nos sincères remerciements.

Madame **Bellifa Samia** c'est un grand plaisir pour nous de vous avoir comme membre de jury, merci pour votre présence et vos encouragements. Qu'elle trouve ici notre profonde gratitude.

Nous aimerons également exprimer notre gratitude à tous nos professeurs de graduation de l'université de AbouBekr Belkaid- Tlemcen, un grand merci pour vos enseignements que dieu vous bénisse et vous donne la santé.

Nous exprimons nous profonde gratitude envers nos collègues de laboratoire, tous ceux qui ont eu la chance de travailler et passer des moments extra-ordinaire dans ce laboratoire.

Nous tenons à remercier également les membres du laboratoire de **LAAMABE** et toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à ce travail.

Dédicaces

DÉDICACES

Je dédie le fruit de ce modeste travail comme un geste de gratitude à :

Mes chers parents

qui ne cessent de me donner avec amour le nécessaire pour qu'arriver à ce que je suis aujourd'hui.

Que dieux vous protège et que la réussite soit toujours à ma portée pour vous combler de bonheur.

Mes grands-parents

Ahmed et Rachida

Fathi et Chomicha

Mes beaux frères : **Amine et Abederahmane**

A ma belle sœurs : **Assia** .

Aux familles **BENOSMAN** et **ACHOU**

A Tous mes cousins et cousines

**Bouchera, Icherak , Sanaa , Imene , Amina , Zineb , Sara , Nassima , Houda, Hicham ,
Rabie et Mohmammed.**

A Tous mes collègues et surtout a mes chersbamis (es)

Rachid, Zaki, Wissem.

Un grand remerciement a **Rachid Bouhadjeb** qu'il ma vraiment aidé tout au lang de mon cursus universitaire et surtout au moment de la préparation de cet manuscrit.

A mon binôme **Hakima**

qui a partagé avec moi les moments difficiles et Joyeux lors de la

Préparation de Mémoire de Master

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet .

Je vous dis **Merci**

MERIE

Je dédie ce travail à...

A la mémoire de mon père, qui nous a quitté, a qui je dis merci **Papa** pour tous tes sacrifices,
malheureusement je ne pourrai partager avec toi la joie
de mon succès mais je suis certaine que tu aurais été fière de moi.

Que dieu le tout puissant t'accueille dans son vaste paradis.

Ma très chère MAMAN

Symbole de tendresse et qui m'ai la plus chère au monde, qui s'est sacrifiée pour mon
bonheur et ma réussite, qui a toujours été là pour moi, qui m'a et soutenue par ses précieux
conseils et surtout par son grand amour. Que Dieu te bénisse et te donne santé et longue vie
in chaa ALLAH.

A mes chers frères et chères sœurs

Mohamed, Aboubakr, Amina, Nouria, Haouria, Assia

qui m'ont soutenus dans les moments les plus difficiles, je vous remercie d'être toujours
là pour moi. Rien ne saurait exprimer tous les sentiments que je vous porte. Que dieu vous
garde pour moi, je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur et de réussite.

A mon binome **Meriem**

Qui a partagé avec moi les moments difficiles et joyeux merci beaucoup ma chère.

A mes très chers amis du laboratoire

Lamia, Sara, Amel, Nabahet, Aicha, Maysa, Amina, Hako, Islam

Vous êtes plus que des amies pour moi, vous êtes des frères et des sœurs, merci pour tous les
bons moments et les souvenirs inoubliables de folie et de joie que nous avons passés
ensemble durant toute la période de travail.

A tous ceux que m'aiment et tous ceux qui me sont chers.

A toute la promotion Microbiologie fondamentale « 2018-2019 ».

HAKIMA

Résumé

Les endoscopes sont des actes diagnostiques et thérapeutique, le risque de transmission des infections à germes opportunistes tel que *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* est élevé dans les endoscopes, et donc doivent subir une désinfection et un traitement approprié.

Dans ce but, nous sommes fixées les objectifs suivant : détection de la formation de biofilm chez des souches isolées de canaux d' endoscopes par la méthode de culture de tissu en plaque (TCP) et la méthode Rouge Congo (RCA), étudier différents paramètres pouvant influencer la formation de biofilm sur les endoscopes à savoir l'effet de différentes concentration de désinfectant sur la cinétique de formation biofilm formés par des souches de *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* .

Les résultats issus de cette étude ont montré que le désinfectant à l'état dilué n'a pas un grand effet sur le biofilm des deux souches .la solution pure de celui-ci réduit mais n'éradique pas le biofilm .

Mots clés

Endoscope - Contamination - *Klebsiella pneumoniae* - *Pseudomonas aeruginosa* - Biofilm - Désinfectant.

Abstract

Endoscopes are diagnostic and therapeutic acts, the risk of transmission of opportunistic infections such as *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in endoscope, and therefore need to undergo disinfection and appropriate treatment.

For this purpose, we set the following objectives: detection of biofilm formation in isolated strains of endoscopes channels by plate tissue culture method (TCP) and Red Congo method (RCA), study different parameters which can influence the biofilm formation on the endoscopes namely the effect of different concentration of disinfectant on the kinetics of biofilm formation formed by strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. The results from this study showed that the disinfectant in the diluted state does not have a great effect on the biofilm of both strains. The pure solution of this one reduces but does not eradicate the biofilm.

Keywords

Endoscopy - Contamination - *Klebsiella pneumoniae* - *Pseudomonas aeruginosa* - Biofilm – Disinfectant.

ملخص

المناظير الداخلية عبارة عن أعمال تشخيصية وعلاجية ، ومخاطر انتقال العدوى الانتهازية مثل كليبسيلا الرئوية و بسودومناس أيجوجنوزة مرتفعة عن الأجهزة الطبية الأخرى ، وبالتالي يجب تطهيرها ومعالجتها بشكل مناسب.

لهذا الغرض ، وضعنا الأهداف التالية: الكشف عن تشكيل بيوفيلم في سلالات معزولة من قنوات المناظير بواسطة طريقة زراعة ، ودراسة المعلمات المختلفة التي يمكن أن تؤثر على تكوين بيوفيلم على (RCA) وطريقة الكونغو الأحمر (TCP) الأنسجة لوحة المناظير الداخلية ، أي تأثير تركيز مختلف من المطهر على حركيات تشكيل بيوفيلم التي تشكلتها سلالات كليبسيلا الالتهاب الرئوي، و بسودومناس أيجوجنوزة .

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن المطهر في الحالة المخففة ليس له تأثير كبير على الغشاء الحيوي لكلا السلالتين ، حيث يقلل المحلول النقي لهذه الغشاء الحيوي ولكنه لا يستبعده.

الكلمات المفتاحية:

المنظار - التلوث - بيوفيلم - Klebsiella pneumoniae - Pseudomonas aeruginosa - مطهر .

Table des matières

Introduction	1
Partie I: la synthèse bibliographique	2
Chapitre 1 : l'endoscopie	3
1. L'endoscopie (endoscope).....	3
2. Type des endoscopes.....	3
2.1. Endoscope rigide.....	3
2.2. Endoscope souple.....	4
Chapitre 2 : Le risque Infectieux en endoscopie	6
1. Origine des contaminations.....	6
1.1. Contamination d'origine endogène.....	6
1.2. Contamination d'origine exogène.....	6
2. Micro-organismes contaminants.....	7
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	11
3. Contamination de l'endoscope et biofilm.....	15
4. Biofilm.....	15
4.1. Etape de formation de boifilm.....	16
4.1.1. L'adhésion bactérienne initiale.....	17
4.1.2. L'adhésion irrversible.....	17
4.1.3. Etape de maturation du biofilm.....	17
4.1.4. Dispersion de biofilm.....	17
4.2 La régulation du biofilm.....	17
Chapitre3 : Traitement d'endoscopes	18
1. traitement manuel.....	18
2. traitement automatisé.....	18
Partie II : Matériel et méthodes	21
1. Lieu d'étude.....	22
2. Souches étudiées.....	22
3. Revivification et identification des souches isolées.....	22
4. Conservation des souches.....	22
5. Détection de la production de biofilm chez les souches isolées.....	22
5.1. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP).....	23
5.2. Détection de la production de slime sur milieu Rouge Congo Agar (RCA).....	24
6. Evaluation in vitro de l'efficacité du désinfectant de type « Stéranios » sur la formation de biofilm sur microplaques de 96 puits.....	24
Partie III : Résultats et discussion	26
1. Revivification –Identification.....	27
2. Evaluation de la formation de biofilm chez des souches isolées de canaux d'endoscopes.....	30
2.1. Technique de microplaques 96 puits (TCP).....	31
2.2. Technique de Rouge Congo Agar (RCA).....	33

3. Résultats de différents paramètres influençant la formation de biofilm sur tubulures d'endoscope.....	35
3.1. Effet de la concentration et du temps de contact du désinfectant sur la formation e biofilm	35

Conclusion

Références bibliographique

Annexe

Liste des abréviations

M :	Dispositifs médicaux
DE :	Laveurs-Désinfecteurs d'Endoscopes
IO :	Micro-organisme
. <i>pneumoniae</i> :	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
. <i>aeruginosa</i> :	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PS :	lipopolysaccharide
CA :	Rouge Congo Agar
O :	Densité optique
CP :	Methode de plaque de culture de tissus

Listes des figures

Figure 1 : Schémas d'un endoscope rigide simple.....	3
Figure 2: Composition générale d'un fibroscope.....	4
Figure 3: Schéma d'une coupe transversale d'un endoscope flexible montrant la conception complexe et les multiples canaux internes (diamètre intérieur, 2,8 à 3,8 mm)	5
Figure 4: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en microscopie électronique.....	9
Figure 5 : Facteurs de virulence chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
Figure 6 : Observation microscopique de <i>Klebsiella pneumonia</i>	12
Figure 7: Phénotype mucoïde de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
Figure 8: Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de <i>Klebsiella</i>	14
Figure 9 : Développement et structure d'un biofilm bactérie.....	16
Figure 10: Formation de biofilm en microplaque PVC.....	24
Figure 11: Le désinfectant utilisé au service gastro-entérologies (CHU Tlemcen).....	25
Figure 12 : Aspect des colonies	27
Figure 13 : Aspect des souches après coloration de Gram.....	28
Figure 14 : Résultats de l'identification des souches par galerie API 20E	28
Figure 15 : Résultats de la quantification de la formation de biofilm <i>in vitro</i> (TCP) par des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolées de canaux d'endoscopes	31
Figure 16 : Résultats de la quantification de la formation de biofilm <i>in vitro</i> (TCP) par des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolées de canaux d'endoscopes.....	32
Figure 17 : Evaluation de la production de biofilm par la méthode de Rouge Congo Agar.....	34
Figure 18 : Effet des concentrations du désinfectant sur les bactéries de <i>Klebsiella pneumoniae</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en mode biofilm de 24 h pendant un temps de contact de 15 min.....	35
Figure 19: Effet des concentrations du désinfectant sur les bactéries de <i>Klebsiella pneumoniae</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en mode biofilm de 24 h pendant un temps de contact de 30 min.....	36
Figure 23 : Effet des concentrations du désinfectant sur les bactéries de <i>Klebsiella pneumoniae</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pendant un temps de contact de 15 min.....	37

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux microorganismes contaminants l'endoscopiques.....	8
Tableau 2 : Taxonomie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
Tableau 3 : Caractères requis pour l'identification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
Tableau 4 : La taxonomie de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	11
Tableau 5 : Différents facteurs environnementaux et microbiologiques influençant l'attachement microbien et la structure de biofilm.....	16
Tableau 6 : Déroulement d'une procédure de désinfection d'un endoscope digestif semi-critique.....	19
Tableau 7 : Résultats de la technique de TCP.....	32
Tableau 8 : Résultats de la méthode de Rouge Congo Agar (RCA).....	34

Introduction

Les endoscopes digestifs sont des dispositifs médicaux, de conception complexe, avec de longs canaux recouverts de polytétrafluoroéthylène à l'intérieur et de petit diamètre luminal, ils sont d'un entretien difficile et peuvent constituer, dans certains cas, des réservoirs potentiels de micro-organismes et, par conséquent, la formation de biofilm. Ces derniers empêchent sciemment un traitement efficace et représentent un défi pour la réutilisation des matériaux.

Les endoscopes gastro-intestinaux représentent un score de risque élevé car, outre leur configuration complexe, ils ne sont ni démontables ni transparents, ce qui gêne leur visualisation interne et permet compromettre ainsi l'évaluation de leur processus de nettoyage. Étant donné que leur structure interne permet l'accumulation de matière organique et la formation de biofilm et qu'il n'est pas toujours possible de frotter directement avec une brosse, des difficultés peuvent survenir lors du nettoyage requis.

Comme la formation de biofilm est inévitable dans des structures telles que les canaux d'endoscope et qu'il existe un lien de causalité entre les causes actuelles d'infections exogènes liées aux endoscopes flexibles et la mauvaise qualité de traitement [(Costa *et al* ., 2011) ; (Graziano *et al* ., 2012)].

C'est dans ce contexte général que nous avons été amenés à entreprendre ce présent travail qui a pour objectifs :

- D'évaluer la capacité de souches isolées de canaux d'endoscope à former un biofilm,
- D'étudier différents paramètres pouvant influencer la formation de biofilm dans les endoscopes tels les concentrations du désinfectant .

*Synthèse
bibliographique*

Chapitre1 :l'endoscopie

1. L'endoscopie (endoscope)

L'endoscopie est une technique d'exploration et d'imagerie médicale réalisée à l'aide d'un instrument appelé endoscope. Ce dispositif médical (DM) est un « tube optique muni d'un dispositif d'éclairage, destiné à être introduit dans une cavité du corps humain pour l'examiner » (larousse.fr).

L'endoscopie est un acte médical, une procédure peu invasive dans laquelle un endoscope est inséré chez le patient à des fins d'observation, d'analyse et de diagnostic [(Schwab et Singh, 2010) ;(Kovaleva, 2016)].

Au cours des dernières années, les endoscopes sont devenus un élément essentiel de la chirurgie peu invasive et sont aujourd'hui indispensables dans les salles d'opération (Gaertner *et al.*, 2018). les endoscopes sont définis comme des dispositifs «semi-critiques» selon la classification de Spaulding des dispositifs médicaux (Malette *et al.*, 2018).

2. Types d'endoscopes

2.1. Endoscope rigide

Il est constitué d'un tube rigide et d'un ensemble de lentilles cylindriques qui renvoient l'image en bout du tube. Moyennant des bagues d'adaptation interchangeables, cette image peut-être exploitée directement à l'œil nu ou au travers d'un moniteur vidéo malgré sa simplicité et son principe de fonctionnement, ce type d'endoscope ne peut pas être fléchi et par conséquent se révèle difficilement exploitable sur un porte-outil chirurgical (Naoulou, 2006) (Figure 1).

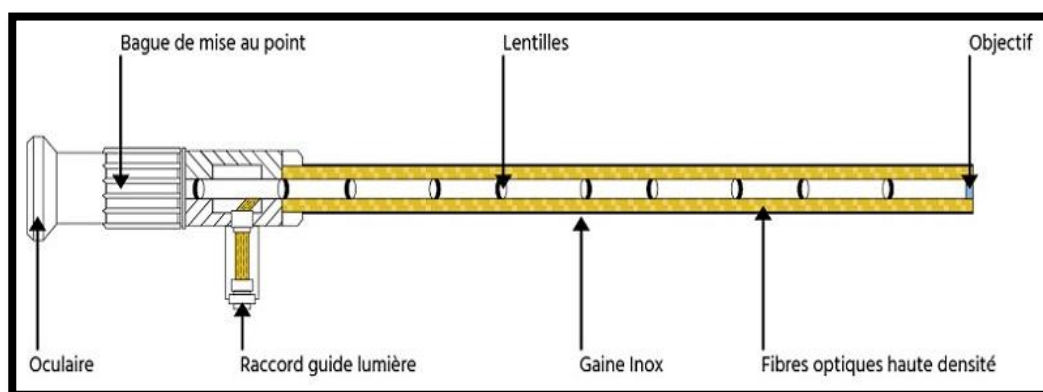


Figure 1 : Schéma représentatif d'un endoscope rigide simple (Saly, 2018).

2.2. Endoscope souple

Les endoscopes souples sont des dispositifs médicaux complexes composés de nombreuses pièces différentes. Leur souplesse permet d'accéder aux cavités naturelles de manière moins traumatique, en se conformant à l'anatomie du patient. Ils sont dotés au niveau distal d'une zone très flexible de béquillage commandée par l'opérateur pour permettre de les guider dans les tortuosités de l'anatomie à explorer (**Valentin, 2018**) (**Figure 2**).

Ces dispositifs complexes sont composés de plusieurs pièces distinctes:

- Un tube flexible d'insertion recouvert d'une chemise longue sous gaine en matière plastique. Celui-ci renferme les fibres de verre transmettant la lumière, les composants optiques ainsi que des canaux en nombre variable permettant le passage de fluides (eau, air, CO₂) ou l'introduction d'instruments à biopsie.
- Une pièce à main ou « poignée de béquillage » permettant au médecin d'orienter l'extrémité distale de l'endoscope (**Figure 2**).
- Un oculaire ou système de connexion en cas de branchement à une console vidéo pour visualiser la zone explorée et de nombreux accessoires qui s'articulent rendant l'entretien complexe (**Saly, 2018**) (**figure3**).

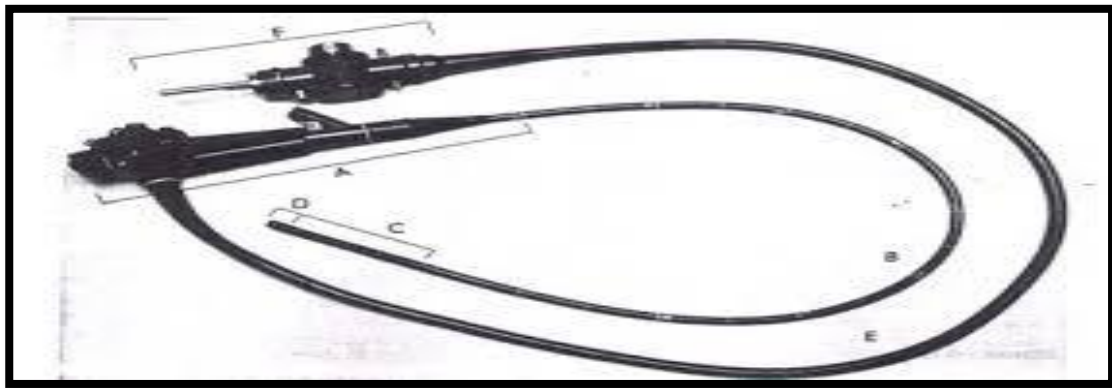


Figure 2: Composition générale d'un fibroscope (De Oliveira, 2008).

A : poignée de contrôle, B : tube d'insertion, C : extrémité béquillable, D : extrémité distale, E : cordon de raccord, F : extrémité de raccord à la source lumineuse.

La complexité de ce type de dispositif médical et l'impossibilité de leur faire subir un autoclavage font de la désinfection chimique le procédé de référence (**Duport et Decousser, 2012**).

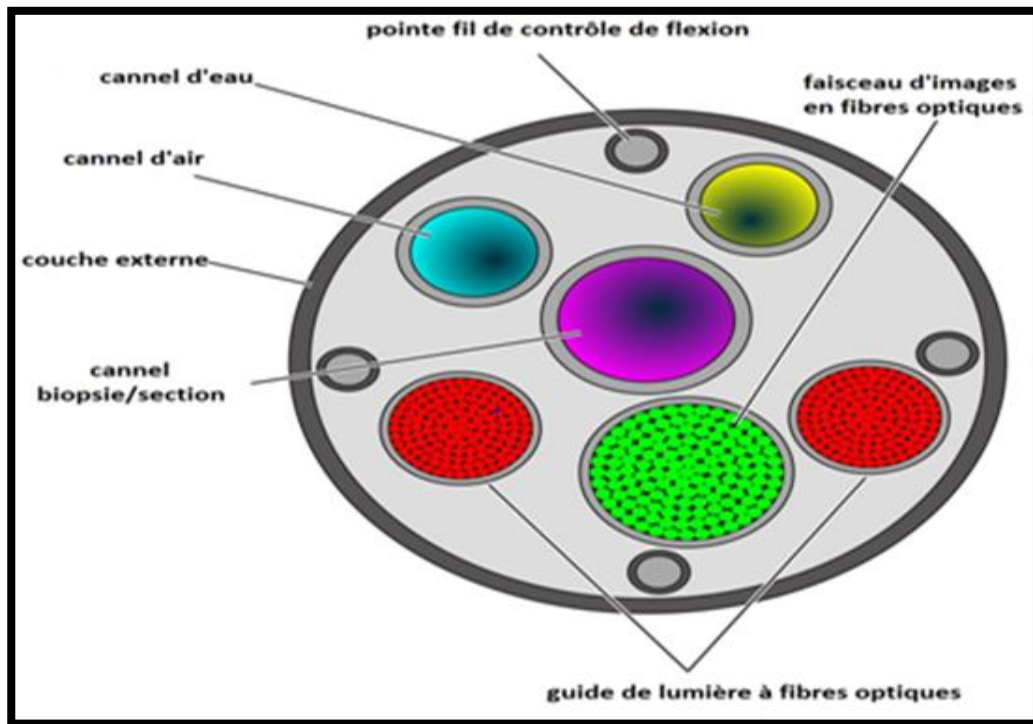


Figure 3 : Schéma d'une coupe transversale d'un endoscope flexible montrant la conception complexe et les multiples canaux internes (diamètre intérieur, 2,8 à 3,8 mm) (Kovalva *et al.*, 2013).

Chapitre 2 : Le risque Infectieux en endoscopie

Bien que les endoscopes jouent un rôle vital et offrent de nombreux avantages aux patients, les risques associés à la transmission iatrogène par les endoscopes demeurent une préoccupation (**Molloy-Simard et al., 2019**).

Rappelons que les endoscopes sont des dispositifs médicaux comprenant une multitude de pièces et de canaux internes reliés les uns aux autres. Ces multiples jonctions entre canaux et la diversité des pièces qui composent l'endoscope facilite l'accumulation de souillure rendant ainsi le nettoyage complexe. Ces souillures peuvent renfermer des micro-organismes et des substrats propices à leur multiplication. Ce constat permet de se rendre compte qu'il y a un véritable risque infectieux en endoscopie qui surviendrait dans 1 à 3 cas par million d'actes [(**Spach, 1993**); (**Nelson, 2003**) ; (**Kovaleva, 2013**)].

1. Origine des contaminations

La contamination par les micro-organismes peut être d'origine endogène, c'est à dire du patient lui-même, ou bien exogène, c'est-à-dire une contamination venant de l'endoscope, d'un Laveurs-Désinfecteurs d'Endoscopes (LDE), d'une solution d'irrigation ... etc.

1.1. Contamination d'origine endogène

Le patient peut se contaminer avec sa propre flore sans que l'endoscope ne soit la source de l'infection étant donné que les actes endoscopiques se déroulent dans un milieu septique avec une grande variété de Microorganismes (**Marchetti, 2005**). Dans ce cas, après utilisation de l'endoscope, la présence d'une flore microbienne riche est inévitable.

L'infection est due à des germes du patient lui-même qui vont passer dans le sang par voie hématogène (bactériémies) à la faveur d'un geste invasif par voie endoscopique (**Ministère des affaires sociales et de la santé, 2016**). Généralement causée par *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* ou d'autres *Enterobacteriaceae* et entérocoques (**Kovaleva et al ., 2016**).

1.2. Contamination d'origine exogène

La contamination peut être causée par un endoscope contaminé par un patient ou l'environnement, il s'agit d'une contamination croisée. La contamination des endoscopes peut être due à différents paramètres (**Grephh, 2016**) soit à un problème de conception de l'endoscope rendant difficile son entretien, à une rupture de la chaîne de traitement (défaut de pratiques, dysfonctionnement d'un procédé de nettoyage ou de désinfection de

l'endoscope), à une contamination du Laveur Désinfectant Endoscope (LDE) ou des fluides de traitement (produit, eau de rinçage), soit au nombre et la nature des organismes contaminants l'endoscope et tout équipement accessoire utilisé pendant la procédure, ou alors à une variété de facteurs de patients, y compris immunitaires, compétence, intégrité des surfaces endovasculaires et la présence de foyers infectieux intrinsèques adjacents à la zone en cours d'examen (**Cowen, 2001**).

Des contaminations par des mycobactéries résistantes au glutaraldéhyde et des souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont pu être retrouvées au niveau de LDE. La contamination se situe au niveau des canaux internes de l'appareil et plus rarement des cages à pistons [(**CDC, 1999**) ; (**Systchenko et al., 2000**)].

2. Micro-organismes contaminants

Bien que l'on estime que le risque de transmission d'infection liée à l'endoscopie est très faible, les infections associées à des soins de santé sont davantage liées aux endoscopes contaminés qu'à tout autre dispositif médical (**Kenters et al., 2015**). Plusieurs rapports ont décrit des infections transmises par endoscope, les organismes les plus couramment identifiés étant *Salmonella* spp, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* alpha-hémolytique, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Candida* spp et *Pseudomonas aeruginosa* (**Ribeiro et al., 2004**) (**Tableau 1**).

**Tableau 1: Agents infectieux impliqués dans des infections liées à l'endoscopie
(Petignat *et al.*, 2008).**

Microorganismes provenant des patients	Microorganismes provenant de l'environnement
<p style="color: blue;">Flore normale et autres colonisants</p> <p><i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella spp</i> <i>Serratia spp</i></p> <p style="color: blue;">Infections ou portage chronique</p> <p><i>Salmonella spp</i> <i>Helicobacter pylori</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Virus hépatite B, hépatite C, VIH <i>Clostridium difficile</i></p>	<p style="color: blue;">Solution d'irrigation</p> <p><i>Pseudomonas spp</i> <i>Mycobactéries atypiques</i></p> <p style="color: blue;">Germes pouvant contaminer les machines</p> <p><i>Enterobacter spp</i> <i>Citrobacter spp</i> <i>Pseudomonas spp.</i></p>

Parmi les bactéries marqueurs qui contaminent les endoscopes et qui nous interpellent dans cette étude on distingue :

2.1. *Pseudomonas aeruginosa* :

Elle a été découverte par le chercheur allemand Schroeter sous l'appellation *Bacterium aeruginosum*, après une observation d'un aspect bleuté du pus en présence de la bactérie (Lattab, 2018). En 1882 Carle Gessard la décrit pour la première fois sous le nom de « bacille pyocyanique ». Le nom de genre est composé du grec « pseudo » (imitation) et « monas » (unité), « aeruginosa » signifie vert-de-gris en latin et se réfère aux pigments que sécrète la bactérie (Salacha, 2010).

La famille Pseudomonadaceae appartient à un vaste groupe de bactéries qui reçu la dénomination de "non-fermentants" (Meghdas *et al.*, 2004) (Tableau 2).

Tableau 2 : Taxonomie de *Pseudomonas aeruginosa* (burgi manuel).

Règne	Bacteria
Embranchement	Prokaryota
Division	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Pseudomonadales
Famille	Pseudomonadaceae
Genre	Pseudomonas
Espèce	Aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa est largement répandue dans l'environnement. C'est une bactérie ubiquitaire. Elle peut vivre à l'état saprophyte dans l'eau, le sol, les végétaux, les solutions antiseptiques et sur des surfaces inorganiques [(Green *et al.*, 1974) ; (Floret, 2009)]. Cette espèce résiste mal à la dessiccation. Elle peut se développer jusqu'à 41°C sans problème, mais pas à 4°C (Lesne *et al.*, 2004).

Pseudomonas aeruginosa, un des principaux micro-organismes des infections nosocomiales, est connu par sa résistance à une gamme d'agents antimicrobiens (Dantas *et al.*, 2014), parfois entouré d'une pseudo-capsule appelée slime qui peut jouer un rôle important dans la pathogénicité de cette bactérie (Solbi, 2013). Elle se présente sous forme de bâtonnets droits, de 1 à 3 µm de long et de 0,5 à 1 µm de large (Lesne *et al.*, 2004) de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes (Laiside, 2012) (Figure 4).

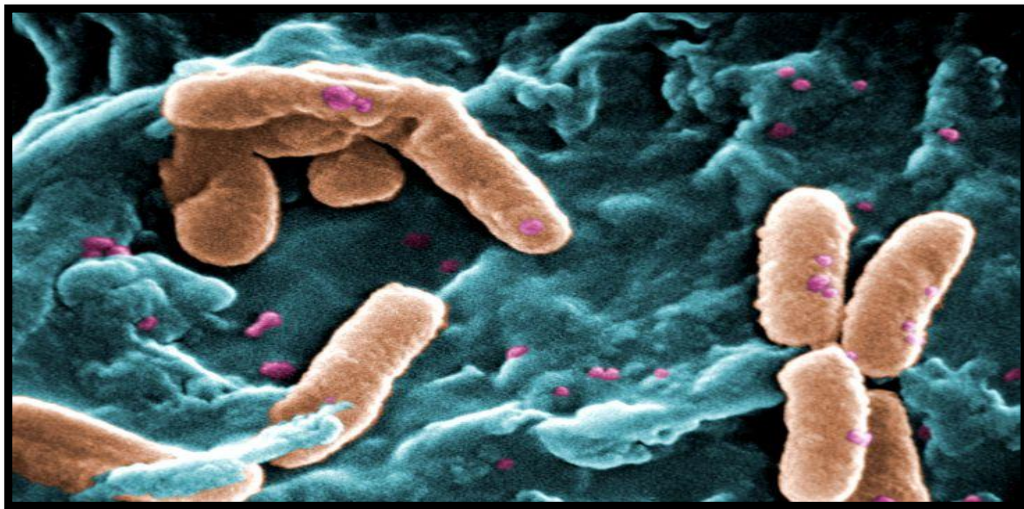


Figure 4: *Pseudomonas aeruginosa* en microscopie électronique (Aissa ,2012).

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie avec un métabolisme strictement respiratoire, avec comme accepteur terminal d'électrons, l'oxygène en aérobiose et le nitrate en anaérobiose (respiration des nitrates) (Lesne *et al.*, 2004) (Tableau 3).

Tableau 3 : Caractères requis pour l'identification de *Pseudomonas aeruginosa* (Diarra, 2009).

Caractères	Résultats
Bacille Gram négatif, asporulé, se présentant sous la forme de bâtonnet droit ou légèrement incurvé	+
Mobile par un seul cil polaire	+
Oxydation du glucose	+
Oxydase	+
Catalase	+
Arginine- dihydrolase	+
Coissance à 42°C	+
Production de pigments photosynthétiques	+
Oxydation du maltose	-
Production de gaz en milieu glucosé	-
Lysine, ornithine décarboxylase	-
Indole,rouge de méthyle,acétylmethylcarbinol	-

Pseudomonas aeruginosa possédant plusieurs voies de virulence, dont certaines sont des fragments associés aux cellules (comme les flagelles, les pili, les lectines, les alginates / biofilms, les lipopolysaccharides)(Pericolini *et al.*, 2018). Elle est capable de produire également de nombreuses enzymes, toxines et autres protéines impliquées dans la cytotoxicité vis-à-vis des cellules de l'hôte. Ainsi, parmi les enzymes on trouve des élastases, des protéases et des phospholipases qui dégradent les composés cellulaires de l'hôte (Hall *et al.*, 2016) (Figure5).

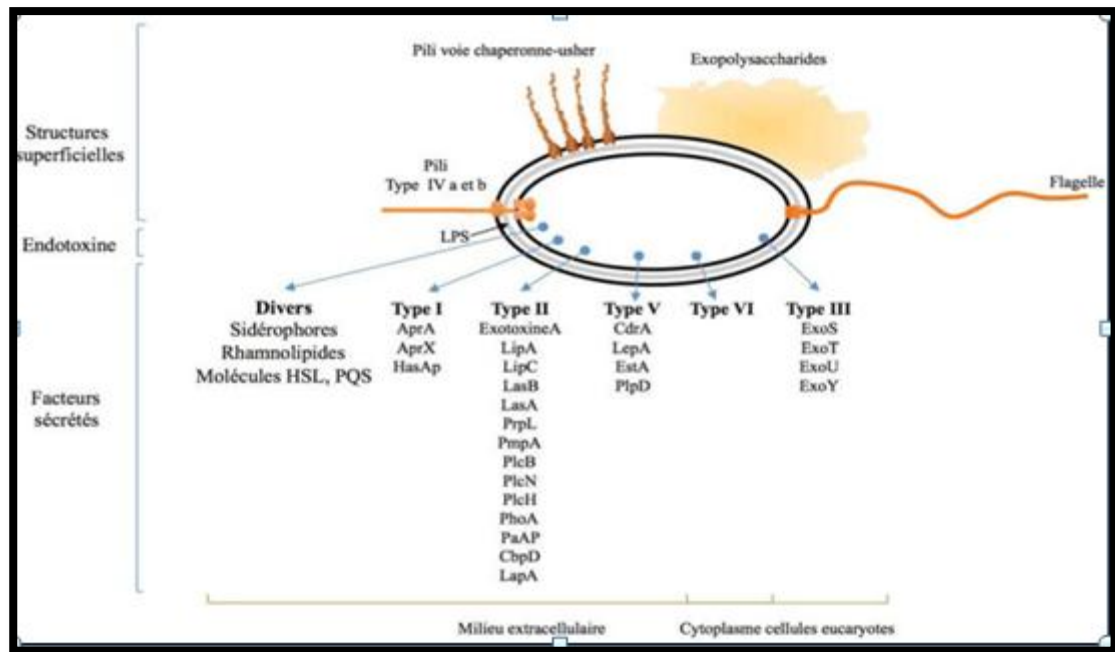


Figure 5 : Facteurs de virulence chez *Pseudomonas aeruginosa* (Bentzmanna et Plésiatb, 2011).

2.2. *Klebsiella pneumoniae* :

Le genre *Klebsiella* fut créé par Treviscan (1885) en honneur du microbiologiste allemand Edwin Klebs qui décrit également l'espèce *Klebsiella pneumoniae* en 1887(Martínez *et al.*, 2004)(Tableau 4).

Tableau 4 : La taxonomie de *Klebsiella pneumoniae* (burgi manuel).

Règne	Bacteria
Embranchement	Proteobacteria
Classe	Gamma proteobacteria
Ordre	Enterobacterales
Famille	Enterobacteriaceae
Genre	<i>Klebsiella</i>
Espèce	<i>Pneumoniae</i>

Klebsiella pneumoniae anciennement appelé Pneumo bacille de Friedländer, c'est un bacille à gram négatif (BGN) à extrémité arrondie immobile, non sporulé, possède une capsule qui lui confère un fort pouvoir invasif (Ndog Batjeck, 2010)(Figure 6).

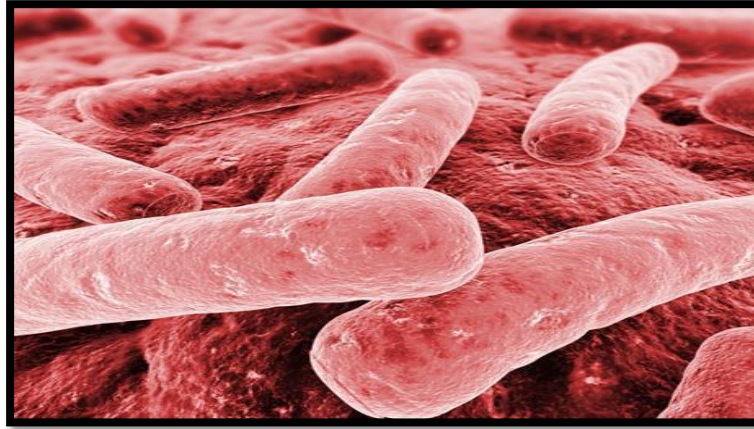


Figure 6 : Observation microscopique de *Klebsiella pneumonia* (Kouch, 2015).

Les espèces de *Klebsiella pneumoniae* sont omniprésentes et ont deux habitats communs; l'un est l'environnement, y compris les eaux de surface, les eaux usées, les sols et les plantes, et l'autre est les surfaces muqueuses de mammifères (Berrazeg *et al.*, 2013) .

Elle est actuellement considérée comme l'un des le plus important pathogène opportuniste (El Fertas-Aissani *et al.*, 2013), susceptible de provoquer une morbidité et une mortalité graves, en particulier dans les unités de soins intensifs, les salles d'opération et les patients pédiatriques (Akya *et al.*, 2018). Les taux de mortalité dus à la bactériémie nosocomiale à *K. pneumoniae* vont de 20% à 50% (Wiskur *et al.*, 2008).

Cette espèce présente tous les caractères généraux des entérobactéries. C'est une bactérie aéro-anaérobie facultative, qui se cultive sur milieux usuels non-enrichis (gélose trypticase-soja (TS), gélose Mac Conkey, gélose lactosée au pourpre de bromocrésol (BCP) et gélose de Drigalski). Après 18-24 heures à 37°C, elle forme des colonies arrondies, muqueuses, généralement bombées et brillante (Illiaquer, 2010) (Figure 7).



Figure 7: Phénotype mucoïde de *Klebsiella pneumoniae* (Yu et al., 2007)

Les *Klebsiella pneumoniae* sont VP +, RM -, uréase + lentement ONPG +, β -xylosidase +, H₂S -, indole -, désaminase oxydative -, LDC +, ODC -, lipase, DNase et gélatinase -, KCN +, fermentant de nombreux substrats glucidiques avec production de gaz, utilisant le citrate de Simmons et le malonate (**Diallo, 2010**).

La pathogénicité de *Klebsiella pneumoniae* est due à divers facteurs de virulence qui lui permettent de surmonter l'immunité innée de l'hôte et de maintenir chez un mammifère hôte (**El Fertas-Aissani et al., 2013**)(**Figure 8**).

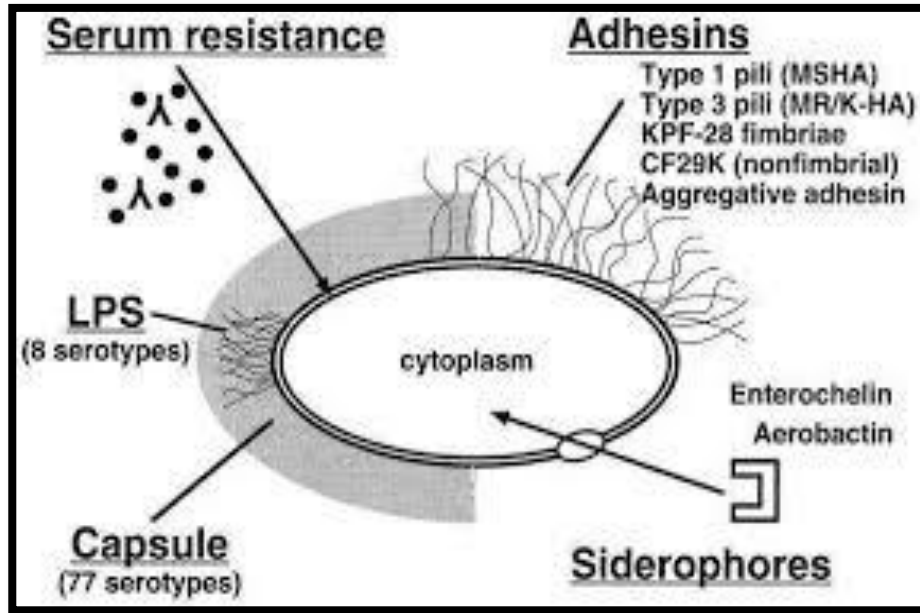


Figure 8: Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de *Klebsiella* (Podschun et Ullmann, 1998).

La capsule :

La majorité des souches de *Klebsiella pneumoniae* possèdent une capsule qui est considérée comme un élément de virulence dominante important et qui consiste en une couche élaborée de polysaccharides associés à la surface (Hennequin *et al.*, 2007).

Les endotoxines :

Comme tous les bacilles à Gram négatif, *Klebsiella* possède une endotoxine encore appelée lipopolysaccharide (LPS), composée de trois parties : le lipide A, le core polysaccharidique et la chaîne latérale O. Le LPS provoque une activation de système immunitaire induisant d'effets physiopathologiques chez l'hôte, via la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire (Illiaquer, 2010).

Les fimbriae

Les fimbriae sont d'importants médiateurs de l'adhérence de *Klebsiella pneumoniae* (Paczosa et Mecsas, 2016). La plupart des isolats cliniques de *Klebsiella pneumoniae* sont capables de produire deux adhésines primaires, des fibres de type 1 et des fibres de type 3 (Struve *et al.*, 2008).

✓ Les fimbriae de type 1

Ils sont impliqués dans l'adhérence aux cellules épithéliales et aux muqueuses des tractus urogénital, respiratoire, et intestinal (**Ofek et Beachey, 1978**). Les fimbriae de type 1 chez *Klebsiella pneumoniae* sont régulées par variation de phase de la même manière que les fimbriae de type 1 chez *E. coli* (**Vuotto et al., 2014**).

✓ Les fimbriae de type 3

Ils assurent la médiation de l'adhésion à plusieurs types de cellules, telles que les cellules de la vessie endothéliale et urinaire humaines, les cellules buccales trypsinisées, les cellules trachéales et les tissus respiratoires (**Di Martino et al., 2003**). La biogénèse fimbriale a été considérée comme une cible potentielle pour interrompre la formation du biofilm de *Klebsiella pneumoniae* (**Riquelme et al., 2018**).

3. Contamination de l'endoscope et biofilm

Le risque de formation de biofilm et de transmission d'agents pathogènes par endoscopie dépend de trois facteurs majeurs soit à l'exposition de l'endoscope au micro-organisme, par des procédures de nettoyage et de désinfection inadéquates tel l'eau de rinçage des endoscopes, les LDE, des bacs ou encore des siphons colonisés, ou alors à la complexité des endoscopes qui présentent des lumières longues étroites et à leurs nature des de matériaux délicats (**Barbosa et al., 2010**).

Le micro-organismes se retrouvant dans les canaux des endoscopes, forme des biofilms qui rendent ainsi la désinfection laborieuse voir inefficace [(**Merighi, 1996**) ; (**Lee, 1998**)].

4. Biofilm

Les biofilms sont des communautés sessiles de micro-organismes enfermés à l'intérieur d'une matrice de substances polymères extracellulaires et attachées aux surfaces biotiques ou abiotiques. Les biofilms sont fréquemment associés aux maladies chroniques chez l'homme et chez les animaux, et protéger les bactéries en en diminuant leur sensibilité aux biocides conventionnels et à la système immunitaire de l'hôte (**Hathroubi et al., 2015**).

Le biofilm protège les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles (**Amiyare et al., 2015**). Dans un biofilm, les cellules microbiennes ne présentent qu'environ 15% du volume total, 85% du reste du biofilm est une matrice d'exopolymères hydratée (**Smida, 2017**). Il est en interaction constante avec

l'environnement et peut donc varier en fonction de celui-ci mais aussi des conditions physicochimiques externes et de l'activité des métabolismes microbiens (Houvion, 2014) (Tableau 5).

Tableau 5: Différents facteurs environnementaux et microbiologiques influençant L'attachement microbien et la structure du biofilm (Smida, 2017).

Effets de milieu	Effets de la composition microbiologique	Effets de la surface ou de l'interface
Température	Surface cellulaire (protéines,	Nature de la surface
pH	lipopolysaccharides,	Rugosité de la surface
Intensité lumineuse	exopolysaccharides, ...)	Hydrophobicité de la surface
Concentration en substrat	Appendices extracellulaires	
Vitesse d'écoulement de l'eau (hydrodynamique)	(flagelles ou fimbriae (pili))	
	Hydrophobicité de la surface cellulaire	

4.1. Etape de formation de biofilm

La formation d'un biofilm sur une surface, est le résultat d'un ensemble de processus physique, chimique et biologique (Busscher, 1995) (Figure 9).

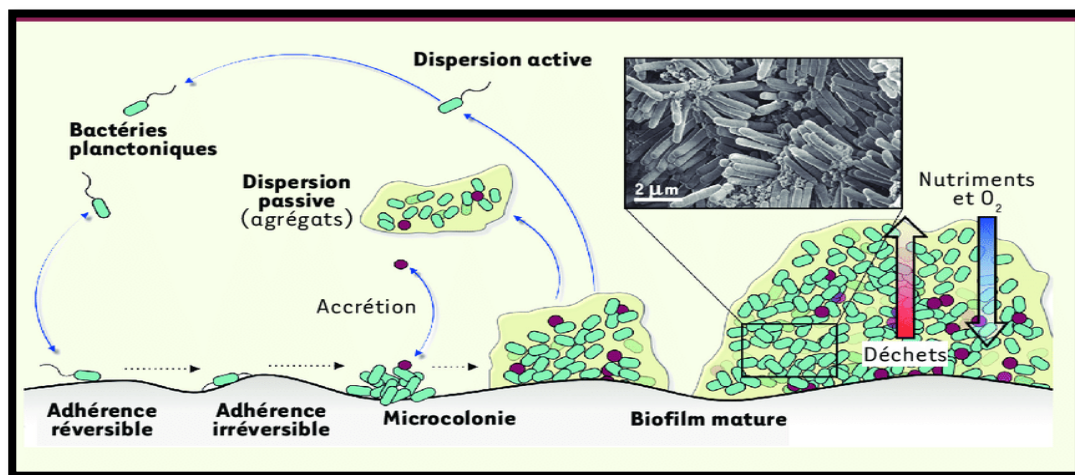


Figure 9 : Développement et structure d'un biofilm bactérien (Lebeaux et Ghigo, 2012).

4.1.1. L'adhésion bactérienne initiale

Elle est influencée par plusieurs facteurs notamment des effets du substrat, des films de conditionnement qui se forment sur le substrat, de l'hydrodynamique, des caractéristiques du milieu et des diverses propriétés de la surface cellulaire (**Donlan, 2002**).

4.1.2. L'adhésion irréversible

La fixation à la surface solide devient irréversible en raison de la production d'exopolysaccharide par les bactérie grâce a des structures d'adhérences variables selon les espèces bactériennes (**Beloin et al., 2008**).

4.1.3. Etape de maturation du biofilm

La maturation, c'est-à-dire le développement de structures complexes organisées spatialement : la production d'EPS permet aux biofilms émergents de développer un complexe, une structure tridimensionnelle qui est influencée par une variété de facteurs environnementaux. Le biofilm peut se développer en quelques heures (**Stoodley et al., 2002**).

4.1.4. Dispersion du biofilm

Le détachement de cellules du biofilm intervient lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables : limitation de la disponibilité en oxygène dans des biofilms épais, apparition de forces de cisaillement dues aux conditions hydrodynamiques, diminution de la concentration ou modification de la nature des nutriments disponibles (**Sauer et al., 2004**).

4.2. La régulation du biofilm

La formation de biofilm est un processus complexe et énergivore qui nécessite un système de régulation hautement perfectionné. Plusieurs signaux sont perçus par ces systèmes de régulation et influencent les différentes étapes de formation de biofilm. Parmi ces systèmes le quorum sensing, car très répandu chez les bactéries (**Hathroubi, 2016**). Il décrit les mécanismes de communication cellulaire qui permettent généralement de coordonner l'expression d'un ensemble de gènes lorsque la population bactérienne atteint une densité importante (**Fuqua et Winans, 1994**).

Chapitre 3 : Traitement et désinfection des endoscopes

Les endoscopes sont des dispositifs médicaux semi critiques donc relèvent d'une désinfection du niveau intermédiaire (bactéricide, fongicide, virucide, tuberculide et parfois même mycobactéricide (**Systechenko *et al.*, 2000**)). Le nettoyage et la désinfection des endoscopes flexibles constituent un défi en raison de leur conception complexe, de leurs lumières étroites et longues et de leurs matériaux délicats (**Gedik *et al.*, 2018**)).

Lorsque les endoscopes sont réutilisés, ils doivent être nettoyés pour éviter la contamination persistante et risque d'infection croisée lors d'une future utilisation clinique (**McCafferty *et al.*, 2018**). La formation de biofilms est inévitable dans des structures telles que les canaux d'endoscope et qu'il existe un lien de causalité entre les causes actuelles d'infections exogènes liées aux endoscopes flexibles et la mauvaise qualité de traitement (**Balsamo *et al.*, 2012**)).

Le glutaraldéhyde utilisé à température ambiante (20 °C) est le produit de référence, il continue être l'ingrédient actif principal dans l'étape de désinfection pendant plusieurs décennies, et est souvent utilisé pour le traitement à des températures élevées (**Kampf *et al.*, 2014**)).

1. Traitement manuel




L'étape de nettoyage manuel est une partie critique du retraitement des endoscopes qui est vulnérable aux erreurs humaines. Les erreurs humaines possibles pendant le nettoyage manuel peuvent comprendre : ne pas nettoyer les canaux parce que le personnel de retraitement des endoscopes ne les connaissait pas, ne pas évaluer correctement si les canaux fuient ou sont bloqués, ou ne pas évacuer suffisamment de liquide dans tous les canaux (**Choi et Cho, 2015**). Le traitement manuel comporte dix étapes (**Tableau 6**)).







2. Traitement automatisé

Le traitement automatisé est effectué par des laveurs-désinfecteurs d'endoscope (LDE) qui sont des machines destinées à laver et désinfecter les surfaces externes et internes des endoscopes souples thermosensibles semi-critiques (**Ministère des affaires sociales et de la santé, 2016**)).

Le traitement automatisé comporte 6 étapes qui sont : le pré traitement , une étape préalable a la mise en LDE ,le rinçage préliminaire , le traitement en LDE , le séchage avant stockage et le nettoyage du LDE en fin de programme (**Thomas, 2018**)).

Tableau 6 : Déroulement d'une procédure de désinfection d'un endoscope digestif semi-critique [(CCLIN Sud-Ouest, 2003) ;(Bonne pratique de desinfection des dispositifs medicaux, 2004)].

Objectifs Étapes Mise en œuvre	Étapes Mise en œuvre	En salle d'examen
En salle d'examen 		
Eliminer les souillures	1. Pré- traitement	<ul style="list-style-type: none"> - Essuyer la gaine externe avec un support doux à usage unique. - Aspirer les canaux (canaux opérateurs et d'aspiration) avec de l'eau et actionner le piston « air / eau ». - Si possible, pratiquer une insufflation forcée du canal air/eau
En salle d'examen ou d'entretien 		
Vérifier l'intégrité de la gaine externe de l'endoscope et des canaux de l'endoscope	2. Test d'étanchéité	<ul style="list-style-type: none"> - Avant immersion partielle ou totale de l'endoscope gonfler la gaine en raccordant l'endoscope à une source d'insufflation ou à l'aide d'un manomètre. S'assurer que l'endoscope ne bulle pas et que l'aiguille ne redescend pas.
En salle d'examen puis  ou en salle d'entretien		
Abaisser le niveau de contamination de l'endoscope et éliminer les souillures en associant une action chimique et une action mécanique poussée	3. Premier nettoyage Durée > 10 min	<ul style="list-style-type: none"> - Immerger le matériel dans un bac contenant une solution détergente. Irriguer les canaux. Laisser en contact au moins 5min ou plus en fonction du produit. Effectuer un nettoyage mécanique de la gaine externe par essuyage de la poignée, des cages à pistons, des pistons et des valves par brossage, des canaux par écouvillonnage. Irriguer puis purger les canaux.
Eliminer les salissures et les résidus de détergent	4. Premier rinçage	<ul style="list-style-type: none"> - Immerger le matériel dans un bac de rinçage contenant de l'eau potable du réseau. Irriguer puis purger les canaux.

<p>Abaisser le niveau de décontamination de l'endoscope et éliminer les souillures résiduelles en associant une action chimique et une action mécanique réduite Laisser en contact au moins 5 min en fonction du produit. Irriguer puis purger les canaux.</p>	<p style="text-align: center;"></p> <p>5. Second nettoyage Durée > 5 min</p>	<p>- Immerger le matériel dans un bac contenant une nouvelle solution détergente. Irriguer les canaux.</p>
<p>Éliminer les salissures et les résidus de détergent</p>	<p style="text-align: center;"></p> <p>6. Rinçage intermédiaire</p>	<p>- Immerger le matériel dans un bac de rinçage contenant de l'eau - potable du réseau. Irriguer puis purger les canaux</p>
<p>Éliminer ou tuer les microorganismes pour éviter leur transmission</p>	<p style="text-align: center;"></p> <p>7. Désinfection</p>	<p>- Immerger le matériel dans le bac contenant la solution désinfectante adaptée. Irriguer les canaux. Laisser en contact le temps requis en fonction du produit. Irriguer puis purger les canaux.</p>
<p>Éliminer les résidus de désinfectant tout en respectant le niveau d'entretien du matériel</p>	<p style="text-align: center;"></p> <p>8. Rinçage terminal</p>	<p>- Immerger le matériel dans un bac de rinçage contenant de l'eau de qualité adaptée (pour soins standard ou bactériologiquement maîtrisée). Irriguer puis purger les canaux</p>
Avant stockage		
<p>Éliminer l'eau de rinçage résiduelle représentant un milieu propice au développement de microorganismes</p>	<p style="text-align: center;"></p> <p>9. Séchage</p> <p style="text-align: center;"></p>	<p>- Essuyer l'extérieur de l'endoscope et le matériel annexe avec un support propre et sécher l'intérieur des canaux à l'air médical filtré détendu.</p>
<p>Protéger le matériel désinfecté d'une contamination lié à l'environnement</p>	<p>10. Stockage</p>	<p>- Suspensu ou à plat sur un plateau recouvert d'un champ propre ou stérile dans une armoire spécifique.</p>

Matériel et méthodes

1. Lieu d'étude :

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) de l'Université Abou bekr Belkaid-Tlemcen.

2. Souches étudiées :

Dans cette étude nous avons travaillé sur une collection de souches de *Klebsiella pneumoniae* ; *Pseudomonas aeruginosa* isolées d'endoscopes digestifs de différents services gastro-entérologies de l'ouest algérien dans le cadre d'une préparation de thèse de doctorat.

3. Revivification et identification des souches isolées:

La confirmation de l'identification des souches était réalisée, après la vérification de leur pureté par une :

- étude des caractères macroscopiques : forme, taille, couleur et aspect.
- étude des caractères microscopiques (La morphologie, le Gram ; l'arrangement des cellules).
- étude des caractères biochimiques API 20E (Biomérieux®, France). La galerie API 20E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à gram négatif, utilisant 20 tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données spécifiques. Ce système comporte 20 cupules tests qui contiennent un milieu réactionnel déshydraté. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

4. Conservation des souches :

Toutes les souches identifiées sont conservées dans de gélose nutritive à 4°C et en double réplique dans le glycérol -80°C.

5. Détection de la production de biofilm chez les souches isolées :

Cette partie de l'expérimentation a porté sur la détection de la formation de biofilm chez les souches isolées.

En l'occurrence deux méthodes sont employées : la technique de microplaque 96 puits par coloration au cristal violet et la méthode par ensemencement sur milieu Rouge Congo (RCA).

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

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

À partir d'une culture pure et jeune de 24h, 5 ml sont ensemencé dans un milieu TSB (Bouillon Tryptone Soja) qu'on incube à 37°C pendant 18 à 24h (Tré-Hardy *et al.*, 2007). Après incubation des dilutions appropriées sont effectuées afin d'obtenir une suspension bactérienne équivalente à 10^8 UFC/mL par ajustement de l'absorbance à 0.08 - 0.1 à une longueur d'onde de 630nm.

Les puits stériles d'une microplaque de 96 puits (polystyrène) sont remplis avec 150µL de cette suspension bactérienne. Les puits de la colonne 12 servant de contrôle, sont remplis avec 150 µL de milieu TSB.

Après incubation à 37°C pendant 24h, les puits de la microplaque sont vidés de leur contenu puis lavés trois fois consécutives avec 0.2 mL d'eau physiologique stérile pour éliminer les bactéries libres planctoniques.

Les cellules bactériennes adhérentes à la paroi interne des puits et formant un biofilm sont colorées par le cristal violet 0.1% (m/v). Après 10 à 15 minutes, la solution de cristal violet est éliminée et les puits sont lavés trois fois avec de l'eau physiologique afin d'éliminer toute trace de colorant non fixe. Les microplaques renversées sont couvertes de papier absorbant et laissées sécher à la température ambiante pendant 15 minutes.

Enfin, les puits sont remplis de nouveau avec 150µL d'une solution d'éthanol (96%) pour libérer le colorant fixe au sein des cellules emprisonnées dans le biofilm ainsi formé.

La quantité de cristal violet solubilisée est mesurée par la lecture de la DO à 490 nm dans un lecteur ELISA (Figure10) (Figure11).

Selon la classification de Mathur *et al.*, (2006), et compte tenu du pouvoir adhérent des souches et de la valeur des DO, celles-ci ont été classées en trois catégories : non adhérentes, faiblement adhérentes et hautement adhérente (Stepanovic *et al.*, 2000) .

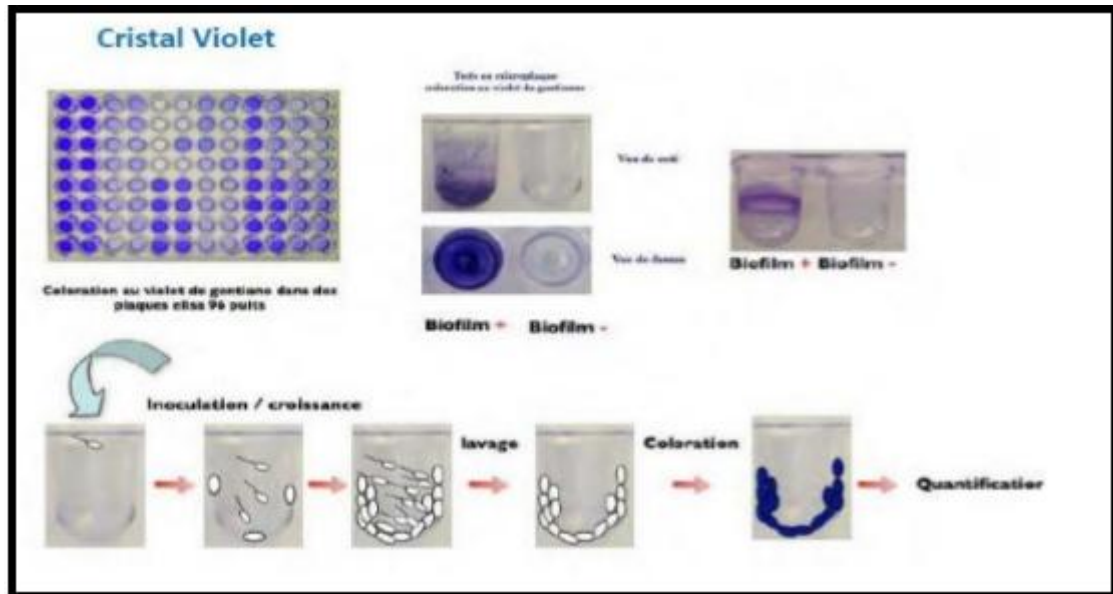


Figure 10: Formation de biofilm en microplaque PVC (Laurent, 2011).

5.2. Détection de la production de slime sur milieu Rouge Congo Agar (RCA) :

Cette technique qualitative consiste à l'ensemencement des souches testées pour leurs capacités à produire un biofilm sur milieu Rouge Congo (Chaieb *et al.*, 2005). C'est une méthode indirecte qui permet de distinguer entre les souches productrices de slime de celles qui n'en produisent pas.

Les souches sont ensemencées par stries en surface du milieu Rouge Congo coulé en boîtes Pétri et incubé à 37° pendant 24h à 48h (Mathur *et al.*, 2006).

Les colonies des souches de phénotype variable donnaient des colonies à centre noir et à contour rouge à centre rouge et à contour noir (Touati *et al.*, 2007).

6. Evaluation *in vitro* de l'efficacité du désinfectant de type « Stéranios » sur la formation de biofilm sur microplaques de 96 puits :

Le désinfectant utilisé dans la procédure de désinfection des endoscopes aux différents services gastro-entérologie est le STERANIOS (figure 12), dont le composant actif est le glutaraldéhyde. Celui-ci est utilisé soit concentré soit dilué pendant 15 min. Pour cette partie, seules les bactéries formatrices de biofilm étaient sélectionnées.

Après formation de biofilm par la technique déjà décrite et une incubation à 37 C pendant 24h, les microplaques de 96 puits étaient rincées et mises en contact avec différentes concentrations du désinfectant : soit une solution mère à 2% - diluée à 75% et à 50 % et à

25% . Les microplaques sont laissées à température ambiante du laboratoire pendant 15 min (temps appliqué au service de gastroentérologie et suivant les recommandations internationales).

Parallèlement d'autres microplaques étaient réalisées dans les mêmes conditions avec un temps de contact du désinfectant plus prolongé allant jusqu'à 30 min.

Après le temps de contact, le désinfectant est ensuite éliminé et un rinçage puits par puits était appliqué avec de l'eau physiologique. Une coloration avec du cristal violet à 0.1% est réalisée pendant 15min puis rincée par deux fois à l'eau physiologique, après 150 μ L de l'éthanol sont ajoutés.

Une lecture des DO à 490 nm des différentes concentrations est mesurée et comparée avec la DO Témoin du biofilm non traité par le désinfectant.



Figure 11: Le désinfectant utilisé au service gastro-entérologies (CHU Tlemcen)

Résultats et discussion

Ce travail a été effectué au laboratoire LAMAABE de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de La Terre et de L'univers à l'Université Aboubekr BELKAID – Tlemcen.

1. Revivification - identification :

31 souches bactériennes, 10 souches de *Klebsiella pneumoniae* (Kp1, Kp2.....Kp10) et 21 souches de *Pseudomonas aeruginosa* (Ps1, Ps2....Ps21) d'origine hospitalière, isolées de tubulures d'endoscopes, sont incluses dans cette étude. Ces souches font partie de la collection des souches bactériennes du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement « LAMAABE » (Université Tlemcen) isolées dans le cadre d'une thèse de doctorat.

Afin de poursuivre cette étude, une re-confirmation de l'identification des souches était nécessaire ; pour cela une revivification de ces dernières a été réalisée sur milieu Mac Conkey. Après une incubation de 18 à 24 h à 37 °C, les colonies de *Klebsiella pneumoniae* avaient un diamètre de 3 à 4 mm étaient rondes, lisses, bombées, brillantes et muqueuses.

Un ensemencement sur milieu cétrimide après une incubation de 24h à 37°C ,les colonies de *Pseudomonas aeruginosa* présentaient trois morphotypes soit de grandes colonies larges et bombées, des colonies plus petites bombées à bord régulier et lisses et des colonies muqueuses bombées avec une pigmentation jaune -vert (**Figure 13**).

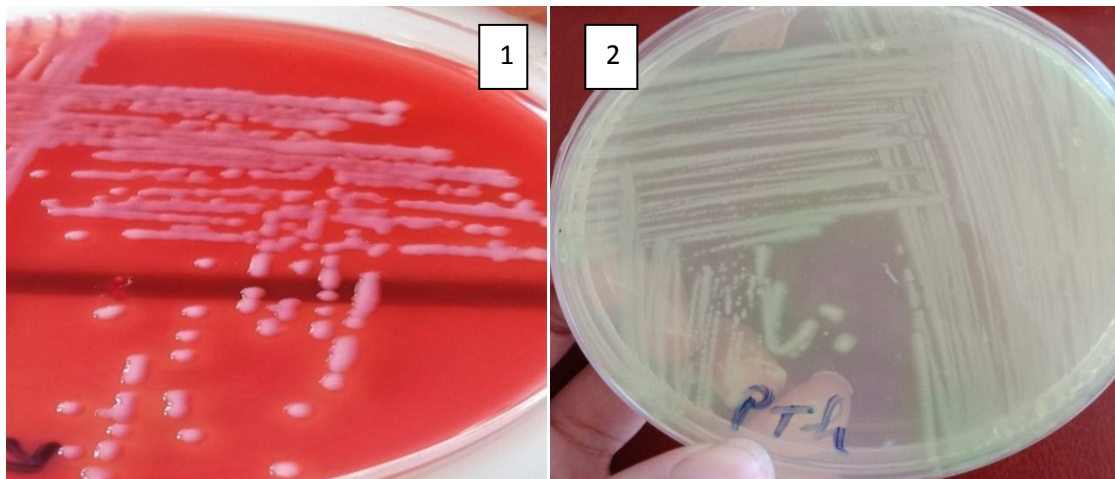
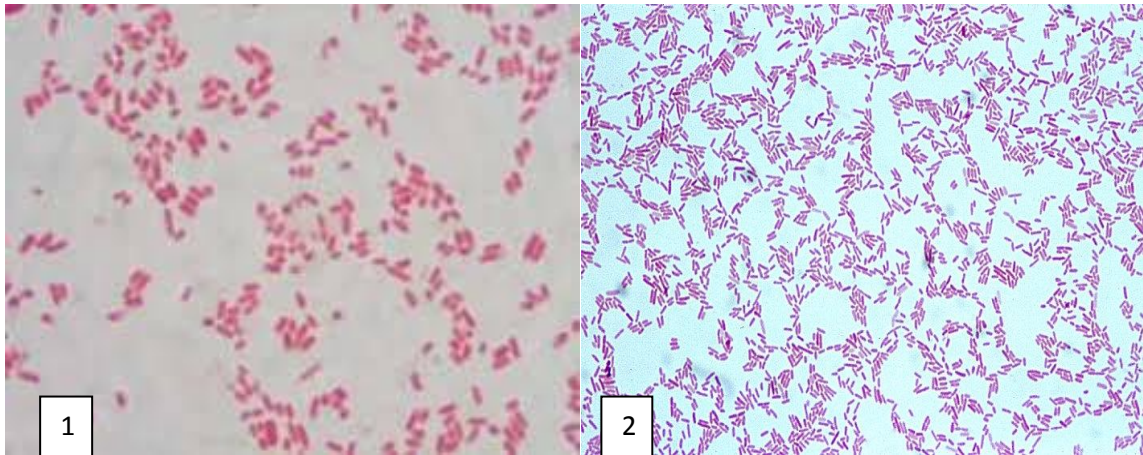


Figure 12 : Aspect des colonies sur milieu sélective
1. *Klebsiella pneumoniae*, 2. *Pseudomonas aeruginosa*

La coloration différentielle de Gram des souches a mis en évidence sont des bacilles à Gram (-) colorés en rose (**Figure 14**).



1. *Klebsiella pneumoniae*

2. *Pseudomonas aeruginosa*

Figure 13 : Aspect des souches après coloration de Gram (grossissement *100).

L'identification par galerie API 20E nous a permis de confirmer et caractériser 10 souches de *Klebsiella pneumoniae* appartenant avec des biotypes différents et 21 souches de *Pseudomonas aeruginosa* avec des profils différents (**Figure 15**).

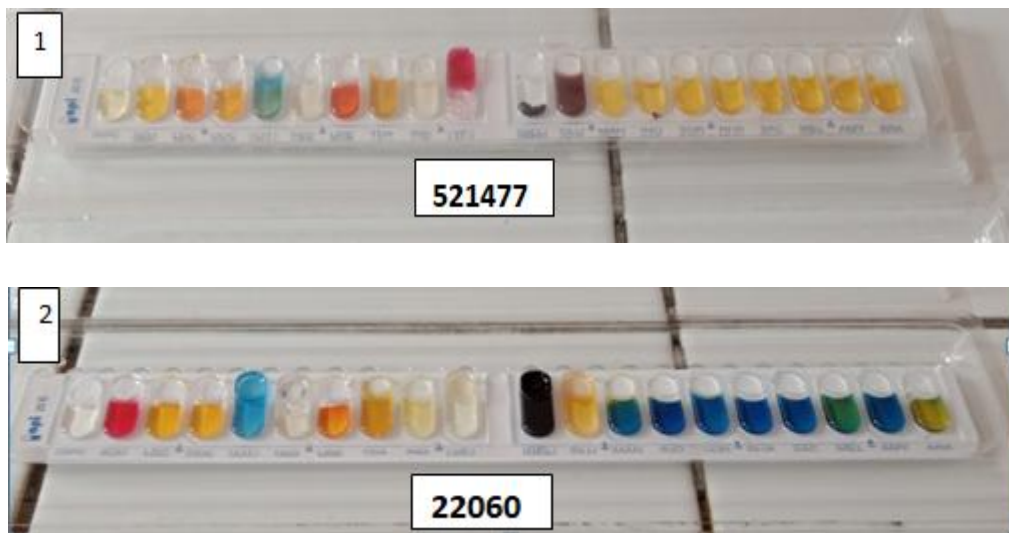


Figure 14: Résultats de l'identification des souches par galerie API 20 E

1. *Klebsiella pneumoniae* 2. *Pseudomonas aeruginosa*

Les interventions endoscopiques provoquent le plus souvent des infections endogènes (c.-à-d. des infections résultant d'infections propres au patient) *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp* et *Enterococci* sont les espèces les plus fréquemment isolées. Les infections exogènes sont associées à l'endoscopie mais peuvent être évitées par des procédures de désinfection bien contrôlées. Les microorganismes exogènes les plus fréquemment associés à la transmission sont *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella spp* (**Kovaleva et al., 2013**).

Selon la littérature, les endoscopes restent exempts de bactéries après l'entreposage prolongé si une procédure de séchage adéquate est appliquée. Les micro-organismes les plus courants fréquemment associés pendant l'endoscopie sont des bactéries Gram-négatives (*Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* et *Salmonella spp.*), des mycobactéries non tubéreuses et des levures (**Kovaleva et al., 2010**).

P. aeruginosa, un agent pathogène opportuniste à Gram négatif, est le microorganisme le plus souvent signalé responsable de la transmission de l'infection au cours d'une endoscopie et d'une bronchoscopie gastro-intestinale. Il est connu pour sa préférence à un environnement humide (alimentation en eau des hôpitaux et canaux de l'endoscope humide) après retraitement (**Kovaleva et al., 2013**).

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

Selon **Chapuis et Boustière en 2008**, *Pseudomonas aeruginosa* est le microorganisme le plus fréquemment isolé (227 cas sur 317), en raison de la capacité de cette bactérie d'origine hydrique à former un biofilm au sein des canaux des endoscopes.

Selon **Saliou et ses collaborateurs 2011**, l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est le germe indicateur le plus fréquemment retrouvé lors des contrôles microbiologiques et un mauvais séchage des canaux internes avant stockage ou une erreur dans la procédure de traitement peuvent être à l'origine de contaminations des endoscopes et être responsables d'infections nosocomiales.

Kovalva et al., 2013 ont également signalé l'émergence de *Pseudomonas spp* dans la contamination de l'endoscope digestif et leur capacité à former des biofilms, extrêmement difficiles à éliminer de la plomberie et des canaux d'endoscope.

Dans l'étude de **Ribeiro et de Oliveira, (2012)**, une contamination a été détectée dans 70% (42/60) des échantillons provenant des canaux air / eau des gastroscopes avec une charge microbienne médiane était de 750 UFC / mL.

Les principaux microorganismes isolés à partir des canaux air / eau des gastroscopes étaient *Pseudomonas aeruginosa* (26,4%), *Escherichia coli* (18,9%) et *Acinetobacter baumannii* (9,4%), et *Klebsiella pneumoniae* (10,7%), Les causes possibles de cette contamination incluent le manque de désinfection.

Dans l'étude de **Bourigault et ses collaborateurs en 2018**, *Klebsiella pneumoniae* produisant de la carbapénémase (OXA-48 CPE) ont été identifiés chez cinq patients ayant subi une endoscopie avec le même matériel (dispositif) en octobre 2015. L'endoscope était le seul lien épidémiologique entre ces cas. Il estime qu' une contamination transitoire de l'endoscope à la suite d'une défaillance du processus de désinfection peut avoir été la cause de la transmission.

Dans une recherche bibliographique effectuée par **McCaffertyen en 2018** sur des articles décrivant les infections associées à une endoscopie gastro-intestinale et les épidémies publiées de 2008 à 2018 dans PubMed, Science Direct et CINAHL , seuls 18 articles ont été retrouvés , dont 16 décrivaient des infections associées au duodéroscope, et les deux autres infections décrites, associées au coloscope et au gastroscopie. Des éclosions épidémiques ont été signalées aux États-Unis, en France, en Chine, en Allemagne, aux Pays-Bas et au Royaume-Uni. Les organismes responsables signalés étaient *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Salmonella enteritidis*. Un certain nombre de facteurs, notamment les défaillances du retraitement, la formation de biofilm, les problèmes de conception d'endoscope et les dommages d'endoscope, contribuent aux infections associées à l'endoscopie gastro-intestinale et à la présence de ces bactéries.

2. Evaluation de la formation de biofilm chez des souches isolées de canaux d'endoscopes :

Plusieurs chercheurs ont étudié les stratégies employées par les micro-organismes pour produire des biofilms. Les bactéries productrices de biofilm sécrètent certaines substances chimiques qui les protègent contre les désinfectants, les agents antimicrobiens et des systèmes immunitaires de l'hôte (**Saitou, 2009**). Des méthodes classiques de la détection de la production de biofilm *in vitro* ont été établies, telles que la méthode quantitative de la microplaque 96 puits (TCP) (**Freeman et al., 1989**) et la méthode de rouge Congo (RCA). Pour cela les souches identifiées ont été testé pour leur capacité à produire du biofilm *in vitro* par 2 méthodes une quantitative sur microplaque de 96 puits et l'autre qualitative sur milieu au rouge Congo.

2.1. Technique de microplaques 96 puits (TCP) :

Le test TCP décrit par **Christensen *et al.*, 1985** est le plus utilisé et considéré comme un test standard pour la détection de la formation de biofilm (**Mathur *et al.*, 2006**).

Dans Cette méthode Nous somme référées à la classification de **Mathur *et al.*, (2006)** est basée sur les valeurs de DO obtenus par les souches (**Ouchar *et al.*, 2013**). La quantité de cristal violet solubilisé est mesurée par la lecture de la DO à 490 nm dans un lecteur ELISA Cette technique nous a donné les résultats suivants (**Figure 16**) et (**figure17**) (**annexe1**) .

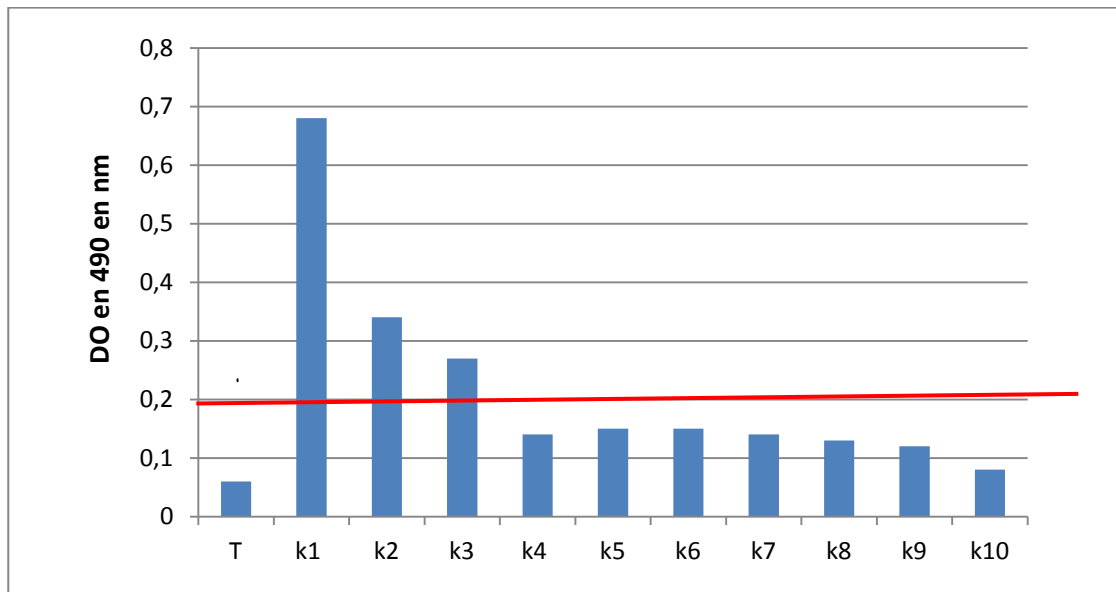


Figure15 : Résultats de la quantification de la formation de biofilm *in vitro* (TCP) par les souches de *Klebseilla pneumoniae* isolées de canaux d’endoscopes.

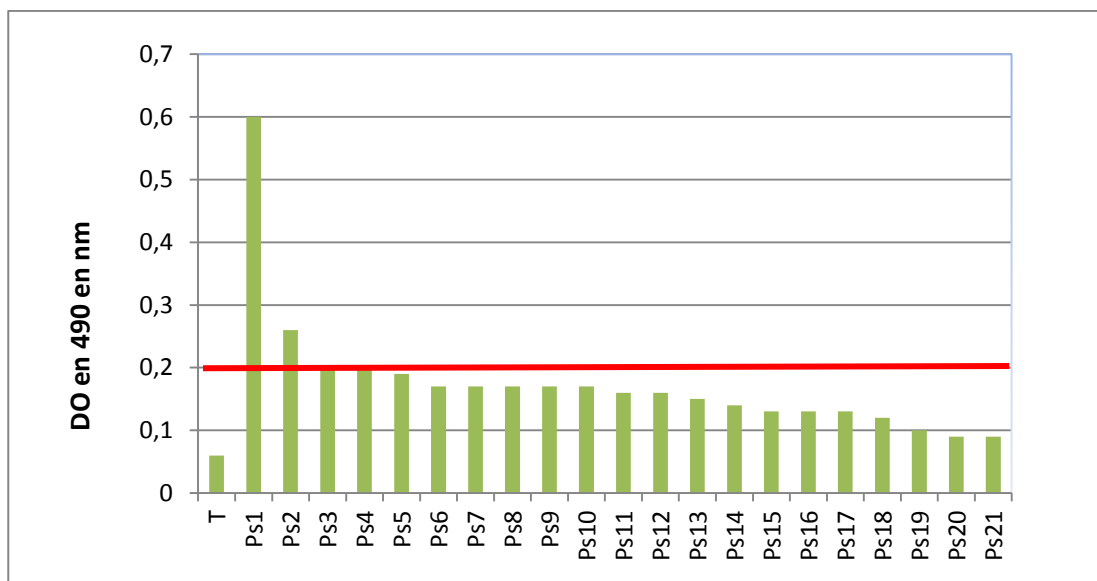


Figure16 : Résultats de la quantification de la formation de biofilm *in vitro* (TCP) par les souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées de canaux d’endoscopes.

Tableau 7: Résultats de la technique de TCP.

Souche	Fort	Modéré	Faible
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=10)	3	6	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=21)	2	14	5

Selon la **figure 15**, sur les 10 souches de *Klebsiella pneumoniae* testées ,2 d’entres elles se caractérisaient par des DO importantes, la DO de la souche K1 était 11 fois plus élevée que la DO de témoin ($DO_t \times 11 \leq DO$) celle de la souche K2 était 5 fois plus élevée ($DO_t \times 5 \leq DO$).la majorité des souches de Kp étaient modérément formatrices de biofilm .

De meme, selon la **figure 16**, sur les 21 souches de *Pseudomonas aeruginosa* ,deux d’entres elles (Ps1 et Ps2) présentaient respectivement des DO 10 et 4 fois plus élevée que la DO du témoin et sont classées fortement formatrices de biofilm.

Lors de l'acte endoscopique, l'environnement fournit des conditions optimales pour la contamination et la croissance subséquente des biofilms. Les endoscopes modernes contiennent de multiples canaux et orifices, qui peuvent facilement recueillir la matière organique. La présence de biofilm sur la surface interne des canaux de l'endoscope a été signalée dans la littérature celle-ci est probablement associée à la présence de matière organique et à l'humidité dans les canaux de l'endoscope résultant d'un traitement inadéquat de l'endoscope et insuffisance de séchage des canaux d'endoscopes pouvant contenir des microorganismes d'origine hydrique, tels que *P. aeruginosa* et *Mycobacterium spp* (Kovaleva, 2017).

Les endoscopes flexibles ont une complexité, avec plusieurs canaux étroits qui sont difficile à nettoyer et à sec, créant des conditions qui favoriser le développement de biofilm. Nettoyage en profondeur, particulièrement au point d'utilisation, peut limiter la formation biofilm et aider à assurer une désinfection efficace et stérilisation dans les étapes de traitement ultérieures, Le biofilm est susceptible de se former dans les canaux internes des endoscopes et sur des surfaces d'endoscope endommagées qui peuvent ne pas être facilement atteint par des brosses pendant étapes de nettoyage (Putnam, 2016).

Nos résultats sont en accords avec l'étude de Pajkos *et al.*, 2004 qui confirme la présence de biofilm dans les canaux d'endoscopes.

De même Roberts dans son étude en 2013 confirme et révèle la présence de biofilms dans les canaux d'endoscopes flexibles dus à la prolifération et persistance des microorganismes très souvent d'origine exogène.

2.2. Technique de Rouge Congo Agar (RCA) :

Cette méthode qualitative se base sur le caractère phénotypique des souches sur milieu Rouge Congo. Un résultat positif donne des colonies noires avec une consistance cristalline sèche susceptibles de produire un slime. Des colonies non productrices de slime restent généralement roses. Un résultat indéterminé est surtout indiqué par un assombrissement des colonies avec absence de morphologie coloniale cristalline sèche (Freeman *et al.*, 1989). Les résultats des souches de *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* testées sont illustrés par la figure 17 et consignés dans le tableau 9:

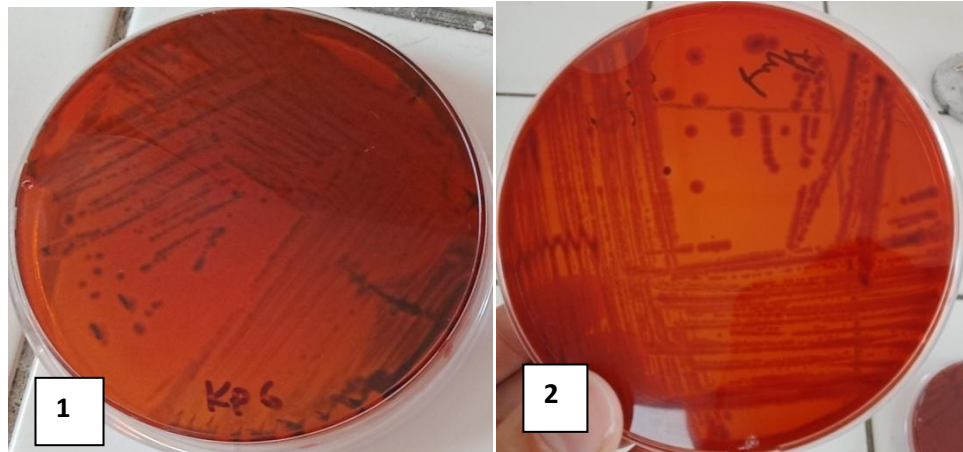


Figure17 : Evaluation de la production de biofilm par la méthode de Rouge Congo
 Agar 1 : *Klebsiella pneumoniae* 2 : *Pseudomonas aeruginosa* .

Tableau 8 : Résultats de la méthode de Rouge Congo Agar (RCA)

Les souches	RCA +	RCA-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=10)	4	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=21)	4	17

Les résultats indiquent que seules 8 souches soit 4/10 de *Klebsiella pneumoniae* et 4/21 de souches de

Pseudomonas aeruginosa sont productrices de slime .

Les Klebsielles semblent former plus facilement un slime. **Bellifa en 2014** a montré que 85 des souches de *Klebsiella pneumoniae* produisaient un slime contre 30 non productrices. **Chibi en 2015**, a montré que 76% de *Pseudomonas aeruginosa* était non formatrice de slime. L'étude de **Mathur et al., (2006)** montre que 8/150 souches étaient positif par la méthode CRA.

D'après nos résultats, la méthode TCP semble être plus efficace que celle du rouge Congo, à ce propos **Hassan et al., (2011)** , estime que la méthode de TCP est une méthode de criblage la plus fiable , sensible et reproductible pour la détection de la formation de biofilm [(**Mathur et al., 2006**); (**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.

3. Résultats de différents paramètres influençant la formation de biofilm sur tubulures d'endoscope :

Afin de mieux comprendre la formation et persistance du biofilm sur les tubulures d'endoscope nous avons essayé d'étudier *in vitro* l'effet du désinfectant (glutaraldéhyde à 2%) et du temps de contact (24 et 48h).

3.1. Effet de la concentration et du temps de contact du désinfectant sur la formation de biofilm :

Sur un total de 10 *Klebsiella pneumoniae*, nous avons sélectionné seulement 3 souches cliniques (kp2-kp3-kp4), excellentes formatrice de biofilm avec une souche de référence (700603). Sur 21 souches de *Pseudomonas aeruginosa* 2 souches (Ps 1, Ps2) performantes en biofilm ont été sélectionnées, avec une souche de référence (ATCC27853).

L'efficacité du désinfectant à différentes concentrations : solution mère (Solution commercialisée de glutaraldéhyde à 2%), diluée à 75, 50 et 25 % était testée vis-à-vis du mode sessile des bactéries étudiées (Annexe 2). Les résultats obtenus sont présentés dans les figures suivantes :

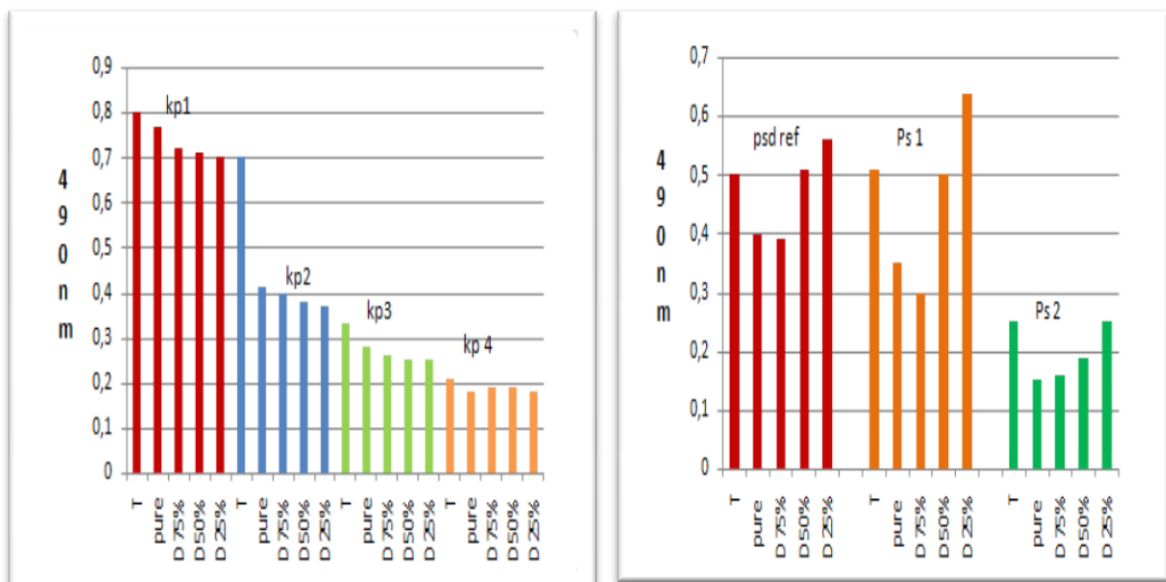


Figure 18 : Effet des concentrations du désinfectant sur les bactéries de *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* en mode biofilm de 24 pendant un temps de contact de 15min

A l'issue de ces figures 18, 19 et 20, on constate que le désinfectant (glutaraldéhyde à 2%) est non efficace sur la forme biofilm des 4 souches de *Klebsiella pneumoniae* choisies même après un temps de 30 minutes, on remarque que les DO ne diminuent de presque rien. Après 48h, le biofilm de ces souches n'est pas affecté et le désinfectant ne produit aucun effet.

Les dilutions à 75, 50 et 25% ont presque le même effet que la solution mère. Le glutaraldéhyde à 2% ne semble pas efficace contre la formation du biofilm de *Klebsiella* isolées des canaux d'endoscopes.

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont présenté des comportements différents ou on observe que l'effet du désinfectant est plus ou moins efficace uniquement à l'état pur avec des diminutions de DO. Cependant les autres concentrations n'avaient aucune action et re-favorisait la formation de biofilm avec des augmentations de DO ceci pourrait être due selon **Roberts, (2013)**, en utilisant un système modèle de biofilm dans des plaques de microtitration en polystyrène, il a constaté que le désinfectant à base d'acide peracétique était efficace contre les bactéries et levures étudiées, mais si l'étape de séchage après la désinfection a été sautée la repousse pourrait se produire.

Pseudomonas aeruginosa est la cause la plus fréquente des infections post-endoscopiques. Dans les établissements de soins, l'eau de rinçage des endoscopes, un laveur désinfecteur, des bacs ou des siphons colonisés peuvent être la cause de la contamination des endoscopes. *Pseudomonas aeruginosa* se localise préférentiellement à l'intérieur des canaux des endoscopes et produit facilement des biofilms qui le protègent de l'action des désinfectants (**Marchetti et Pineau, 2005**).

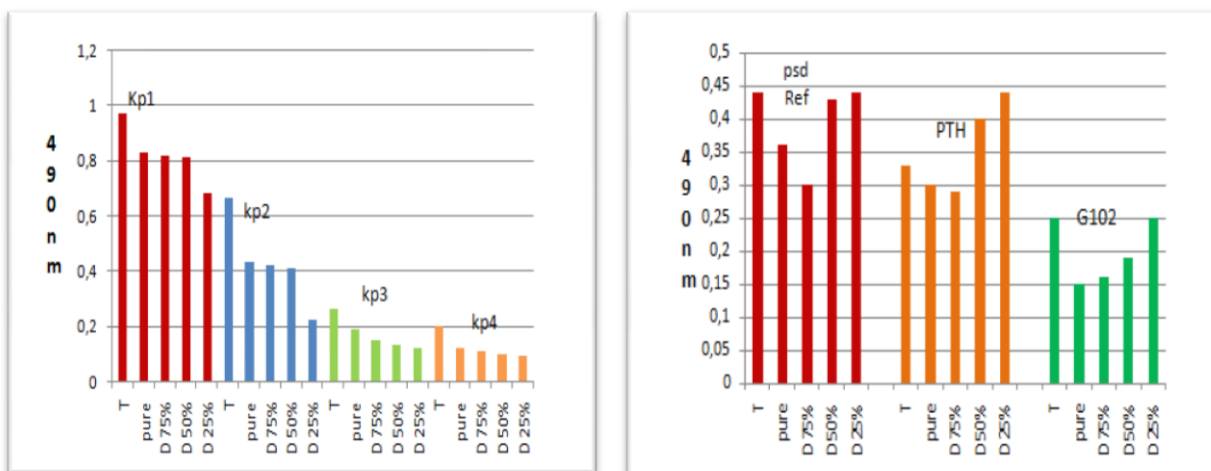


Figure 19 : Effet des concentrations du désinfectant sur les bactéries de *Klebsiella*

pneumoniae et *Pseudomonas aeruginosa* en mode biofilm de 24 pendant un temps de contact de 30 min

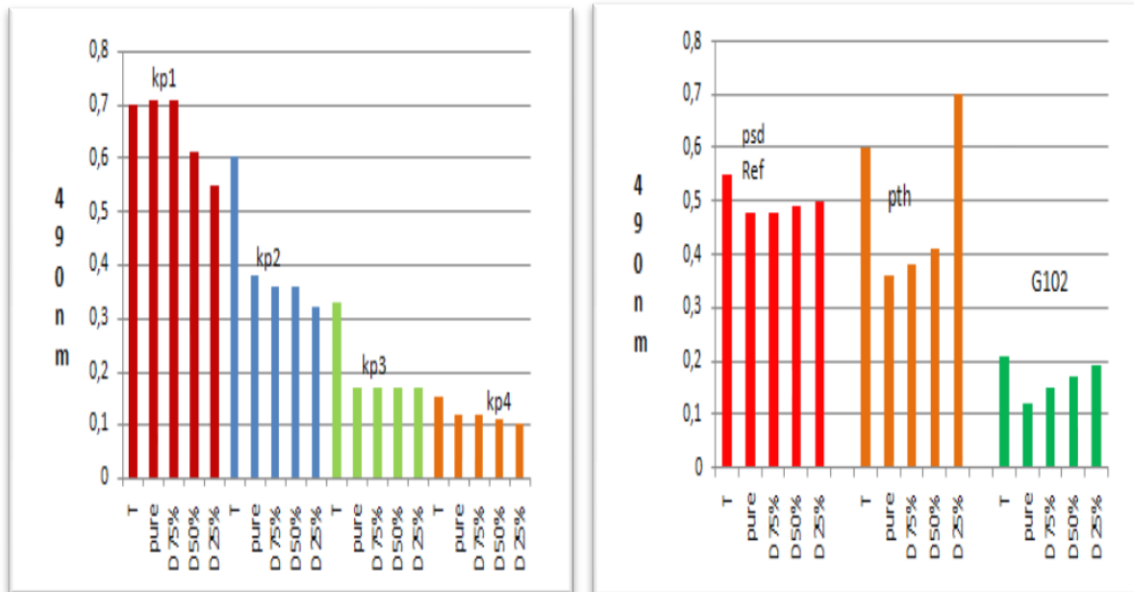


Figure 20 : Effet des concentrations du désinfectant sur les bactéries de *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* pendant un temps de contact de 15minute

Selon Tsuji *et al.*, (1999) , après dix minutes d'exposition , des désinfectants tels que la solution de glutaraldéhyde peuvent éliminer 85 à 100% de la contamination bactérienne provoquée par l'endoscopie.

Néanmoins le nettoyage correct des endoscopes est une procédure compliquée et fastidieuse. En milieu clinique, il peut en résulter des défaillances dans le processus de décontamination et une contamination résiduelle des endoscopes peut affecter l'efficacité des désinfectants et des stérilisants, augmentant le risque de transmission nosocomiale (Vickery *et al.* , 2009).

Tout de même, la formation de biofilm est généralement considérée comme un processus par étapes, dans lequel les micro-organismes se fixent aux surfaces humides, où forment des communautés intégrées dans une matrice de polysaccharide. L'adhésion progressive de micro-organismes et l'autoproduction d'une matrice biopolymère qui en résulte fournissent un milieu propice à l'organisation des colonies et la maturation des biofilms. En outre, les microorganismes résidant dans les biofilms sont remarquablement

plus résistants aux protocoles de désinfection, y compris l'inactivation chimique, comparé aux bactéries en suspension (Neves *et al.*, 2015).

La présence de germes hydriques type *Acinetobacter sp* et *Pseudomonas sp.* dans l'eau de rinçage impose de revoir la qualité et la provenance de cette eau. Par ailleurs, le désinfectant est un élément primordial dans la procédure de désinfection. Il convient d'utiliser un détergent à base de glutaraldéhyde en solution à 2 % (Oumokhtar, 2008).

Conclusion

L'endoscopie est un acte médical extrêmement répandu réalisé par des professionnels de santé qui doivent assurer la sécurité de leurs patients. Du fait de leur conception les endoscopes souples ne sont pas stérilisables et nécessitent des procédures spécifiques de nettoyage et de désinfection. Ce sont des instruments coûteux. Des restrictions budgétaires empêchent souvent l'achat de plusieurs appareils. De ce fait, la pression augmente pour réutiliser plus rapidement le même instrument. Ce n'est possible qu'en réduisant la durée de la désinfection ou du nettoyage préalable, l'après-traitement (rinçage) et en omettant d'entretenir l'endoscope. Le risque d'infections exogènes en est dès lors accru et la formation de biofilm dans les canaux d'endoscope constitue une source majeure d'infection hospitalière.

Les données fournies dans cette étude ont montré que la réduction microbienne attendue après l'exposition au désinfectant n'est pas atteinte lorsque le biofilm s'est formé, Aucune des méthodes de désinfection testées dans notre n'a totalement éliminé le biofilm; l'application manuelle de 2% de glutaraldéhyde et des ses concentrations n'a pas donné de grands effets en raison du fait que ce produit fixe les débris et protéines.

Ainsi, le choix du désinfectant et le temps d'action sont très important lors de l'éradication des biofilms. Le temps appliqué dans nos services (CHU) n'est pas efficace et doit être revu et corrigé.

Nos résultats montrent qu'il est difficile d'assurer une désinfection parfaite des endoscopes. Les difficultés rencontrées sont probablement liées à la complexité des appareils et des techniques de désinfection utilisées.

Enfin nous nous disons que d'autres études sont nécessaires pour :

- Réduire le risque de formation de biofilms dans les canaux d'endoscopes,
- Cherchera les moyens d'améliorer le processus de désinfection
- Apporter des mesures correctives et d'éviter les résistances et infections associée.

*Références
bibliographique*

1. **Aissa K.** profil de résistance de *pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques dans les services de reanimation de l'HMIM v de Rabat entre 2006 et 2010. Th. Doctorat. Université Mohammed v, 2012, pp. 4.
 4. **Akya A., Elahi A., Chegenelorestani R., Rezaee M.** Dissemination of multidrug-resistant, Class I and II integrons and molecular typing of CTX-M-producing *Klebsiella pneumoniae*. Int J App Basic Med Res 2018;8:100-5.
 5. **Amiyare R., Esmail A., Ghanmi Y., Ouhssine M.** Evaluation de l'effet d'un désinfectant à base de Glutaraldehyde à 2 % sur le biofilm d'*Acinetobacter baumannii* . Mater. Environ. Sci, 2015, Vol. 6 (11), pp. 3168-3173.
 6. **Amrouni S., Touati M., Hadeif Y., Djahoudi A.** Effet de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et de *Thymus ciliatus* sur *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 carbapénèmase. Phytothérapie, 2014, Vol. 12(5), 309-313.
 7. **Balsamo A.C., Graziano k.U., Schneider R.P., Junior MA., Lacerda R.A.** Removing biofilm from a endoscopic: evaluation of disinfection methods currently used. Rev Esc Enferm USP, 2012, Vol.46, pp.92.
 8. **Barbosa J.M., Souza A.C.S., Tipple A.F.V., Pimenta F.C., Leao L.S.N.O., Sliva S.R.M.C.** Endoscope reprocessing using glutaraldehyde in Endoscopy Services of Goiânia, Brazil. Arq Gastroenterol, 2010, Vol. 47(2), pp. 219-224.
 10. **Bellifa S.** Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Th. Doctorat. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, 2014.
 11. **Beloin C., Roux A., Ghigo., J.M.** Escherichai coli biofilms. Curr Top Microbiol Immunol, 2008, Vol. 322, pp. 249-289.
 12. **Benslimani A., Meieddine C.** État de la résistance aux antibiotiques, d'autres espèces bactériennes et surveillance des bactéries multirésistantes (BMR) : SARM, entérobactéries BLSE, *Acinetobacter* sp, *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas aeruginosa* résistants à l'imipénème, à la ceftazidime et à la ciprofloxacine. In: Réseaux algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (ed) 13e rapport d'évaluation, 2012, pp. 65–88.
 13. **Bentzmann S., Plésiatb P.** *Pseudomonas aeruginosa* : une virulence complexe . Revue francophone des laboratoires, 2011, N°435, p. 74.
- Berrazeg M, Diene S.M., Drissi M., Kempf M., Richet H., et al. (2013)** Biotyping of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates from France and Algeria Using MALDI-TOF MS. PLoS ONE 8(4): e61428. doi:10.1371/journal.pone.0061428.

- 14. Bonne pratique de désinfection des dispositifs médicaux- Guide pour l'entretien manuel des dispositifs médicaux en endoscopie digestif-juin 04.** Comité technique national des infections nosocomiales, Conseil supérieur d'hygiène publique de France, 2004, pp. 28.
- 15. Bourigault C., Le Gallou F., Bodet N., Musquer N., Juvin M.E., Corvec S, Ferronnière N., Wiesel S., Gournay J., Birgand G., Le Rhun M., Lepelletier D.**Duodenoscopy: an amplifier of cross-transmission during a carbapenemase-producing Enterobacteriaceae outbreak in a gastroenterology pathway. *Hosp Infect*, 2018, Vol. 99(4), pp. 422-42.
- 17. Busscher H. J., Bos R., Van der Mei H.C.** 1995. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiol Lett* 128:229-234.
- 22. CDC (Centers for Disease Control and Prevention).** Bronchoscopy-related infections and pseudoinfections--New York, 1996 and 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 1999 Jul 9, Vol. 48(26), pp. 557-60.
- 23. Chaieb K., Mahdouani K., Bakhrouf A.** Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus*, pp.79.
- 24. Chapuis C., Boustière C.** Risque infectieux et endoscopie digestive Risk of infection and gastrointestinal endoscopy . *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 2008, Vol. 32, pp. 113-117.
- 25. CCLIN SUD-OUEST.** Recommandations pour le traitement manuel des endoscopes non autoclavables, Décembre 2003, pp. 17.
- 26. Choi H.H., Cho Y.S.** Endoscope Reprocessing: Update on Controversial Issues. *Clin Endosc*, 2015, Vol. 48, pp. 358.
- 27. Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Eachy E.H.** Adherence of biofilm producing strains of *Staphylococci epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity*, 1985, pp. 318-326.
- 28. Costa E.A.M., Costa E.A., Graziano K.U., Padovez M.C.** Medical device reprocessing: a regulatory model proposal for Brazilian hospitals. *Rev Esc Enferm USP* [Internet]. 2011[cited 2012 Jan 17];45(6):1459-65. Available from [:http://www.scielo.br/pdf/reeusp/v45n6/en_v45n6a26.p](http://www.scielo.br/pdf/reeusp/v45n6/en_v45n6a26.p).
- 29. Cowen A.E.** The clinical risks of infection associated with endoscopy. *Can J Gastroenterol*, 2001, vol. 15(5), pp. 322.

- 31. Dantas R.C., Ferreira M.L., Gantijo-Filho P.P., Ribas R.M.** *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia : indépendant risk factors for mortality and impact of resistance on outcome. *Journal of Medical Microbiology*, 2014, Vol. 67, pp. 1679-1687.
- 32. De Oliveira C.V.** La gastroscopie chez le cheval. Th. Doctorat. École nationale vétérinaire d'ALFORT, 2008, pp. 11.
- 33. Diallo K.** Frequence d'isolement des *Klebsiella* au laboratoire de bactériologie CVD du CHU GABRIEL Toure de 2002 a 2007. Th. Doctorat. Université de Bamako, 2010, p. 21.
- 34. Diarra F.** Frequence d'isolement des *pseudomonas* au laboratoire de bactériologie CVD du CHU Gabriel Toure de 2002 A 2008. Th. Doctorat. Université de Bamako, 2009, pp. 35.
- 38. Dupor C., Decousser J.W.** Endoscopie : gestion du risque infectieux. EMC-Biologie médicale, 2012, Vol. 7, PP. 2.
- 39. El Fertas-Aissani R., Messai Y., Alouche S., Bakour R.** Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathologie Biologie*, 2013, vol. 61, pp. 209-216.
- 40. Floret D.** Immunization: process of elaborating guidelines and their evolution in France. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 2009, Vol. 67, pp. 219-223.
- 42. Fuqua W.C., Winans S.C.** A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *Bacteriol*, 1994, Vol. 176, pp. 2796-2806.
- 43. Freeman D.J., Falkiner F.R., Keane C.T.** New method for detecting slime production by coagulase negative *staphylococci*. *J Clin Pathol*, 1989, Vol. 42, pp. 872-874.
- 44. Gaertne A., Belloni P.** Analysis and Simulation of the Illumination Optics of Rigid Medical Endoscopes. *Current Directions in Biomedical Engineering*, 2018, Vol. 4(1), pp. 169–172.
- 46. Gedik H., Günay L., Şahin EC., Sharifzade M.** The Improvement of Endoscope Reprocessing with ATP-Bioluminescence Tool. *Ann Med Health Sci Res*. 2018; 8: 6-9
- 47. Graziano K.U., Lacerda R.A., Turrini R.T., Bruna C.Q.M., Silva C.P.R., Schmitt C, et al.** Indicators for evaluation of processing dental-medical-hospital supplies: elaboration and validation. *Rev Esc Enferm USP*. 2009 [cited 2012 abr. 19];43(n.spe 2):1174-80. Available from: http://www.scielo.br/pdf/reeusp/v43nspe2/en_a05v43s2.pdf

- 48. Green S.K., Schroth M.N., Cho J.J., Kominos S.K., Vitanza-jack., V.B.** Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol*, 1974, Vol. 28, pp. 987-991.
- 49. GREPHH (Groupe d'Evaluation des Pratiques en Hygiène Hospitalière)**, Audit national endoscopie 2015 : Endoscopes souples non autoclavables avec canaux, Première partie – Résultats de l'audit national, septembre 2016.
- 50. Hall S., McDermott C., Anoopkumar-Dukie S., McFarland A.J., Forbes A., Perkins A.V., Davey A.K., Chess-Williams R., Kiefel M.J., Arora D., Grant G.D.** Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, 2016, Vol. 8, pp. 1-14.
- 51. Hassan A., Usman J., Kaleem F., Omair M., Khalid A., Iqbal M.** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *J .The razilian Journal of Infectious Diseases* , 2011, Vol.15(4), pp. 305-311.
- 52. Hathroubi S.** Rôle des polysaccharides de surface dans la formation des biofilms et rôle du biofilm d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* dans la pathogénicité. Th. Doctorat. Université de Montréal, 2016, pp. 46.
- 53. Hathroubi S., Fontaine-Gosselin S-E., Tremblay Y.D.N., Labrie J., M Jacques.** Sub-inhibitory concentrations of penicillin G induce biofilm formation by field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol*, 2015.
- 54. Hennequin C., Forestier C.** Influence of capsule and extended-spectrum betalactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. *Research in Microbiology*, 2007, Vol. 158, pp.339-347.
- 57. Houvion E.** Le biofilm dentaire : composition, formation et propriétés. TH. Doctorat. Université de Lorraine, 2014, p. 18.
- 58. Illiaquer M.** Epidémiologie et caractérisation moléculaire de souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3ème génération, hors BLSE, isolées entre 2007 et 2009, au C.H.U. de Nantes. TH. Doctorat. Université de Nantes, 2010, p. 15.
- 60. Kampf G., Fliss P.M., Martiny H.** Is peracetic acid suitable for the cleaning step of reprocessing flexible endoscopes?. *World J Gastrointest Endosco*, 2014, Vol. 6(9), pp. 390-406.

- 61. Kenters N., Huijskens E.G.W., Corianne M., Andreas V.** Infectious diseases linked to cross-contamination of flexible endoscopes. *Endoscopy International Open*, 2015, Vol. 3(04), pp. 259.
- 63. Kovaleva J.** Infectious complications in gastrointestinal endoscopy and their prevention. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2016, Vol. 30, pp. 689-704.
- 64. Kovaleva J.** Endoscope drying and its pitfalls, *Journal of Hospital Infection*, 2017, doi: 10.1016/j.jhin.2017.07.012.
- 65. Kovaleva A., Degener J.E., van der Mei H.C.** Mimicking disinfection and drying of biofilms in contaminated endoscopes. *Journal of Hospital Infection*, 2010, Vol. 76, pp. 345-350.
- 66. Kovaleva J., Peters F.T.M., Van Der Mei H.C., Degener J.E.** Transmission of Infection by Flexible Gastrointestinal Endoscopy and Bronchoscopy. *J. Clinical Microbiology Reviews*, 2013, Vol. 265(2), pp. 231-254.
- 66. Lattab A.** Effet des composés naturels sur l'adhérence et la formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*. Th. Doctorat. Université Abdlhamid Ibn Badis Mostaganem, 2018, pp. 4,60.
- 67. Laurent F.** Biofilm bactérien. Université de Médecine de Lyon, 2011.
http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/seminaires_desc/2011-mai/dec_mai2011-biofilm-laurent.pdf
- 68. Lebeaux D., Ghigo J.M.** Infection associées aux biofilms quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ?. *médecine/science*, 2012, Vol. 28, pp. 727-739.
- 69. Lee R.M., Kozarek R.A., Sumida S.E., Raltz S.L.** Risk of contamination of sterile biopsy forceps in disinfected endoscopes. *Gastrointest Endosc*, 1998, Vol. 47(5), pp.377-81.
- 70. Lesene J., Besse F., De Monpezet A., Dupuis C.** Evaluation et gestion des risques liés à *Pseudomonas aeruginosa* dans les établissements de thermalisme. *Ecole nationale de la sante publique*, 2004, pp. 5-6.
- 71. Liazid A.** Etude de la résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif non fermentantes au niveau du C.H.U de Tlemcen. Th. Magister. Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, 2012, pp. 24.
- 72. Mallette K.I., Pieroni P., Dhalla S.S.** Bacterial presence on flexible endoscopes vs time since disinfection. *World Gastrointest Endosc*, 2018, vol. 10(1), pp. 52.

- 73. Marchett B., Pineau L.** Risque infectieux exogène en endoscopie digestive. *Revue Francophone des Laboratoires* N°376 , 2005, PP. 67-73.
- 74. Mario-Ferey K., Pasmore M., Stoodley P., Wilson S., Husson J.P., Costerton J.W.** Biofilm removal from silicone tubing: an assessment of the efficacy of dialysis machine decontamination procedure using in vitro model. *Hostp Infect*, 2003, Vol. 53, pp. 64-71.
- 75. Martínez J., Martínez L., Rosenblueth M., Silva J., Martínez-Romero E. (2004).** How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy?: The case of *Klebsiella*. *International Microbiology*. 7(4): 261-268.
- 76. Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay D.J., Fatma T., Rattan A.** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2006, pp. 25-29.
- 77. Meghdas I., Hamze M., Dabboussi F., Baida N., Izard D.** Taxonome du genre *pseudomonas* : rétrospective et actualité . *J. Lebanese Science*, 2004, Vol. 5. pp. 116.
- 72. Merighi A., Contato E., Scagliarini R., Mirolo G., Tampieri M.L., Pazzi P., Gullini S.** Quality improvement in gastrointestinal endoscopy: microbiologic surveillance of disinfection. *Gastrointest Endosc*, 1996, Vol.43(5):457-62.
- 73. McCaffert C.E., Aghajani M.J., Abi-Hanna D., Gosbell I.B., Jensen S.O.** An update on gastrointestinal endoscopy-associated infections and their contributing factors. *J. Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2018, Vol. 17(1), pp. 36.
- 74. McCafferty C.E., Abi-Hanna D., Aghajani M.J., Micali G.T., Lockart I., Vickery K., Gosbell I.B., Jensen S.O.** The validity of adenosine triphosphate (ATP) measurement in detecting endoscope contamination. *Journal of Hospital Infection*, 2018, Vol. 100(3) , p. 4.
- 76. Molloy-Simard V., Lemyre J.L., Martel K., Catalone B.** Elevating the standard of endoscope processing: Terminal sterilization of duodenoscopes using a hydrogen peroxide–ozone sterilizer . *American Journal of Infection Control*, 2019, Vol. 47(3), pp. 243.
- 77. Naoulou A.** Architectures pour la stereovision passive dense temps reel :Application a la stereo -endoscopie.Th. Doctorat. Universite Paul Sabatier, 2006 , pp. 181.
- 78. Ndog Batjeck R.** Prévalence et antibiorésistance de *Klebsiella pneumoniae* productrice de bêta- lactamases à spectre étendu et son impact vis-à-vis d'autres familles d'antibiotiques.TH. Doctorat. Universite Mohammed V, 2010, pp. 6.
- 79. Nelson D.B.** Infectious disease complications of GI endoscopy : part I, exogenous infections. *Gastroinsest Endosc*, 2003, Vol. 57(6), pp. 695-711.

- 80. Neves M.S, da Silva M.G, Ventura G.M, Côrtes P.B, Duarte R.S, de Souza H.S.** Effectiveness of current disinfection procedures against biofilm on contaminated GI endoscopes. *Gastrointestinal Endoscopy*, 2015. doi: 10.1016/j.gie.2015.09.016.
- 81.Ofek I., Beachey EH. (1978).** Mannose binding and epithelial cell adherence of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 22(1):247-254.
. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn* , 2013, Vol. 7(2), pp. 187-210.
- 84.Oumokhtar B., El Houari H., Mustapha M., Gmira S., Mellouki I., Benajeh D., Aqodad N., El Abkari M., Ibrahimi A.** Contamination microbiologique résiduelle des endoscopes digestifs. Springer, 2008, pp. 483- 492.
- 85.Paczosa M.K., Mecsas J.** *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016, Vol. 80(3), pp. 629–661.
- 86.Pajkos A., Vickery K., Cossart Y.** Is biofilm accumulation on endoscope tubing a contributor to the failure of cleaning and decontamination?. *Journal of Hospital Infection* , 2004 , Vol. 58, pp. 224–229.
- 87.Pericolini E., Colombari B., Ferrett G., Iseppi R., Ardizzoni A., Girardis M., Sala A., Peppoloni S, Blasi E.** Real-time monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on endotracheal tubes in vitro . *BMC Microbiology*, 2018, Vol. 18(84), pp. 1.
- 88.Petignat C., Dumas C.L., Attinger M.** Risque de transmission d'infection lors d'un examen endoscopique, 2008, pp. 36.
- 90.Podschun R., Ullmann U. (1998).** *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Journal of Clinical Microbiology*. 11(4):589-603.
- 91. Putnam K.** Preventing biofilm formation in flexible endoscopes. *Periop Briefing*, 2016, Vol. 103(1).
- 92.Ribeiro M.M., de Oliveira A.C.** Analysis of the air/water channels of gastrointestinal endoscopies as a risk factor for the transmission of microorganisms among patients. *Am J Infect Control.* , 2012, Dec , Vol 40(10), pp.913-6.
- 93.Ribeiro M.L., Godoy A.P.O., Benvengo Y.H.B., Ecclissato C.C., Mendonça S., Pedrazzoli J.** The influence of endoscopic procedures upon the contamination of *Helicobacter pylori* cultures. *Arq Gastrienterol*, 2004, Vol. 41(2), pp. 100.
- 96.Riquelme S.A., Ahn D., Prince A.** *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* Adaptation to Innate Immune Clearance Mechanisms in the Lung. *J Innate Immun.* 2018, Vol. 10, pp. 442–454.

- 97.Roberts M.S., Charles G.** The role of biofilms in reprocessing medical devices. American Journal of Infection Control, 2013, Vol. 41, pp. 577-580.
- 98.Saitou K., Furuhashi K., Kawakami Y., Fukuyama M.** Biofilm formation abilities and disinfectant resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cockroaches captured in hospitals. Biocontrol Science, 2009, Vol.14, pp. 65-68.
- 99.Salacha R .** Les Patatines de *Pseudomonas aeruginosa* : Sécrétées ou non Sécrétées ? Telle est la question... . Th. Doctorat. Université de la Méditerranée, 2010 , pp. 10.
- 100.Saliou P., Garlantézec R., Baron R., Quiot J.J., Cholet F., Le Floch M.F. , Lejeune B .** Contrôles microbiologiques des endoscopes au centre hospitalier régional de Brest du 1er janvier 2007 au 31 de´ cembre 2009. Pathologie Biologie, 2011.Vol. 59 , pp.88–93.
- 101.Saly M.** Traitement des dispositifs médicaux réutilisables thermosensibles : Mise en place d'uen stérilisation à basse température au CHU de Bordeaux. Th. Doctorat. Université de Limoges, 2018 , pp. 52-53-55.
- 103.Sauer K., Cullen M.C., Rickard A.H., Zeef L.A.H., Davies D.G., Gilbert P.** Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. Bacteriol, 2004, Vol. 186, pp. 7312-7326.
- 104.Schwab K., Singhn S.** An introduction to flexible endoscopy. Surgery, 2011, Vol, 29(2), pp. 80–84.
- 106.Solbi S.** Effet du repiquage de *pseudomonas aeruginosa* sur les caractères morphologiques , biochimique et sensibilitéaux antibiotiques. Th. Doctorat. Université Mohammed V -Souissi, 2013, pp. 6.
- 107.SmidaH.** Modulation de l'interface entre biofilms microbiens électroactifs et surface d'électrode: modifications de surface et effets de milieu. TH. Doctorat. Université Rennes 1, 2017, p. 21.
- 108.Spach D.H., Silverstein F.E., tamm W.E.** Transmission of infection by gastrointestinal endoscopy and bronchoscopy. Ann Intern Med, 1993, Vol. 118(2), pp.117-28.
- 109.Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B.S., Vabic-Vlahovic M.** A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiological Methods, 2000, pp. 175–179.
- 110.Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W.** Biofilms as complex differentiated communities. Annual Review of Microbiology, 2002, Vol. 56, pp. 187-209

- 111. Struve C., Bojer M., Krogfelt K.A.** Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Type 1 Fimbriae by Detection of Phase Variation during Colonization and Infection and Impact on Virulence. *Infect. Immun*, 2008, Vol. 76(9), pp. 4055–4065.
- 112. Systchenko R.** Recommandations pour la mise en place de procédures de nettoyage et de désinfection en endoscopie digestive. *Acta Endoscopica*, 2000, Vol. 30(3), pp. 329-339.
- 113. Systchenko R., Marchehi B., Canard J.M., Pallazo L., Ponchon T, Rey J.F., Santereau D. et le conseil administrative de la SFEED.** Recommandations pour la mise en place de procédures de nettoyage et de désinfection en endoscopie digestive. *Gastroenterol Clin Biol*, 2000, Vol. 24, pp. 520-529.
- 114. Systchenko R., Marchetti B., Canard J.N., Palazzo L., Ponchon T., Rey J.F., Sautereau D.** French Society of Digestive Endoscopy. Guidelines of the French Society of Digestive Endoscopy: recommendations for setting up cleaning and disinfection procedures in gastrointestinal endoscopy. *Endoscopy*, 2000 Oct, Vol. 32(10), pp. 807-18.
- 115. Taj Y., Essa F., Aziz F., Kazmi S.U.** Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dev Ctries*, 2012, Vol. 5(6), pp. 403-409.
- 116. Thomas S.** Investigation de non-conformités microbiologiques f'endoscopes souples thermosensibles : étude épidémiologique clinique et environnementale. Th. Doctorat. Université de Nantes, 2018, pp. 40.
- 117. Touati A., Achour W., Abbassi.** Détection des gènes *ica* et de la production de slime parmi des souches de *Staphylococcus epidermidis* isolées d'infections liées aux cathéters chez des patients neutropéniques, *Pathologie Biologie*, 2007, PP.277–282.
- 118. Tré-Handy M., Vanderbist F., Traore H.** In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures, 2008.
- 119. Tsuji S., Kawano S., Oshita M., Ohmae A., Shinomura Y., Miyazaki Y., Hiraoka S.** Endoscope Disinfection Using Acidic Electrolytic Water. *Endoscopy*, 1999, Vol. 31 (7), pp. 528-535.
- 121. Valentin D.** Valuation médico-économique de l'utilisation des bronchoscopes souples. Th. Doctorat. Université Toulouse III Paul Sabatier, 2018, pp. 25.

123. Vickery K., Ngo Q.D., Zou J., Cossart Y.E. The effect of multiple cycles of contamination, detergent washing, and disinfection on the development of biofilm in endoscope tubing. *Am J Infect Control*, 2009, Vol.37(6), pp.470-474.


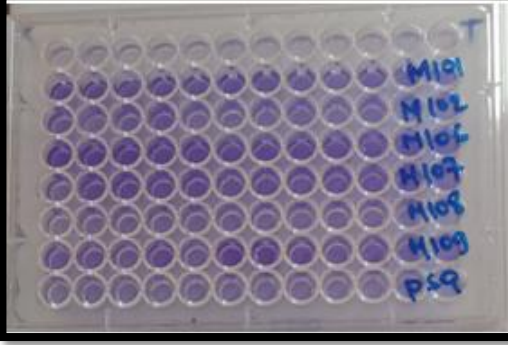
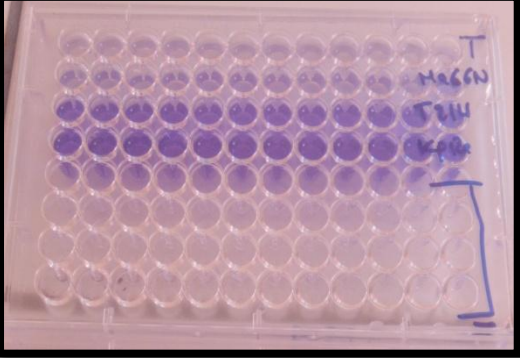
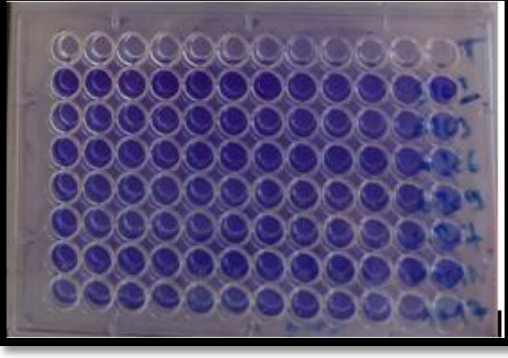
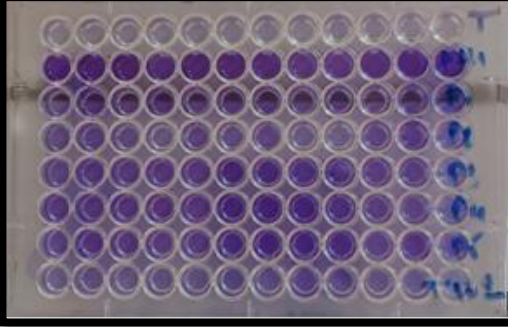
124. Votto C., Longo F., Balice P.M., Donelli G., Varaldo P.E. Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens*, 2014, Vol. 3, pp. 743-758.

125. Yu V.L., Hansen D.S., Ko W.C., Sagnimeni A., Klugman K.P., Gottberg A.V., Goossens H., Wagener M.M., Benedi V.J., the International Klebsiella Study Group. Virulence Characteristics of *Klebsiella* and Clinical Manifestations of *K. pneumoniae* Bloodstream Infections. *Emerging Infectious Diseases*, 2007, Vol. 13(7), p. 987.

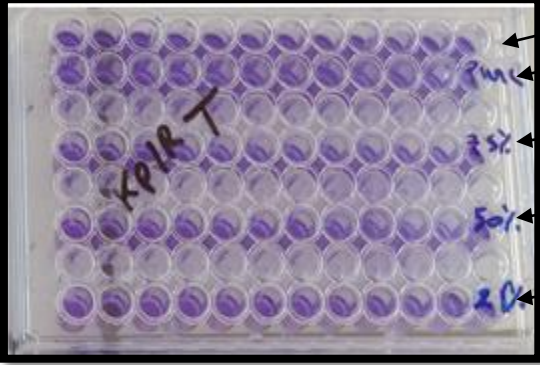
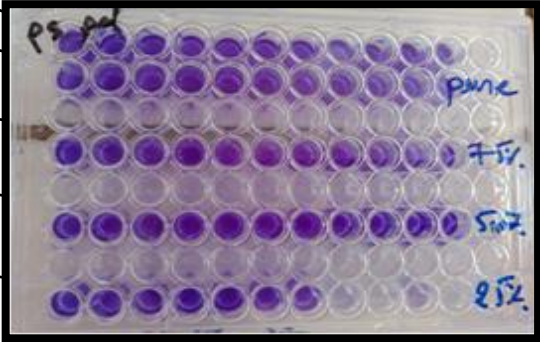
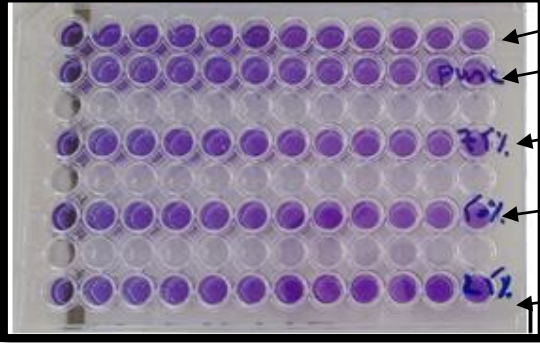

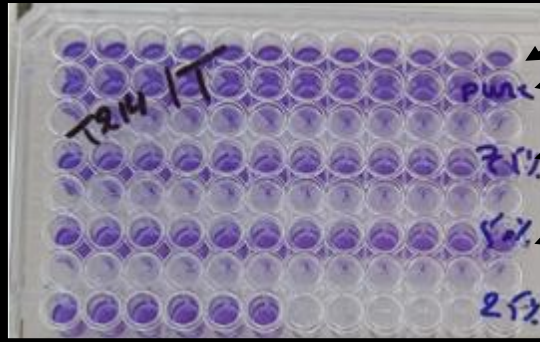

128. Wiskur B.J., Hunt J.J., Callegan M.C. Hypermucoviscosity as a Virulence Factor in Experimental *Klebsiella pneumoniae* Endophthalmitis. *IOVS*, 2008, Vol. 49(11), pp. 493.

Annexes

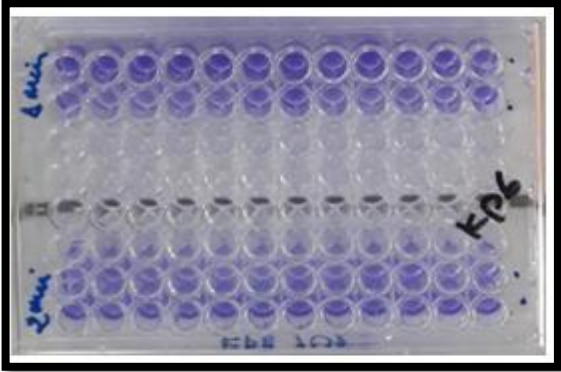
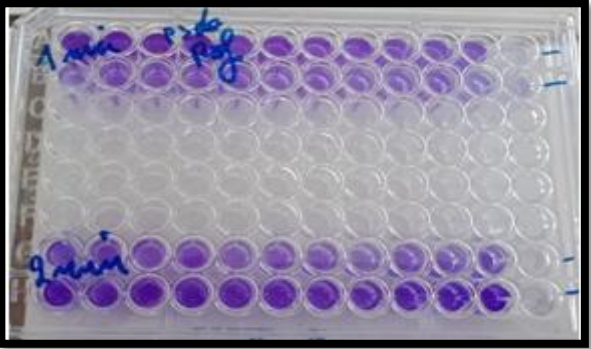
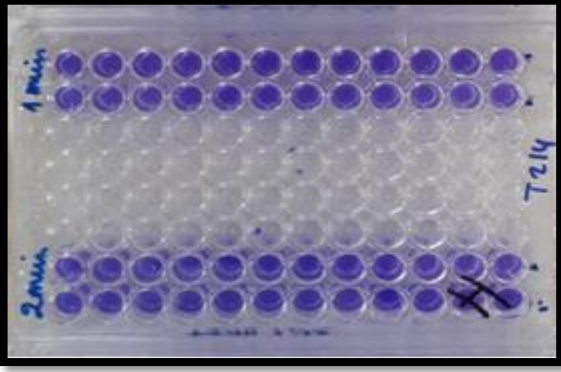
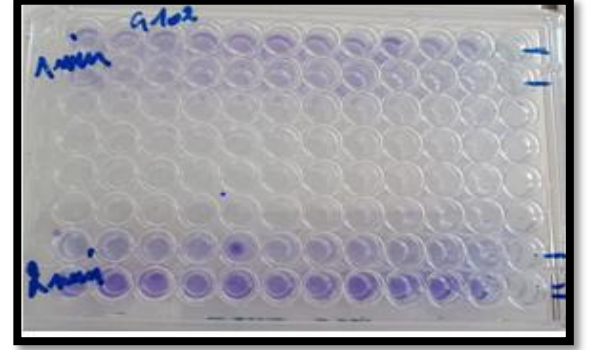
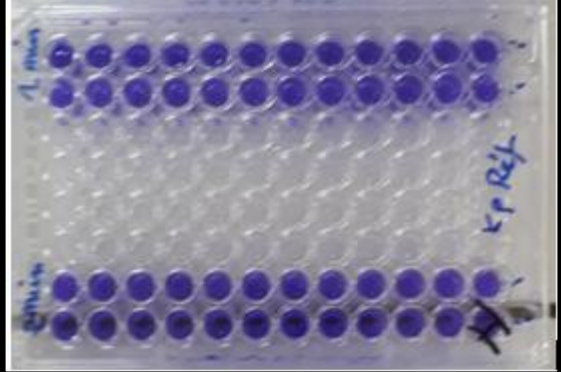
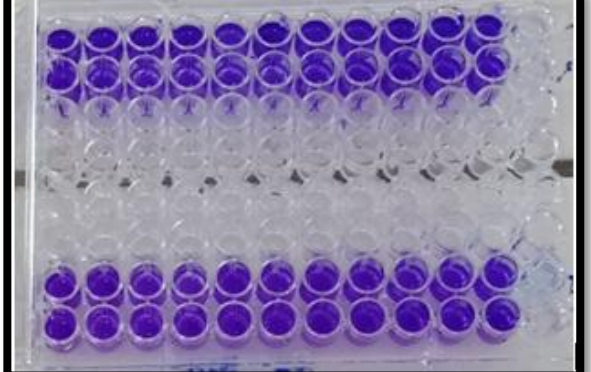
Annexe 1 : Résultats de la formation de biofilm par la technique de TCP

Les souches de <i>klebseilla pneumoniae</i>	Les souches de <i>Pseudomonas aerugenosa</i>
 <p>Témoin Kp1 Kp2 Kp3 Kp4 Kp5 Kp6 Kp7</p>	 <p>Témoin Ps1 Ps2 Ps3 Ps4 Ps5 Ps6 Ps7</p>
 <p>Témoin Kp8 Kp9 Kp10</p>	 <p>Témoin Ps8 Ps9 Ps10 Ps11 Ps12 Ps13 Ps14</p>
	 <p>Témoin Ps15 Ps16 Ps17 Ps18 Ps19 Ps20 Ps21</p>

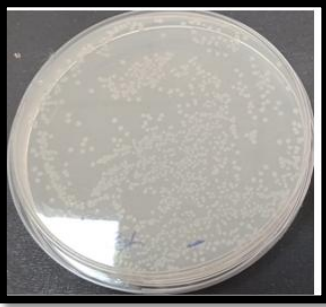
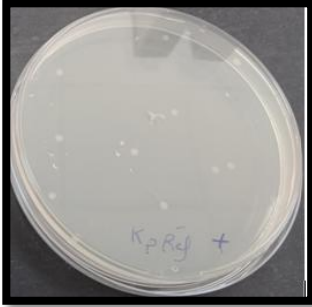



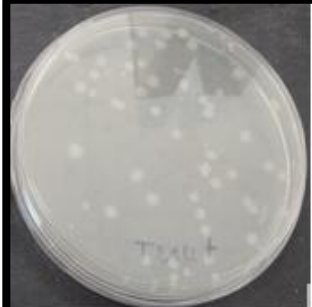


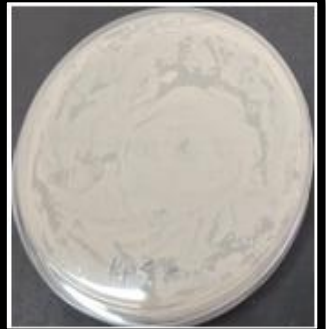



Annexe 2 : Résultats d'effet des concentrations du désinfectant sur les bactéries étudiées

Les souches de <i>klebseilla pneumoniae</i>	Les souches de <i>Pseudomonas aerugenosa</i>
 <p>Résultat de la souche K1</p>	 <p>Résultat de la souche Ps16</p>
 <p>Résultat de la souche K3</p>	 <p>Résultat de la souche Ps1</p>
 <p>Résultat de la souche K2</p>	 <p>Résultat de la souche Ps2</p>

Annexe 3 : Résultats de l'effet du temps de séchage sur l'adhésion des souches isolées.

Les souches de <i>klebsiella pneumoniae</i>	Les souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
 <p>Résultat de la souche K4</p>	 <p>Résultat de la souche Ps16</p>
 <p>Résultat de la souche K2</p>	 <p>Résultat de la souche Ps2</p>
 <p>Résultat de la souche K1</p>	 <p>Résultat de la souche Ps1</p>

Annexe 4 : Résultats de dénombrement

Les souches de <i>klebsiella pneumoniae</i>		Les souches de <i>Pseudomonas aerugenosa</i>	
Sans désinfectant	Avec désinfectant	Sans désinfectant	Avec désinfectant
			
			
			

Annexe 5 : Résultats de la technique de MATS pour les souches de *klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Les souches	Solvant		
	Hexane	Hexadecane	Chloroforme
Ps1	Hydrophile (12,34%)	Moyenement hydrophile (34,56%)	Moyenement hydrophile (34,09%)
Ps2	Hydrophile (17,58)	Moyenement hydrophile (39,13%)	Moyenement hydrophile (31,52%)
Ps16	Moyenement hydrophile (37%)	Hydrophobe (48%)	Moyenement hydrophile (36%)
Kp1	Hydrophile (7,40%)	Hydrophile (8,64%)	Hydrophile (8,64%)
Kp2	Hydrophile (18,82%)	Moyenement hydrophile (22,35%)	Hydrophile (10,58%)
Kp3	Moyenement hydrophile (29,47%)	Moyenement hydrophile (22,10%)	Hydrophile (2,10%)
Kp4	Hydrophile (17,5%)	Moyenement hydrophile (21,25%)	Hydrophile (3,%)