

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



Université de Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et
Sciences de la Terre et de l'Univers



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

*Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et
à l'Environnement*
« LAMAABE »

Mémoire de MASTER

Présenté par

DINEDANE Sabiha

KADDOUR Zoulikha

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option : Microbiologie et contrôle de qualité

**Effet du désinfectant (Glutaraldéhyde) sur le biofilm de trois
bactéries d'origine hospitalière - Etude comparative -**

Soutenu le 30/06/2020

Devant le jury :

Dr. BOUBLENTA Lamia	Maître de Conférences A	Président	Université de Tlemcen
Dr. BELLIFA Samia	Maître de conférences B	Examinatrice	Université de Tlemcen
Pr. HASSAINE Hafida	Professeur	Encadreur	Université de Tlemcen

Année Universitaire : 2019 – 2020

REMERCIEMENTS

On remercie Dieu, le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Madame **Hassaine Hafida** Professeur à l'université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, on la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel et consciencieux, pour sa patience, sa rigueur scientifique, ses multiples conseils, et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Notre vif remerciement pour les membres du jury à commencer par :

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 accepté d'examiner ce modeste travail, merci pour votre présence et vos encouragements. Qu'elle trouve ici notre profonde gratitude.

Nos remerciement s'adresse également à tous nos professeurs de l'université de Abou Bekr Belkaid- Tlemcen pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Nos profonds remerciements vont aussi à toutes les personnes qui nous ont aidés et soutenue de près de loin.

DÉDICACES

Avec l'aide de Dieu, le tout puissant et tous les gens qui m'ont soutenu j'ai pu achever ce modeste travail que je dédie :

À mes très chers parents,

Sources de mes joies, secrets de ma force, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices.

À mes très chères et adorables sœurs Loubna et Sanaa,

En témoignage de mon affection fraternelle, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde pour moi.

À tous les membres de ma famille, petits et grands,

À mon binôme Zokha,

Cette amie souriante à cœur blanc, témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble. Ce travail n'aurait jamais pu réussir sans ton optimisme et ta présence à mes côtés.

À toute la promotion « Microbiologie et contrôle de qualité 2019-2020 »

À toutes les personnes chères à mon cœur.

Sabiha

DÉDICACES

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

À ALLAH LE TOUT PUISSANT

À mes très chers parents :

Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler pour arriver à ce que je suis aujourd'hui. Merci pour vos patiences, soutiens, encouragements sacrifices, tendresses, et vos prières tout au long de mes études. Je vous serai reconnaissante toute ma vie, qu'Allah vous protège et vous accorde longue vie plein santé et de bonheur !

***À mes très chères sœurs :
Fatima Zohra et Amel***

En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous, je vous remercie pour votre hospitalité sans égal et votre affection si sincère je vous aime très fort mes chéries.

***À mes très chers frères :
Ahmed et Mohammed***

Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour vos soutiens et encouragements. Que Dieu Puisse consolider et pérenniser encore plus nos liens fraternels.

Mes chers petits neveux adorés : Rayane, Yanis, Chahine

A qui je souhaite un avenir radieux plein de réussite, je vous adore.

À mon binôme : Sabiha

Merci pour tous les souvenirs et les moments que nous avons passés ensemble, tes une amie formidable, je te souhaite plein d'autres réussites et beaucoup de bonheur.

À toute Ma famille et mes chers amis.

Zokha

Résumé

Les endoscopes jouent un rôle diagnostique et thérapeutique très importants, après chaque procédure endoscopique ils peuvent être contaminés par des germes opportunistes tels *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* et autres, pouvant engendrer des biofilms résistants aux désinfectants. Cette étude est une synthèse et comparaison des résultats de 3 masters antérieurs sur le rôle du désinfectant (Glutaraldéhyde), sa concentration et son temps de contact sur la croissance de ces 3 bactéries en mode biofilm isolées de canaux d'endoscope .

Les résultats ont montré que les *K. pneumoniae* et les *S. aureus* adhèrent et forment un biofilm plus rapidement sur supports abiotiques que les souches de *Pseudomonas aeruginosa*. La désinfection au glutaraldéhyde ne permet pas de les éradiquer indépendamment de sa concentration et de son temps de contact. Cela est dû probablement aux caractéristiques des parois bactériennes de ces espèces et du support étudié.

Le procédé de nettoyage et de désinfection des canaux l'endoscope nécessite alors une plus grande importance.

Mots clés : Endoscope, Contamination, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, biofilms, désinfection.

Abstarct

Endoscopes play a very important diagnostic and therapeutic role, after each endoscopic procedure they can be contaminated by opportunistic germs as *Klebseilla pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and others, which can generate biofilms resistant against disinfectant. This study is a synthesis and comparison of the results of 3 previous masters about the role of the disinfectant (Glutaraldehyde), its concentration and its contact time against the growth of these 3 bacteria in biofilm isolated from endoscope canals. The results showed that *K. pneumoniae* and *S. aureus* adhere and form a biofilm more quickly on abiotic supports than *Pseudomonas aeruginosa*.

Disinfection with glutaraldehyde doesn't eradicate them regardless of its concentration and contact time. This is probably due to the characteristics of the bacterial walls of these species and support studied

The cleaning and disinfection process of endoscope canals should requires greater importance.

Keywords : Endoscope, Contamination, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, biofilms, disinfection.

المخلص

تلعب المناظير الداخلية دورًا تشخيصيًا وعلاجيًا مهمًا للغاية، بعد كل إجراء بالمنظار يمكن أن تكون ملوثة عن طريق الجراثيم الانتهازية مثل كلبيسيلا الرئوية، بسودومناس أيغوجنوزة، المكورات العنقودية الذهبية، وغيرها والتي يمكن أن تولد اشربة حيوية (البيوفيلم) مقاومة للمطهرات.

هذه الدراسة عبارة عن حوصلة ومقارنة لنتائج 3 دراسات سابقة حول دور المطهر (الجلوتارالدهيد) ، وتركيزه ومدة الاتصال به على نمو هذه البكتيريا الثلاثة في وضع الاشربة الحيوية المعزولة من قنوات التنظير الداخلي.

أظهرت النتائج أن كلبيسيلا الرئوية والمكورات العنقودية الذهبية تلتصق وتشكل اشربة حيوية بسرعة أكبر على الدعامة اللاحيوية من سلالات بسودومناس أيغوجنوزة.

لا يسمح التطهير بالجلوتارالدهيد من القضاء عليها بغض النظر عن تركيزه ووقت الاتصال به ربما يرجع ذلك إلى خصائص الجدران البكتيرية لهذه الأنواع والدعامة الذي تمت دراستها. لذلك تتطلب عملية تنظيف وتعقيم قنوات المنظار الداخلي أهمية أكبر.

الكلمات الدالة : منظار داخلي ، تلوث ، بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية ، كلبيسيلا الرئوية ، بسودومناس أيغوجنوزة
الاشربة الحيوية ، التطهير

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	2
Première partie : Partie bibliographique	3
Chapitre I : Les infections associées à l’endoscopie	4
1. Les dispositifs médicaux : Endoscope	4
2. L’endoscopie digestive	4
3. La contamination des endoscopes	6
3.1.Infection endogène liées à l’endoscopie	6
3.2.Infection exogène liées à l’endoscopie	6
4. Micro-organismes contaminants l’endoscope digestive	7
4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
4.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
4.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
Chapitre II : Les biofilms et mécanisme d’adhésion sur l’endoscope	12
1. Définition de biofilm.....	12
2. Les étapes de formation d’un biofilm	12
2.1.Adhésion réversible	13
2.2.Adhésion irréversible	13
2.3.Formation de microcolonies (Maturation précoce)	13
2.4.Maturation du biofilm	13
2.5.Dispersion du biofilm	14
Chapitre III : Traitement des endoscopes	15
1. Traitement manuelle	15
2. Traitement automatisée.....	17
Deuxième partie : Matériel et méthodes	18
1. Lieu d’étude et souches étudiées	19
2. Revivification des souches isolées de l’endoscope.....	19
3. Isolement et purification	20
4. Identification par Galerie API 20E et Galerie API Staph	20
5. Conservation des souches	20

6. Détection de la production de biofilm chez les souches isolées	21
6.1.Méthode de plaque de culture de tissus (TCP)	21
6.2.Détection de la production de slime sur milieu Rouge Congo Agar (RCA).....	23
7. Cinétique de la formation <i>in vitro</i> de biofilm sur tubulures à différentes conditions.....	23
8. Evaluation <i>in vitro</i> de l'efficacité du désinfectant (Glutaraldyde) de type stéranios sur la formation de biofilm sur microplaques de 96 puis	24
Troisième partie : Résultats et discussion	25
1. Revivification des souches étudiées et analyse microbiologique	26
2. Identification par Galerie API 20 E et Galerie API Staph.....	28
3. Evaluation de la formation de biofilm chez les souches isolées d'endoscopes.....	29
3.1.Technique de microplaques 96 puits (TCP).....	29
3.2.Evaluation de la formation de biofilm par la méthode RCA	32
4. Cinétique de la formation <i>in vitro</i> du biofilm par les souches isolées de canaux d'endoscope.....	34
5. Résultats de différents paramètres influençant la formation de biofilm sur tubulures d'endoscope.....	40
Conclusion	46
Références bibliographiques	48

Liste des abréviations

ATNC : Agents Transmissibles Non Conventionnels

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CV : Cristal violet

DM : Dispositif Médicaux

DO : Densité optique

EDS : Eau Distillé Stérile

ELISA : Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay

EPS : Exopolysaccharides

K. pneumoniae : *Klebsiella pneumoniae*

LDE : Laveur-Désinfecteur-d'Endoscope

LPS : lipopolysaccharides

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

RCA : Rouge Congo Agar

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

TCP : Plaque de Culture de Tissus

TSB : Le Tryptic Soy Broth

UFC : Unité(s) formant colonie(s)

Liste des figures

Figure1 : Endoscope souple	5
Figure 2 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en microscopie électronique	8
Figure 3 : Observation microscopique de <i>Klebsiella pneumonia</i>	9
Figure 4 : Le staphylocoque doré	10
Figure 5 : Les étapes de la formation du biofilm	12
Figure 6 : Type de fibroscope utilisé au service de gastro-entérologie du CHU Tlemcen.....	19
Figure 7 : Etapes de la détection et lecture de biofilm par méthode TCP.....	22
Figure 8 : Le désinfectant utilisé au service gastro-entérologies	24
Figure 9 : Aspect des différentes colonies isolées sur milieux sélectifs	26
Figure10 : Aspect des souches après coloration de Gram.....	27
Figure 11 : Aspect de <i>Staphylococcus aureus</i> suite à une coloration de Gram	27
Figure12 : Revivification des souches par Galerie API Staph et API 20E.....	28
Figure 13 : Résultats de la quantification de la formation de biofilm <i>in vitro</i> par les souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolées de canaux d'endoscopes	29
Figure 14 : Résultats de la quantification de la formation de biofilm <i>in vitro</i> par les souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolées de canaux d'endoscopes	30
Figure 15 : Résultats de la quantification de la formation de biofilm <i>in vitro</i> par les souches de <i>Staphylococcus aureus</i> isolées de canaux d'endoscopes	30
Figure 16 : Aspect des colonies de souches sur milieu Rouge Congo.....	33
Figure 17 : Cinétique de la formation du biofilm <i>in vitro</i> des souches <i>Pseudomonas aeruginosa</i> avec et sans désinfectant	37
Figure 18 : Cinétique de la formation du biofilm <i>in vitro</i> des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> avec et sans désinfectant.....	38
Figure 19 : Cinétique de la formation du biofilm <i>in vitro</i> des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> avec et sans désinfectant.....	39
Figure 20 : Effet des concentrations du désinfectant sur les bactéries de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> en mode biofilm de 24h pendant un temps de contact de 15min	41
Figure 21 : Effet des concentrations du désinfectant sur les bactéries de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> en mode biofilm de 24h pendant un temps de contact de 30 min.....	43

Liste des tableaux

Tableau 1 : Taxonomie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
Tableau 2 : Taxonomie de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
Tableau 3 : Taxonomie de <i>Staphylococcus aureus</i>	10
Tableau 4: Les différentes étapes d'une procédure de désinfection des endoscopes	16
Tableau 5 : Classification de l'adhérence bactérienne par la technique TCP.....	22
Tableau 6: Résultats de l'identification par Galerie API 20E et Galerie API Staph.....	28
Tableau 7 : Résultats de la technique de TCP	30
Tableau 8: Résultats de la méthode de Rouge Congo Agar (RCA).....	32

Introduction

Les procédures endoscopiques sont devenues des procédures médicales les plus couramment pratiquées. Pendant leur utilisation, les endoscopes peuvent être fortement contaminés par la flore du patient et provoquer des flambées infectieuses.

Ces dispositifs médicaux sont sensibles à la chaleur et donc une action de stérilisation n'est pas possible (**Oumokhtar, 2008**). Leur décontamination continue de poser un problème récurrent dans la lutte contre les infections associées aux soins.

Il n'y a pas de méthode infaillible de nettoyage et de désinfection de ces instruments largement utilisés et coûteux avant réutilisation. Le nettoyage approprié des endoscopes est une procédure compliquée et longue.

Des résidus cellulaires de patients et des biofilms bactériens ont été trouvés dans les canaux des endoscopes prêts à l'emploi où ils peuvent affecter l'efficacité des désinfectants et des stérilisants, augmentant le risque de transmission nosocomiale.

Les bactéries présentes dans les biofilms sont enfermées dans une matrice de polysaccharides (EPS) qui les aide à les protéger de l'environnement et augmente leur résistance aux biocides, ce qui diminue encore l'efficacité des agents de nettoyage et de désinfection.

Le but de cette étude était de faire une synthèse et comparaison de 3 travaux antérieurs effectués au même laboratoire portant sur une même méthodologie de détection et du suivi de la cinétique de formation de biofilm en présence et absence de désinfectant sur trois espèces de bactéries très largement retrouvées dans des contaminations de canaux d'endoscopes.

Notre rôle est d'essayer de comprendre le comportement de ces bactéries sessiles dans un biofilm mature vis-à-vis de concentrations différentes de désinfectant (Glutaraldéhyde) à différents temps de contact.

Partie bibliographique

Chapitre 1 : Les infections associées à l'endoscopie

Voir l'intérieur du corps humain pour en observer les anomalies fut, depuis toujours, un défi pour les médecins. L'endoscopie existe depuis le début du XIX^{ème} siècle et reste largement répandue dans le monde médical (**Camran, 2001**).

1. Les dispositifs médicaux : Endoscope

Il n'a jamais été facile de donner une définition d'un dispositif médical. Cette difficulté est liée notamment au nombre et à la diversité de ces dispositifs.

Le groupe de travail sur l'harmonisation mondiale (GHTM) a proposé en 2005 une définition dans laquelle il considère le dispositif médical (DM) tout appareil, instrument, machine, ou agent d'étalonnage *in vitro*, dont l'action principale sur le corps humain, n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques, métaboliques ou immunologiques, et qui est orienté(e) à être utilisé(e) pour les buts suivants : diagnostic, prévention, suivi, traitement ou atténuation d'une maladie (**Global Harmonization, 2005**).

Les endoscopes sont parmi les plus importants dispositifs médicaux qui jouent un rôle diagnostique et thérapeutique et qui sont très fréquemment pratiqués.

2. L'endoscopie digestive

L'endoscopie est un terme générique, qui signifie « regarder à l'intérieur ». C'est une technique d'observation, de prélèvement et d'exérèse chirurgicale pratiquée en introduisant un endoscope ou un fibroscope à l'intérieur du corps humain. Elle se fait par les voies naturelles lorsque cela est possible, autrement par incision (**Galtier, 1924**).

L'endoscopie digestive est un examen médical permettant d'observer l'intérieur du tube digestif (l'estomac, l'intestin, l'œsophage) à travers des orifices naturels, ainsi que la réalisation de gestes locaux diagnostiques (biopsies ou ponctions) et thérapeutiques, grâce à l'introduction d'un câble souple équipé d'une caméra et d'une lampe [(**Redah et al., 2001**) ; (**El Khomssi, 2017**)].

Les endoscopes souples ont des structures complexes composés de nombreuses pièces différentes dotés d'une zone très flexible de béquillage au niveau distal commandée par l'opérateur pour permettre de les guider dans les tortuosités de l'anatomie à explorer [(**Palazzo, 2011**) ; (**David, 2017**)]. Ils sont plus complexes à nettoyer et ne supportent pas de procédé de stérilisation à haute température (**Shumway et Broussard, 2003**) (**Figure 1**).



Figure 1 : Endoscope souple (Leusse *et al.*, 2007).

Un endoscope digestif est composé de plusieurs parties :

- **Embout distal** : C'est la partie la plus fragile mais la plus importante de l'endoscope. Elle est constituée des 9 à 15 cm du tube d'insertion. Cette extrémité distale contient les lentilles et le projecteur qui permet la diffusion de la lumière et parfois même une sortie air-eau, ou bien une sortie d'aspiration (Duport et Decousser, 2012).
- **Tube d'insertion** qui regroupe les circuits électroniques permettant la transmission de l'image.
- **Canal opérateur** pour réaliser des prélèvements et l'aspiration des liquides ou mucosités
- **Canal d'insufflation et de lavage** permettant d'insuffler de l'air et dilater la cavité gastrique ou de l'eau pour laver l'objectif de l'endoscope (Dumortier et Leusse, 2006).

3. La contamination d'endoscopie

Comme tous les dispositifs médicaux pratiqués en médecine, l'endoscopie est à risque de transmettre des infections.

La structure complexe des endoscopes rend possible une accumulation de souillures organiques (liquides biologiques ou tissus), ou minérales (dépôts de calcium ou de magnésium) en certains points, plus ou moins accessibles au nettoyage, à la désinfection et au séchage. Ces souillures peuvent elles-mêmes renfermer des agents infectieux et constituent des points d'ancrage des germes et des substrats favorables à la multiplication de micro-organismes. Une fréquence ou une qualité insuffisante de traitement peut aboutir à la formation d'un biofilm [(Spach *et al.*, 1993) ; (Nelson, 2003) ; (Kovaleva *et al.*, 2013)].

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 Laveur-Désinfecteur d'Endoscope (LDE), d'une solution d'irrigation (**Deflandre et al., 2001**).

3.1. Infections endogènes liées à l'endoscopie

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 micro-organismes (**Marchetti, 2005**). Dans ce cas, après utilisation de l'endoscope la présence d'une flore microbienne riche est inévitable.

L'infection peut être 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, 2016**).

3.2. Infections exogènes liées à l'endoscopie

L'endoscope peut être contaminé soit par le patient ou l'environnement, il s'agit d'une contamination croisée. La contamination des endoscopes peut être due à différents paramètres [(**Bécheur et al., 2000**) ; (**GREPHH, 2016**)]:

- Un problème de conception de l'endoscope rendant difficile son entretien.
- Une rupture de la chaîne de traitement (défaut de pratiques, dysfonctionnement d'un procédé de nettoyage ou de désinfection de l'endoscope).
- Une contamination du LDE.
- Une contamination des fluides de traitement (produit, eau de rinçage).

Des contaminations par des mycobactéries résistantes au glutaraldéhyde et des souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont pu être retrouvées au niveau de LDE. Les micro-organismes sont généralement véhiculés par l'endoscope. La contamination se situe au niveau des canaux internes de l'appareil (**Systchenko, 2000**).

Les infections exogènes sont associées à l'endoscopie mais peuvent être évitées par des procédures de désinfection bien contrôlées. Les micro-organismes exogènes les plus fréquemment associés à la transmission sont *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella spp*. Ces micro-organismes peuvent être transmis après utilisation soit par un endoscope contaminé ou par un équipement auxiliaire (**Kovaleva et al., 2013**).

4. Micro-organismes contaminants l'endoscope digestive

Les micro-organismes responsables à des transmissions iatrogènes lors de l'endoscopie sont des bactéries à Gram négatif dont *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et quelques espèces de *Salmonella* et *Helicobacter pylori* (Nelson, 2003).

D'autres espèces bactériennes à Gram positif sont également retrouvées tels les *Streptocoques*, *Staphylococcus aureus* [(Chapuis, 2006) ; (Petignat *et al.*, 2008) ; (Kovaleva *et al.*, 2009)].

4.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa appartient à un vaste groupe de bactéries qui reçoit la dénomination de "non-fermentant" (Meghdas *et al.*, 2004). 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) (Tableau 1).

Tableau 1 : Taxonomie de *Pseudomonas aeruginosa* (Elmeskini, 2011).

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Prokaryota</i>
Division	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif, qui se présente sous forme de bâtonnets droits et fins de 1 à 3 µm de long et 0,5 à 0,8 µm de large [(Sefraoui, 2015) ; (Denis *et al.*, 2016)] (Figure 2), dépourvus de spores et de capsule mobiles grâce à une ciliature polaire en général monotriche [(Hafiane et Ravaoarino, 2008) ; (Touati *et al.*, 2013)], leur mobilité est très vive en aérobiose (Morris *et al.*, 2013).

C'est un germe hydro-tellurique ubiquitaire, plus répandu dans les zones humides (eaux polluées, les sols, les lacs, les rivières, les végétaux), mais aussi sur matériel médical (endoscopes, nébulisateurs, respirateurs artificiels, équipements de dialyse, bains marie,

solutions antiseptiques) (Cabrolier *et al.*, 2014), où il vit à l'état saprophyte (Kerr et Snelling, 2009).

Pseudomonas aeruginosa possède de nombreux facteurs de virulence, dont certains 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 comme des élastases, des protéases et des phospholipases qui dégradent les composés cellulaires de l'hôte (Hall *et al.*, 2016).

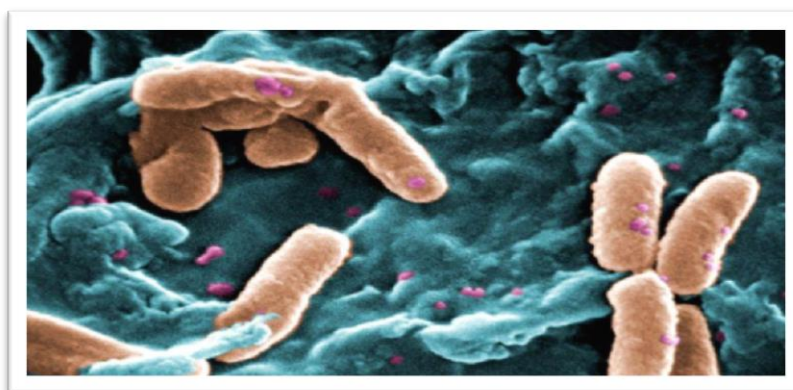


Figure 2 : *Pseudomonas aeruginosa* en microscopie électronique grossissement X400 (Aissa, 2012).

4.2. *Klebsiella pneumoniae*

La taxonomie du genre *Klebsiella* a été révisée à de nombreuses reprises, mais la classification la plus communément admise est de *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Tableau 2).

Tableau 2 : Taxonomie de *Klebsiella Pneumoniae* (Kouch, 2015).

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Klebsiella</i>
Espèce	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Le genre *Klebsiella* connue sous le nom de *pneumobacille* de Friedlander, est une espèce ubiquitaire, répandue dans des eaux de surface, des eaux usées, des effluents industriels, du sol, du bois et des végétaux. Elle existe également à l'état commensal sur la peau et les muqueuses des animaux et l'homme [(Bagley *et al.*, 1978) ; (Dong *et al.*, 2003) ; (El-Fertas-Aissani *et al.*, 2013)] (Figure 3).

La pathogénicité de *Klebsiella pneumoniae* se traduit par plusieurs 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), comme la capsule, les endotoxines, les fimbriae (de type 1 et 3).



Figure 3 : Observation microscopique de *Klebsiella pneumonia* grossissement X400 (Kouch, 2015).

4.3. *Staphylococcus aureus*

Selon la 9ème édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Tableau 3), les staphylocoques sont classés parmi les bactéries à Gram positif pauvres en GC (Schaechter, 1999)

Tableau 3 : Taxonomie de *Staphylococcus aureus*

Phylum	<i>Firmicutes</i>
Domaine	<i>Bacteria</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Staphylococcaceae</i>
Genre	<i>Staphylococcus</i>
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

Staphylococcus aureus, espèce type du genre *Staphylococcus*, parfois appelée staphylocoque doré, sont des cocci de 0,5 à 1.5 µm de diamètre (**Figure 4**). Elles sont immobiles, non sporulés, La majorité sont capsulés mais ils peuvent perdre leur capsule après culture (**Norden et al., 1986**).

S. aureus est une bactérie ubiquitaire que l'on retrouve fréquemment sur la peau et les muqueuses de l'homme, c'est l'un des principaux agents étiologiques des infections superficielles et profondes ainsi que des syndromes liés à l'action des toxines.

La base de la colonisation de *S. aureus* est complexe et mal connue, mais semble impliquée dans le contact de la bactérie avec son hôte ainsi que dans son aptitude d'adhésion et d'évasion aux défenses immunitaires. Les patients porteurs de *S. aureus* ont plus de risque de développer une infection que les autres (**Wertheim et al., 2005**).

Les facteurs de virulence identifiés sont nombreux chez les staphylocoques. Ils sont codés par des gènes localisés sur le chromosome ou sur les éléments génétiques mobiles (**Fomba, 2006**).

Les staphylocoques sécrètent une quantité impressionnante de toxines et d'enzymes hydrolysant différents constituants cellulaires. Ces toxines et enzymes extracellulaires contribuent à la pathogénie des staphylocoques (**Bisognano et al., 2000**).

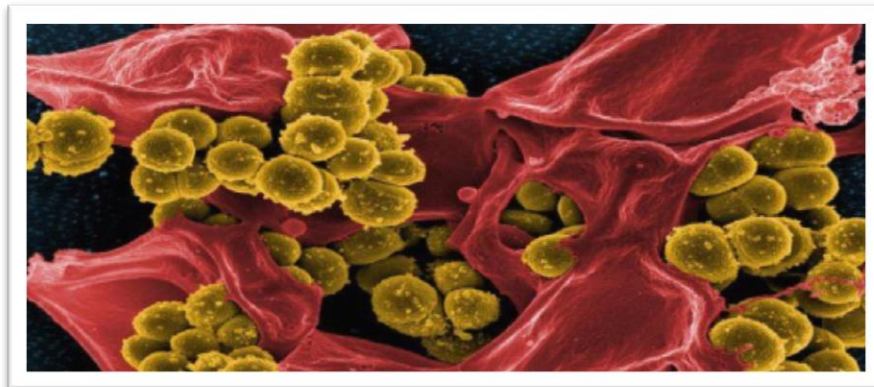


Figure 4 : Le staphylocoque doré sous microscope électronique grossissement X400 (**Guallar, 2015**).

Chapitre 2 : Les biofilms et mécanisme d'adhésion

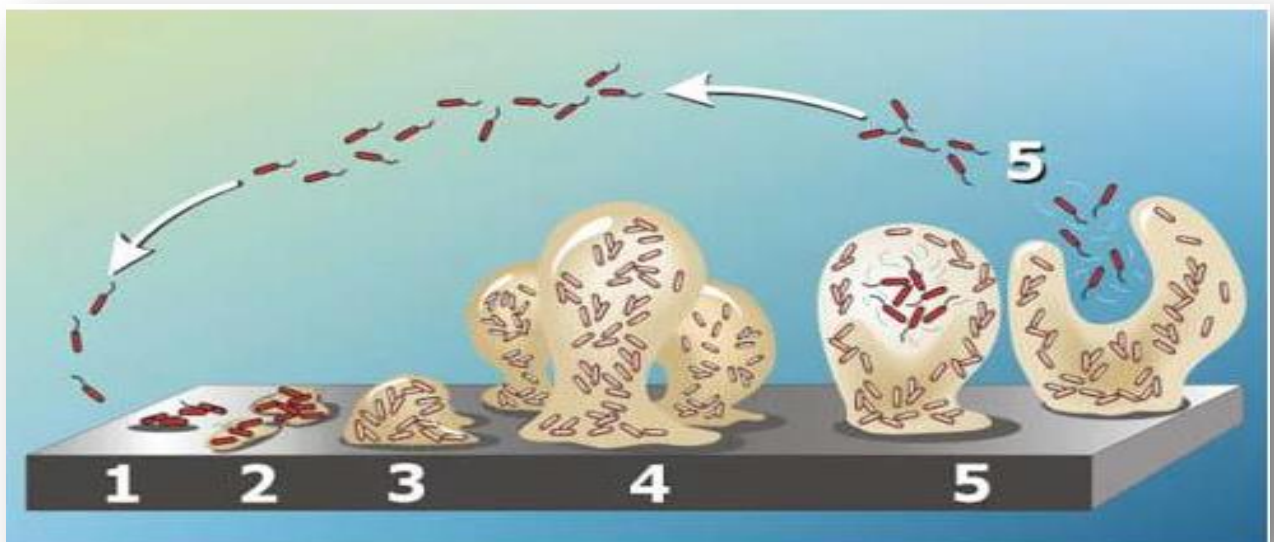
L'endoscope flexible dont l'endoscope digestif est composé des canaux multiples et des ports qui peuvent recueillir facilement la matière organique et donc fournir les conditions optimales pour la croissance de biofilms, même si les protocoles de retraitement sont appliqués (Kovaleva *et al.*, 2013). De même si la qualité de traitement est insuffisante, elle peut aboutir aussi à la formation d'un biofilm (Pozzetto, 2007). Dans la nature, environ 90 % des bactéries adoptent un mode de vie en biofilm.

1. Définition de biofilm

Les biofilms sont des communautés de microorganismes, composées de bactéries et/ou moisissures de diverses espèces, se développant sur des surfaces et entourées par une matrice extracellulaire qui les protège des agressions extérieures (Lebeaux *et al.*, 2016). Environ 80% des infections bactériennes chroniques sont associées à la présence de biofilms (Chalvet, 2009).

2. Les étapes de formation de biofilm

La formation d'un biofilm représente un processus dynamique et complexe (Costerton, 1999), passe par plusieurs étapes : (Figure 5)



1 : Phase d'adhésion réversible, **2** : Phase d'adhésion irréversible, **3** : Phase de la formation de microcolonies, **4** : Phase de maturation du biofilm, **5** : Phase de dispersion des cellules

Figure 5 : Les étapes de la formation du biofilm (Beloin et Ghigo, 2005)

2.1. Adhésion réversible

L'adsorption réversible met en jeu des forces d'interaction différentes, notamment les forces de **London-van der Waals**, les interactions électrostatiques et les interactions de Lewis. L'ensemble est modélisé par la théorie dite XDLVO [(**Van Oss, 1995**); (**Wang et al., 2011**)]. Suite à cette adsorption, deux évolutions sont possibles : soit le microorganisme est désorbé et retourne dans la phase liquide, soit il parvient à rester fixé et passe donc à l'étape d'adhésion irréversible.

2.2. Adhésion irréversible « engagement »

La sécrétion d'exopolymères par les bactéries permet de consolider leur fixation au support. Dans ce cas, l'adhésion devient irréversible grâce à des interactions spécifiques entre les composants superficiels bactériens (adhésines) et les récepteurs de surface de la cellule hôte ou de la sonde avec des liaisons de type hydrophobe [(**Spiers et al., 2003**) ; (**Kuchma et al., 2005**)]. Et surtout grâce à des structures d'adhésion variant selon les types de microorganismes concernés (**Beloin et Ghigo, 2005**).

Pour les bactéries Gram-négatives, il s'agit des pili, des curli, des capsules et du glycocalix. Alors que pour les bactéries Gram-positives, il s'agit des acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix. D'autres bactéries vivant presque uniquement fixées (comme par exemple *Caulobacter* ou *Hyphomicrobium*) utilisent des structures spécifiques comme le pédoncule ou la gaine (**Van Houdt et Michiels, 2005**).

2.3. Formation de microcolonie : « maturation précoce »

Une fois l'attachement des bactéries irréversibles, les bactéries commencent à se diviser et à former des microcolonies qui vont recouvrir toute une partie de la surface [(**Chmielewski et Frank, 2003**) ; (**Stanley et al., 2003**)].

2.4. Maturation du biofilm

Au sein d'un biofilm mature, les microorganismes sont séparés par des ports aqueux qui forment un réseau de circulation permettant d'une part d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions enfuies du biofilm et d'autre part d'évacuer les déchets (**Filloux et Vallet, 2003**).

Le développement des microcolonies traduit le stade de maturation du biofilm et la colonisation de nouvelle surface (**Roux et Ghigo, 2006**).

Les colonies se trouvent normalement séparées les unes des autres par des canaux où circule le flux du milieu qui permet la diffusion des nutriments, d'oxygène et parfois d'agents antimicrobiens (**Donlan, 2002**), et l'évacuation des produits issus du métabolisme bactérien (**Costerton, 1999**). Finalement l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte durant la phase de maturation (**Clutterbuck et al., 2007**).

2.5. Dispersion de biofilm

Lorsque l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte, le biofilm subit des phénomènes de dispersion. La dispersion est l'étape permettant aux microorganismes au sein du biofilm de retourner à un état planctonique. Celle-ci permet aux individus de promouvoir une diversité génétique, de fuir un environnement défavorable ou bien de coloniser de nouvelles niches écologiques engendrant la formation d'autres biofilms [(**Parsek et Greenberg, 2005**) ; (**Clutterbuck et al., 2007**) ; (**Sauer et al., 2007**)].

La dispersion peut être active ou passive. La dispersion active est initiée par les bactéries mêmes du biofilm afin de s'échapper de celui-ci. Il s'agit donc d'une dispersion relevant de mécanismes biologiques [(**Morgan et al., 2006**) ; (**Baudin, 2017**)].

La dispersion passive est quant à elle relayée par des forces externes appliquées au biofilm qui décrochent les bactéries du biofilm. Il s'agit donc d'une dispersion relevant de mécanismes physicochimiques [(**Flemming, 2011**) ; (**McDougald et al., 2012**)].

Chapitre 3 : Traitement des endoscopes

Les endoscopes sont des dispositifs médicaux exposés à des contaminations menant à des menaces cliniques, donc ils doivent être nettoyés et désinfectés après chaque utilisation en évitant la contamination et le risque d'infection croisée lors des futures interventions endoscopiques (**Chapuis, 2006**).

Le traitement des endoscopes doit être effectué immédiatement après chaque acte endoscopique. Il concerne la réduction du nombre de micro-organismes vivants avec élimination de tout germe pathogène pour lutter contre les infections graves liées à la santé dues au biofilm, de nombreux types de recherches sur les antimicrobiens ont été menés en matière de désinfection hospitalière et de retraitement des endoscopes [(**Marion et al., 2003**) ; (**Aumeran et al., 2012**)].

On distingue classiquement deux traitements : manuelle et automatisé.

1. Traitement manuel

Le traitement manuel des endoscopes consiste à éviter la contamination de ces dispositifs médicaux, prévenir les différents risques infectieux exogènes et la transmission pour chaque patient soumis à l'endoscopie. Elle concerne aussi bien la transmission à d'autres patients qu'à des membres du personnel. C'est pourquoi certaines précautions doivent être prises (**Conseil Supérieur d'Hygiène, 1996**).

L'endoscope doit être totalement immergeable, irrigable et débranché de sa source pour assurer un bon traitement de qualité satisfaisante (**Gervaise, 2008**).

Les erreurs humaines aussi possibles pendant le nettoyage manuel peuvent comprendre le nettoyage incomplet des canaux d'endoscope parce que le personnel de retraitement des endoscopes ne les connaissait pas, la mauvaise évaluation si les canaux fuient ou sont bloqués, et aussi l'évacuation insuffisamment de liquide dans tous les canaux (**Choi et Cho, 2015**).

Le traitement manuel des endoscopes comporte 7 étapes (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Les différentes étapes d'une procédure de désinfection des endoscopes
(El Khomssi, 2017).

Etapes	Objectifs spécifiques	Modalité
1) Prétraitement	-Faciliter le nettoyage. -Abaisser le niveau de Contamination.	Test d'étanchéité - Essuyage de la partie externe de l'endoscope - Aspiration et rinçage des canaux à l'eau de réseau - Transport vers le local de traitement des endoscopes
2) Premier nettoyage Au moins 10 min	-Eliminer les souillures	Immersion complète - Lavage manuel comportant : essuyage de la gaine, démontage des différents éléments, écouvillonnage de tous les canaux -Brossage des extrémités, optiques, valves et pistons -Irrigation et purge de tous les canaux –Rinçage
3) Second nettoyage Au moins 5 min	-Eliminer les souillures	Renouvellement de la solution détergente - Immersion complète de l'endoscope - Irrigation active de tous les canaux
4) Rinçage intermédiaire	-Eliminer les Matières organiques, les micro-organismes résiduels et toutes traces de détergent	Rinçage abondant - Irrigation de tous les canaux - Purge de tous les canaux - Rinçage externe à l'eau du réseau
5) Désinfection	-Réduire ou détruire les microorganismes et les ATNC	Trempe dans produit désinfectant - Immersion de l'endoscope - Irrigation puis purge de tous les canaux
6) Rinçage terminal	-Eliminer les résidus de produit désinfectant	Rinçage abondant - Eau de qualité adaptée en fonction des objectifs
7) Séchage	-Eviter la re-contamination	séchage à l'air médical ou à l'alcool à 70° + air médical
8) Utilisation Immédiate et Stockage	-Eviter la re-contamination	Dans un endroit propre, sec, à l'abri de toute source de contamination microbienne - Stockage > 12h ⇒ nouvelle désinfection

2. Traitement automatisé

Le traitement automatisé est effectué par des machines (laveurs-désinfecteurs d'endoscope (LDE) 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**).

Cette procédure comporte 6 étapes qui sont :

- Le pré traitement.
- Une étape préalable à la mise en LDE.
- Le rinçage préliminaire.
- Le traitement en LDE.
- Le séchage avant stockage.
- Le nettoyage du LDE en fin de programme (**Thomas, 2018**).

Le traitement automatisé devra autant que possible être privilégiée en raison de sa meilleure reproductibilité et standardisation. Il permet également d'améliorer la traçabilité ainsi que de diminuer l'exposition des professionnels aux agents chimiques (**Conseil Supérieur d'Hygiène, 1996**).

Matériel et méthodes

1. Circonstances de l'étude

Suite aux situations de cette année 2020, la pandémie du Covid-19, la fermeture des laboratoires de recherche et par conséquent des universités, notre thème d'origine n'a pu voir le jour. Néanmoins, un autre sujet de master nous a été proposé et qui était de faire une synthèse de travaux antérieurs de 3 masters portant sur l'étude de quelques paramètres d'adhésion de différentes souches isolées d'endoscopes dans des quelques établissements hospitaliers et de pouvoir faire des comparaisons.

Tout de même nous avons tenu présenter cette partie Matériel et Méthodes afin de mieux cerner notre sujet de pouvoir connaître les techniques de les comparer et de les discuter.

Les étudiants des 3 masters antérieurs ont pu réaliser ces différentes techniques.

2. Revivification des souches isolées de l'endoscope

Les souches bactériennes, 10 souches de *Klebsiella pneumoniae*, 21 souches de *Pseudomonas aeruginosa* et 5 souches de *staphylococcus aureus* d'origine hospitalière, isolées de canaux d'endoscopes de type PENTAX® (Figure 6), 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.



Figure 6 : Type de fibroscope utilisé au service de gastro-entérologie du CHU Tlemcen.

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 :

- Le milieu Mac Conkey favorisant la croissance des entérobactéries grâce à la présence du cristal violet (inhibition de la flore gram (+) et aux sels biliaires (sélection des entérobactéries)).

- Le milieu de Chapman sélectionnant les *staphylocoques* grâce à la présence du mannitol et d'une concentration élevée de NaCl qui inhibe la plupart des autres bactéries.
- Le milieu Cétrimide pour la recherche des *Pseudomonas*, ce milieu est un ammonium quaternaire qui inhibe la croissance de la plupart des autres espèces bactériennes.

Les boîtesensemencées sont incubées à 37°C pendant 18-24 heures.

3. Isolement et purification

Après incubation des milieux sélectifsensemencés, Les colonies sont repérées selon leurs aspects morphologiques puis elles sont isolées et purifiées sur les même milieux jusqu'à l'obtention de colonies pures qui seront identifiées par une :

- Etude de leur caractère macroscopique (aspects des colonies sur milieux gélosés).
- Etude de leur caractère microscopique (forme des bactéries et coloration de Gram).

4. Identification par Galerie API 20E et Galerie API Staph

Les galeries API reposent l'utilisation de tests biochimiques miniaturés sous forme de microtubes prêts à l'emploi contenant le substrat lyophilisé nécessaire aux différents tests biochimiques. Les substrats reconstitués suivant les recommandations du fabricant, sont examinés après incubation à 37°C pendant 24h, les réactions produites sont révélées par des virages colorés spontanés ou par addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide de la matrice d'identification et nous permet d'établir un biotype de l'isolat. Après l'incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture

L'identification par galerie API 20E nous a permis de confirmer et caractériser les souches de *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* appartenant avec des biotypes différents et la galerie API staph pour les souches de *Staphylococcus aureus* avec des différents profils.

5. Conservation des souches

Toutes les souches identifiées sont conservées en double réplique sur une gélose nutritive inclinée +4°C ou sur le glycérol.

6. Détection de la production de biofilm chez les souches isolées

Cette partie de l'expérimentation à porte sur la détection de la formation de biofilm chez les souches isolées. En l'occurrence deux méthode sont été employées: la technique de

microplaque 96 puits par coloration au cristal violet et la méthode par ensemencement sur milieu Rouge Congo (RCA).

6.1. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP)

La méthode de plaque de culture de tissus (TCP) décrit par **O'Toole *et al.* (2000)** permet une évaluation quantitative de la formation du biofilm.

À partir d'une culture pure et jeune de 24h, on ensemence 5 mL de TSB, qu'on incube à 37°C pendant 18 à 24h (**Tré-Hardy *et al.*, 2008**).

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 en condition statiques, les puits de la microplaque sont vides de leur contenu puis lavés trois fois consécutives avec 0.2 mL d'eau physiologique stérile.

Les biofilms ainsi formés par l'adhésion des bactéries sessiles sont colorés avec du Cristal Violet (CV) à 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 distillée stérile (EDS) 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 (95%) pour libérer le colorant fixe au sein des cellules emprisonnées dans le biofilm ainsi formé (**Hassaine *et al.*, 2017**).

Les densités optiques (DO) de tous les puits sont déterminées par l'intermédiaire d'un lecteur ELIZA à une longueur d'onde 570 nm (**Figure 7**).

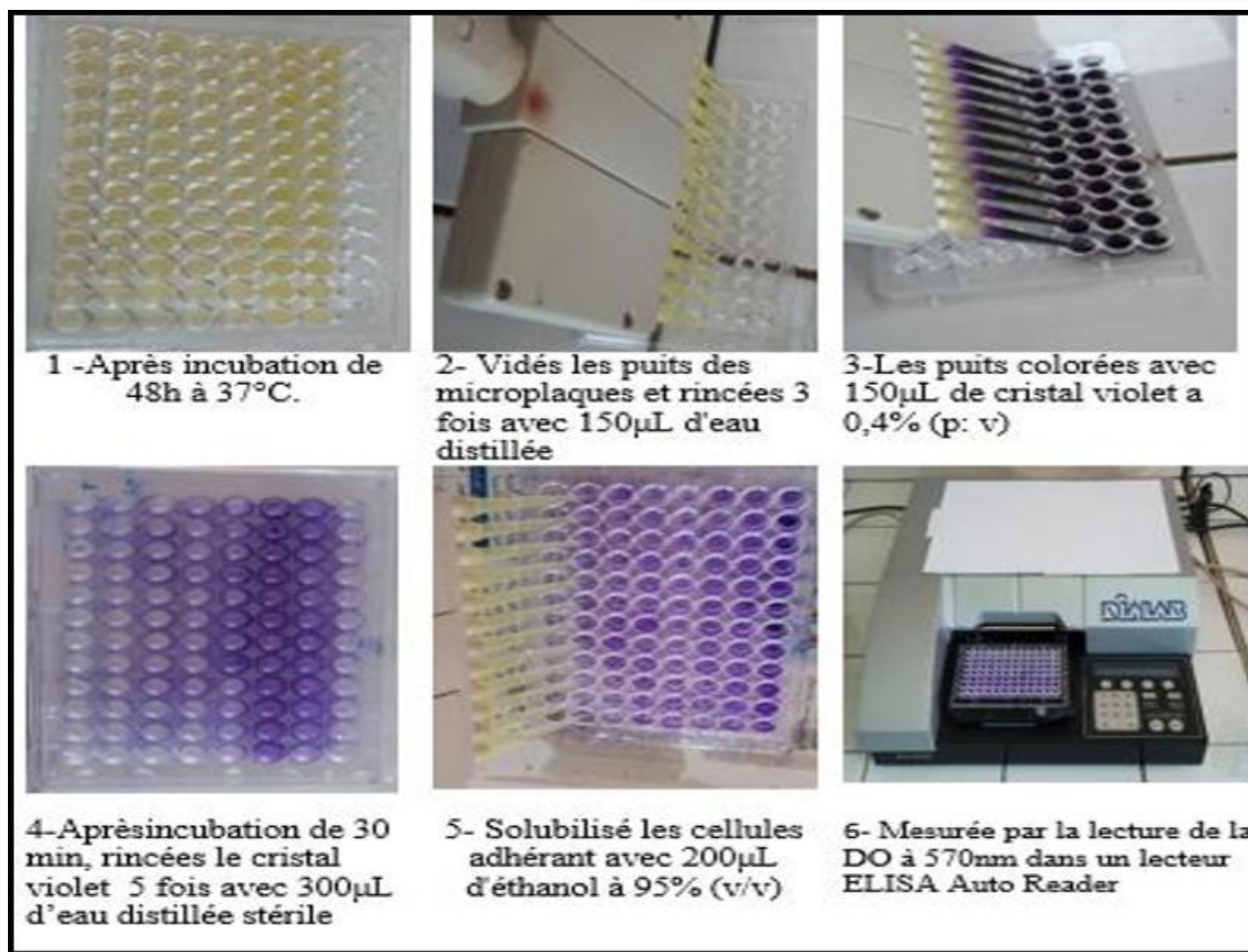


Figure 7 : Etapes de la détection et lecture de biofilm par méthode TCP.

Selon les travaux de **Christensen *et al.* (1985)** et de **Hola et Ruzicka (2011)**, les souches compte tenu de leur pouvoir adhérent, ont été classées en trois catégories : non adhérentes, faiblement adhérentes et hautement adhérente:

Tableau 5 : Classification de l'adhérence bactérienne par la technique TCP selon (**Stepanovic *et al.*, 2000**).

Valeurs DO	Adhérence	Formation de biofilm
$DO \leq DO_t$	Non adhérente	Non formatrice
$DO_t \times 2 \leq DO \leq DO_t \times 4$	Faiblement adhérente	Faiblement formatrice
$DO_t \times 4 \leq DO$	Fortement adhérente	Fortement formatrice

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

Cette technique qualitative consiste à l'ensemencement des souches testées pour leurs capacité 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, en se basant sur la composition de la couleur de leurs colonies.

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).

Evaluation de couleur des colonies, selon Satorres et Alcaraz en 2007, les colonies des souches non productrices sont de couleur rose rouges tandis que celle qui ont la capacité à produire un slime sont de couleur noires à surface ou presque noire (Nasr *et al.*, 2012).

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).

7. Cinétique de la formation *in vitro* de biofilm sur tubulures à différentes conditions

Dans cette partie expérimentale on a essayé d'évaluer *in vitro* les cinétiques d'installation du biofilm des souches testée sur des morceaux de tubulure de même composition que les carnaux d'endoscope, sur une période de 72h avec et sans désinfectant (glutaraldéhyde à 2%).

Des morceaux de 1cm² de tubulure sont coupés et mis dans des tubes contenant 1mL d'une suspension bactérienne ajustée à 0.08 - 0.1 à une longueur d'onde de 630 nm. Les tubes ainsi préparés sont incubés à 37°C à différent temps soit: 2h, 4h, 6h, 8h, 12h, 24h, 48h et 72h.

A l'issue de chaque période d'incubation, les morceaux de tubulure sont récupérés, lavés abondamment à l'eau distillée stérile pour éliminer les bactéries libres planctoniques, puis placés dans 1mL d'eau physiologie et traités par un passage successif de 3min dans un bain à ultrason (model Wise Clean WUC-D06H) et de 20 sec au vortex.

Une série de dilutions au 1/10 jusqu'au 1/100000 est effectuée pour chaque échantillon, puis ensemencée sur gélose nutritive. Le dénombrement des colonies est réalisé après 24h d'incubation à 37°C.

Pour connaitre l'effet du désinfectant sur la cinétique de formation du biofilm, la technique est la même que celle décrite précédemment. Mais après la période d'incubation, les tubulures étaient récupérés et bien rincés et ensuite mises en contact du désinfectant durant 15 min à température ambiante. Suite au temps de contact, ces dernières sont bien lavées et mises dans 1 ml d'eau physiologique suivit d'une sonication, passage au vortex et d'un dénombrement.

8. 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 glutaraldéhyde de type (STERANIOS) (**Figure 8**), dont le composant actif est le glutaraldéhyde. Celui-ci est utilisé soit concentré soit dilué pendant 15 min et 30 min. Pour cette partie, seules les bactéries formatrices de biofilm étaient sélectionnées.

La technique utilisée est la même que celle décrite précédemment de la formation de biofilm sur microplaque (TCP).

Après la formation de biofilm de 24h par la même technique que celle décrite précédemment de la microplaque (TCP), les microplaques de 96 puits étaient rincées et mises en contact avec différentes concentrations du désinfectant : soit une solution mère à 2% soit diluée à 75%, 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).

De même, 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 µL 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 8 : Le désinfectant utilisé au service gastro-entérologies (CHU Tlemcen).

Résultats et discussion

1. Revivification des souches étudiées et analyse microbiologique

Rappelons que ce travail est le résultat des 3 mastérants de 2019 où 36 souches ont été étudiées, soit 21 souches de *Pseudomonas aeruginosa*, 10 souches de *Klebsiella pneumoniae* et 5 souches de *Staphylococcus aureus* toutes isolées de canaux d'endoscopes de type PENTAX du service de gastroentérologie du CHU de Tlemcen.

Une revivification des souches étudiées a été réalisée sur des milieux sélectifs et après l'incubation de 24h à 48h à 37°C, les résultats étaient comme suit :

Aspect des colonies sur milieu Mac Conkey : (isolement de *Klebsiella pneumoniae*).

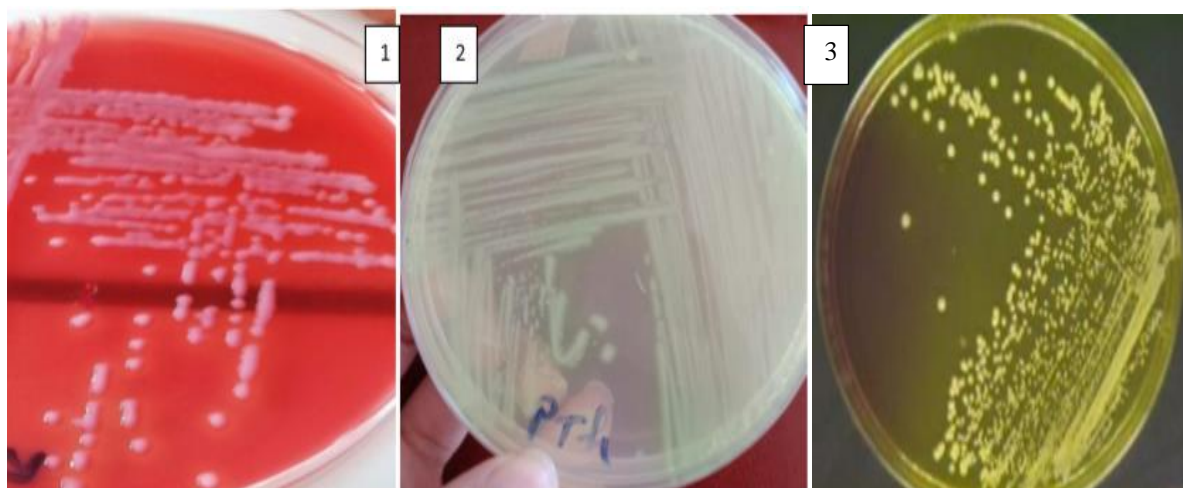
Les colonies de *Klebsiella pneumoniae* avaient un diamètre de 3 à 4 mm étaient rondes, lisses, bombées, brillantes et muqueuses (**Figure 9**).

Aspect des colonies sur milieu Cétrimide : (isolement de *Pseudomonas aeruginosa*).

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 9**).

Aspect des colonies sur milieu Chapman :(isolement de *Staphylococcus aureus*).

La présence d'une culture permet d'orienter l'identification vers le genre *Staphylococcus*. Généralement *Staphylococcus* développe des colonies de petites tailles apparaissent souvent pigmentées, et entourées d'une auréole jaune dans le cas où le mannitol est fermenté, sinon les colonies sont de couleur blanche. Les colonies sont arrondies à bords régulier de 1 à 2 mm de diamètre (**Figure 9**).

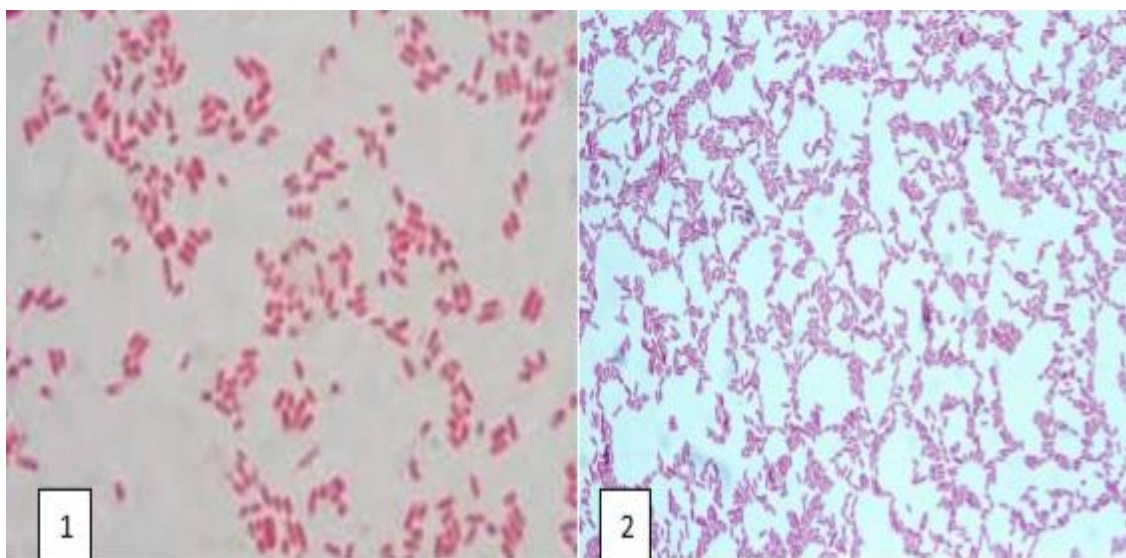


1. *Klebsiella pneumoniae*, 2. *Pseudomonas aeruginosa* 3. *Staphylococcus aureus*.

Figure 9 : Aspect des différentes colonies isolées sur milieux sélectifs

Les résultats des examens microscopiques réalisés après coloration de Gram :

Les souches de *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* sont des bacilles à Gram (-) colorés en rose (**Figure 10**).



1. *Klebsiella pneumoniae*

2. *Pseudomonas aeruginosa*

Figure 10 : Aspect des souches en microscopie électronique après coloration de Gram grossissement X400.

Les souches de *S. aureus* présentent une couleur violet typique des bactéries Gram positives. Elles se présentent sous forme de cocci souvent sphériques, en grappe de raisin (**Figure 11**).

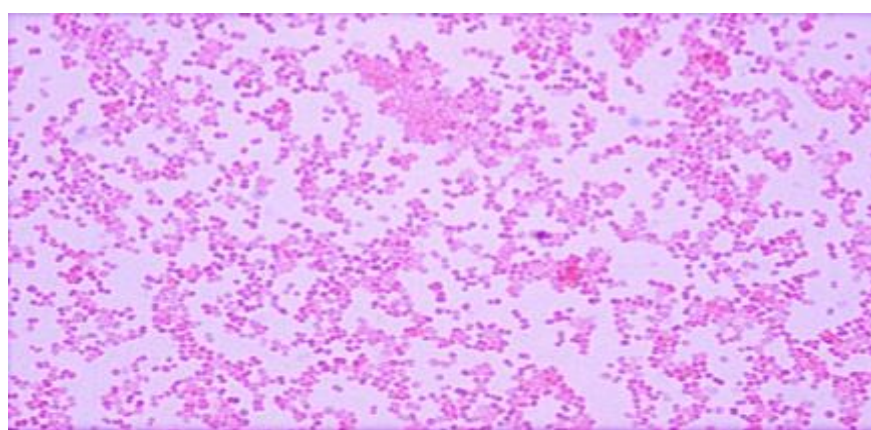


Figure 11 : Aspect de *Staphylococcus aureus* en microscopie électronique suite à une coloration de Gram grossissement X400.

2. Identification par Galerie API 20E et Galerie API Staph

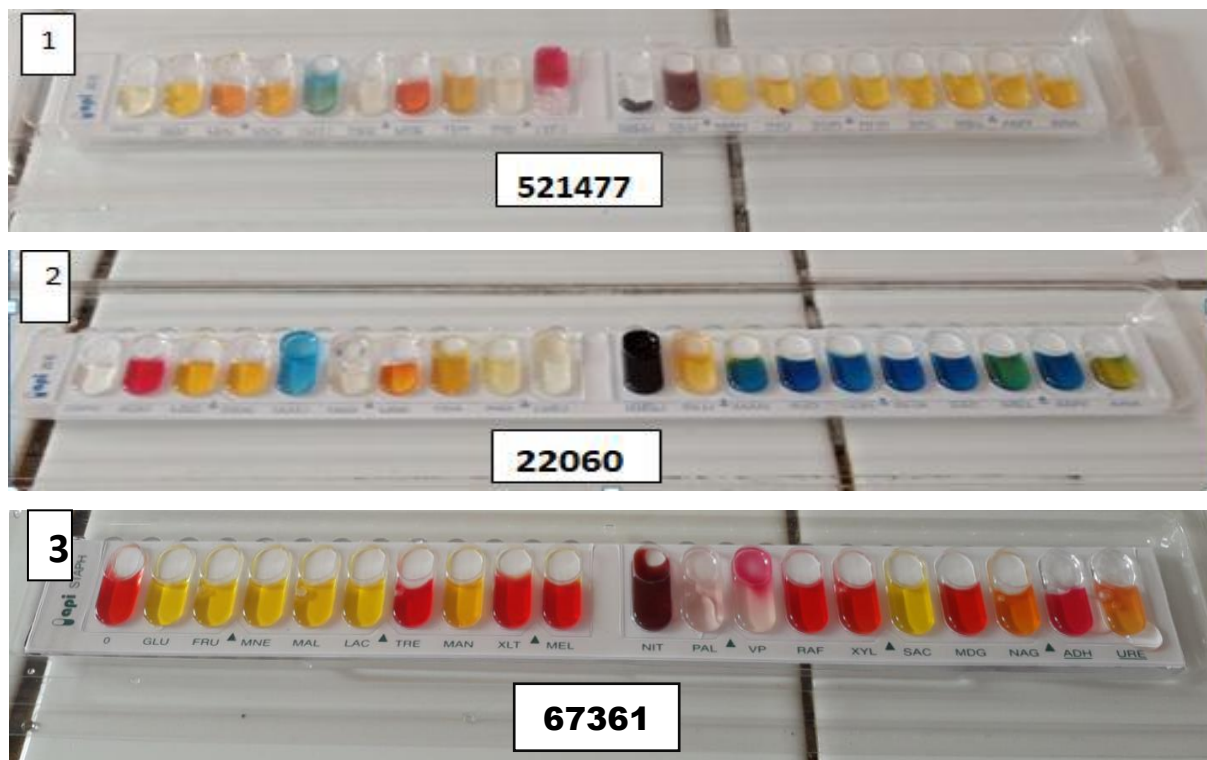
L'identification des colonies pures suspectées appartenir au genre *Klebsiella*, *Pseudomonas* et *Staphylococcus* est complétée par Galerie API 20E et Galerie API Staph, qui ont permis de donner les résultats suivants (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Résultats de l'identification par Galerie API 20E et Galerie API Staph.

Code des souches	Genre espèce
Ps1, Ps2,... Ps21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Kp1, Kp2,... Kp10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
S Réf1, SRéf2,... S5	<i>Staphylococcus aureus</i>

L'identification par la galerie API Staph a permis de caractériser 5 souches de *Staphylococcus aureus* avec des profils numériques différents.

Alors que l'identification par galerie API 20E a permis de confirmer et caractériser 10 souches de *Klebsiella pneumoniae* appartenant avec des biotypes différents, et 21 souches de *Pseudomonas aeruginosa* de profils différents (**Figure 12**).



1-*Klebsiella pneumoniae*, 2-*Pseudomonas aeruginosa*, 3-*Staphylococcus aureus*

Figure 12 : Revivification des souches par Galerie API Staph et API 20E.

3. Evaluation de la formation de biofilm des souches sélectionnées des trois masters toutes isolées d'endoscopes

L'étude de l'adhésion des souches isolées permet d'expliquer leur persistance dans les canaux d'endoscopes, et leur aptitude à former un biofilm.

La production de biofilm *in vitro* était détectée par les 3 mastérants (2019) et pour toutes les souches, selon la méthode quantitative de la microplaque 96 puits (TCP) (Freeman *et al.*, 1989), et la méthode qualitative sur milieu au Rouge Congo (Mathur *et al.*, 2006).

3.1. Technique de microplaques 96 puits (TCP)

Le test de microplaque est la technique la plus utilisée pour quantifier la formation de biofilm, c'est un indicateur important de la pathogénicité (Stepanovic *et al.*, 2000).

Les souches identifiées ont été testé pour leur capacité à produire du biofilm *in vitro*. Ceci par la méthode quantitative de coloration au cristal violet sur microplaque 96 puits en polypropylène.

Les valeurs des densités optiques (DO) obtenus par le lecteur d'absorbance pour microplaques ont été converties en histogramme sur Excel (Figure 13, 14 et 15).

Les résultats sont référés à la classification de Mathur *et al.* (2006). La valeur moyenne des puits de contrôle (sans biofilm) est égale à 0.06.

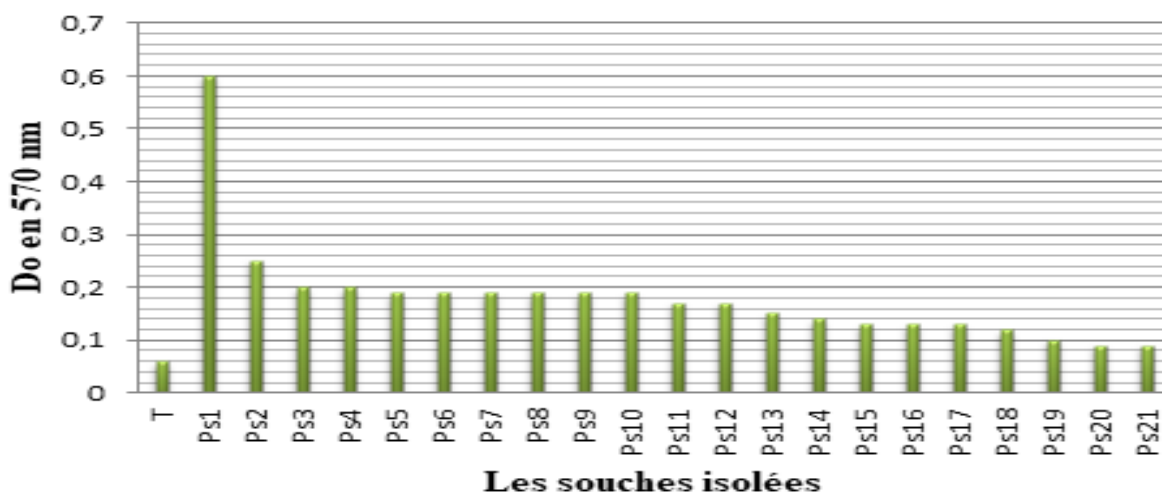


Figure 13 : Résultats de la quantification de la formation de biofilm *in vitro* par les souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées de canaux d'endoscopes.

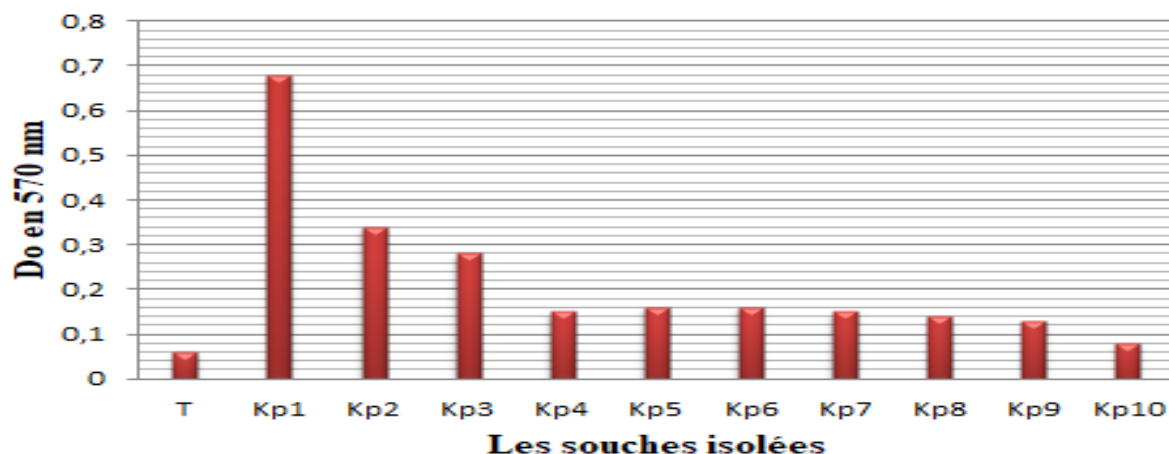


Figure 14 : Résultats de la quantification de la formation de biofilm *in vitro* par les souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de canaux d’endoscopes.

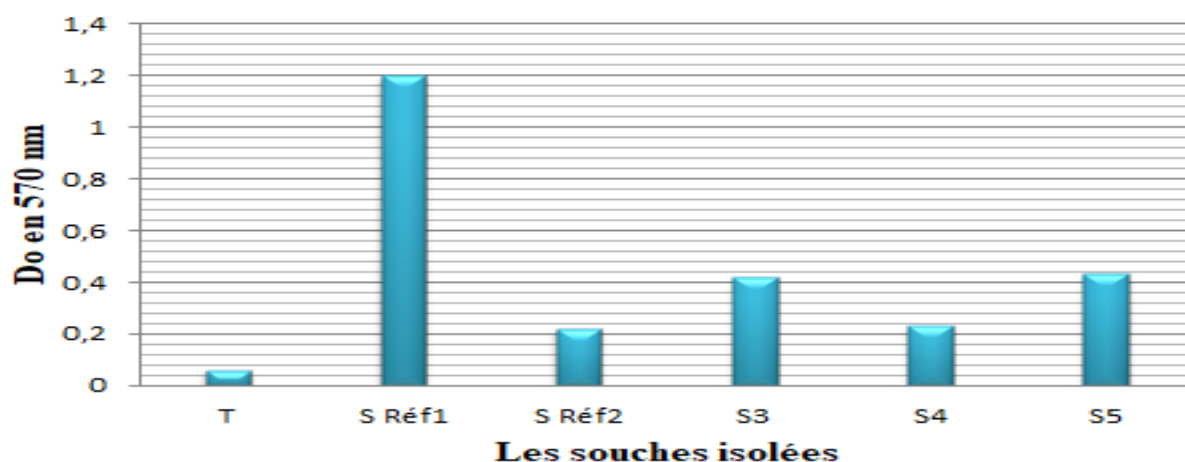


Figure 15 : Résultats de la quantification de la formation de biofilm *in vitro* par les souches de *Staphylococcus aureus* isolées de canaux d’endoscopes.

Tableau 7: Résultats de la technique de TCP.

Souche	Fort	Modéré	Faible
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=21)	2 (10%)	14 (70%)	5 (20%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=10)	3 (30%)	6 (60%)	1 (10%)
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=5)	3 (60%)	2 (40%)	0

Après comparaison des résultats donnés par les 3 études et après analyse des histogrammes et du **Tableau 7**, les souches de *Staphylococcus aureus* semblent être toutes de bonnes formatrices de biofilm, vu que 60% d’entre elles étaient fortement adhérentes ($\text{dot} \times 4 \leq \text{do}$) et les 40% restantes étaient modérément formatrices. Les souches de *Klebsiella pneumoniae*

viennent en 2eme position, 90% d'entre elles forment un biofilm, 1/3 d'entre elles sont hautement adhérentes. Contrairement aux souches de *Pseudomonas aeruginosa* où seuls 10% sont fortement formatrice de biofilm alors que la majorité est modérément formatrice (70%).

Plusieurs études ont été réalisées dans le but de tester la capacité des *Pseudomonas* à former un biofilm *in vitro* tel **Harisson-Balestra et al. (2003)** ; **Fu et al. (2010)** et **Oncel et al. (2010)** ont révélé que 60% des isolats de *P. aeruginosa* produit des biofilms bactériens par méthode de TCP, que cette souche est souvent fortement formatrice de biofilm.

Selon **Nagant en 2010**, toutes les bactéries en générale et *Pseudomonas aeruginosa* en particulier résident de manière prédominante sous la forme d'un biofilm. Cette bactérie est considérée comme bonne formatrice de biofilm selon **Filloux et Vallet (2003)**.

D'autre par **Bellifa en 2014** a montré que la présence d'un film protéique sur les implants médicaux en contact direct avec un fluide favorise l'adhésion et la formation des biofilms par *K. pneumoniae*.

Staphylococcus aureus présente une cause majeure des infections communautaires et nosocomiales et le plus souvent les infections aiguës et chroniques dont la plus part sont dues à la capacité de cette bactérie à adhérer sur les implants médicaux et à former des biofilms [(Tomaras et al., 2003) ; (Lee et al., 2008)].

Johannes et al. (2002) montrait que 4 souches seulement sur 128 de *S. aureus* isolées du milieu hospitalier formaient un biofilm.

Quant aux résultats trouvés dans ces 3 études, ils sont en accords avec plusieurs auteurs. **Pajkos et al. (2004)** confirmait la présence de biofilm sur les canaux d'endoscopes.

Roberts dans son étude en **2013** confirme et révèle la présence de biofilm dans les canaux d'endoscope flexible dus à la prolifération et persistance des microorganismes très souvent d'origine exogène.

Hassaine et Kaf Nemer (2017) ont montré également la présence de souches de *Staphylococcus aureus* bonnes formatrices de biofilm dans les canaux d'endoscopes flexibles du service de gastroentérologie de l'EHS de Ghazaouet.

La présence de biofilm sur la surface interne des canaux de l'endoscope a été signalé dans la littérature celle-ci est probablement associées à la présence de matière organique et à l'humidité dans les canaux d'endoscopes résultant d'un traitement inadéquat de l'endoscope et l'insuffisance de séchage des canaux d'endoscope (**Kovaleva et al., 2017**).

3.2.Evaluation de la formation de biofilm par la méthode RCA

Cette méthode qualitative se base sur le caractère phénotypique des souches ensemencées sur milieu Rouge Congo. Elle reste très largement utilisée et considérée comme un test standard pour la détection de la formation de biofilm [(Mathur *et al.*, 2006) ; (Gad *et al.*, 2009)].

Un résultat positif donne des colonies noires avec une consistance cristalline sèche susceptible de produire un slime. Alors que les colonies non productrices de slime restent généralement rose (Freeman *et al.*, 1989).

Rasha *et al.*, en 2012 ont proposé la méthode de culture sur RCA comme une alternative à la méthode TCP pour le dépistage de la formation du biofilm par les souches bactériennes étant plutôt facile à réaliser, les souches ont pris moins de temps, et donc la méthode est sensible et spécifique.

Les résultats de la production de slime sur le milieu Rouge Congo de toutes les souches sont illustrés dans la Figure 16 et Tableau 8.

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

Les souches	RCA +	RCA-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=21)	4	17
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=10)	4	6
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=5)	5	0

La technique RCA (Tableau 8) (Figure 16), confirme que les souches de *Staphylococcus aureus* sont de bonnes formatrices de biofilm vu que la totalité formaient un excellent slime.

En général, les staphylocoques sont des membres bénins de la flore naturelle, mais de nombreuses espèces ont la capacité d'être des agents pathogènes opportunistes, infectant principalement les individus qui ont des implants ou dispositifs médicaux. *S. aureus* et *S. epidermidis* sont une source majeure d'infections associées aux dispositifs médicaux telles que les infections liées aux cathéters intraveineux, aux stimulateurs cardiaques et aux implants mammaires et formant de bons biofilms [(Paharik et Horswill, 2016) ; (Hiltuneun *et al.*, 2019)].

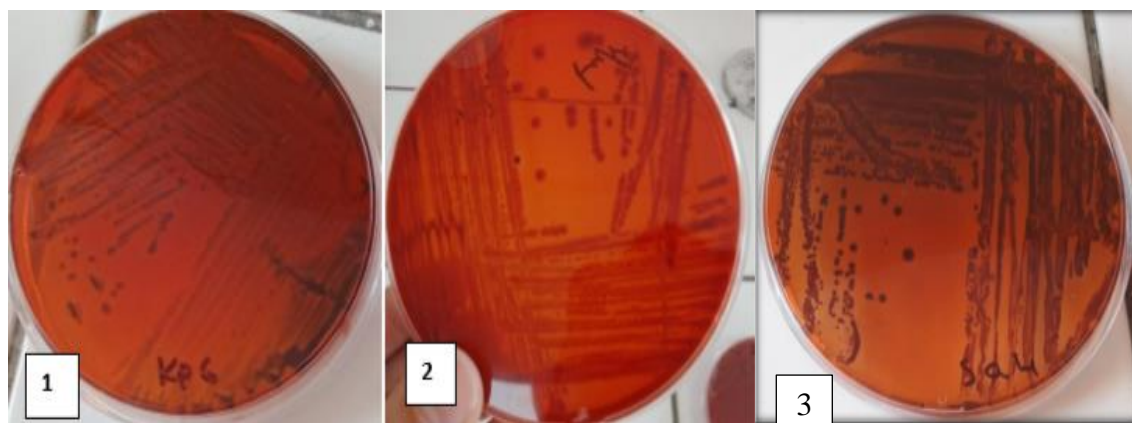
La méthode TCP détecte mieux les bactéries productrices de biofilm par rapport d'autres méthodes, et plus précisément celle du Rouge Congo agar (Panda *et al.*, 2016). C'est une technique pratique et économique pour l'identification des facteurs et des conditions de cultures optimales pour la formation du biofilm (Castro *et al.*, 2013).

La technique RCA concrétise la formation de slime qui est un phénotype confirmant la présence de matrice EPS et une adhésion sur support. Les souches de *Klebsiella pneumoniae* semblent plus adhérentes que *Pseudomonas aeruginosa*, ceci est dû probablement à la caractéristique de leur paroi.

Les souches de *Klebsiella pneumoniae* ont la capacité de produire des biofilms qui persistent sur les surfaces abiotiques tels que les dispositifs à demeure et cela grâce à la production de fimbriae de type 1 et de type 3. Le biofilm protège la bactérie des désinfectants, des antibiotiques et des attaques des réponses immunitaires de l'hôte près du site de contact entre le corps humain et les dispositifs à demeure [(Ostria-Hernandez *et al.*, 2018) ; (Bengoechea et Sa Pessoa, 2019)].

Les résultats retrouvés dans ces études concordaient non seulement avec ceux retrouvés par **Kara Terki en (2014)** ou la majorité des souches de staphylocoques (111/200 souches) étaient productrices de slime et toutes isolées de dispositifs médicaux provenant du même CHU de Tlemcen, mais également de ceux de **Chibi en (2015)** ou 100% des souches *Staphylococcus aureus* isolées des surfaces étaient productrices de slime.

L'étude de **Mirani *et al.* (2018)** indiquait que *P. aeruginosa* et *S. aureus* présentent des propriétés de surface hydrophobes et leurs assurent une bonne adhésion. *Pseudomonas* est une bactérie opportuniste à Gram négatif produit de multiples facteurs de virulence et une couche dense d'EPS contenant jusqu'à trois exopolysaccharides différents (alginate, Pel et Psl) favorisant son adhésion (**Kurmoo *et al.*, 2020**).



1 : *Klebsiella pneumoniae* 2 : *Pseudomonas aeruginosa* 3 : *Staphylococcus aureus*

Figure 16 : Aspect des colonies de souches sur milieu Rouge Congo.

Les résultats trouvés dans ces études sont en accord avec celles obtenus par l'étude de **Chibi en 2015**, qui montre que 76% de *Pseudomonas aeruginosa* était non formatrice de slime.

L'étude de **Bellifa en (2014)** montre que 85 des souches de *Klebsiella pneumoniae* produisaient un slime contre 30 non productrices.

4. Cinétique de la formation *in vitro* du biofilm par les souches isolées de canaux d'endoscope

Ces trois études avaient pour but de connaître à quel moment le biofilm pouvait être mature pour ces 3 types de bactéries sur un support abiotique qui était le polyéthylène.

On consultant et on comparant les courbes de cinétiques de formation de leurs biofilms pendant 72 heures en absence et en présence du désinfectant utilisé, on constate que la maturité des biofilms pour les 3 genres bactériens, indépendamment de la présence ou non du désinfectant est observée dès la 8ème heure pour les *S. aureus* et les *K. pneumoniae* et se prolonge à la 24ème et 48ème heure. Alors que celle du *P. aeruginosa* commence à la 12ème heure.

Ces observations confirment les résultats précédents ou on a constaté que les souches de *Staphylococcus aureus* et les *K. pneumoniae* formaient de bon biofilm et une bonne adhérence, cela peut se comprendre vu que la maturité de formation du biofilm chez les *P. aeruginosa* prend plus de temps. Ces résultats sont dus probablement aux caractéristiques des parois bactériennes de ces espèces et du support étudié.

Pour une surface donnée, l'adhésion bactérienne sera en fonction des caractéristiques physicochimiques de la souche bactérienne utilisée, et que toute modification de ces caractéristiques peut entraîner une augmentation ou une diminution de l'adhésion bactérienne (**Baillif et al., 2010**).

Le mode de vie des bactéries en biofilm est souvent lié à la structure pariétale de la bactérie et la nature de surface qui influencent leur adhésion. L'adhérence peut se faire sur différents supports, chacun ayant des caractéristiques d'hydrophobicité et de charges de surface différentes, ce qui peut favoriser ou non l'adhérence microbienne en fonction des souches bactériennes utilisées (**Bellifa, 2014**).

Plusieurs travaux antérieurs ont montré que l'adhésion des bactéries hydrophobes est généralement supérieure à celle des bactéries hydrophiles car une bactérie hydrophobe aura plus de facilité pour enlever le film d'eau la séparant de la surface à coloniser et qu'elle établira plus facilement contact avec cette surface, qu'une bactérie hydrophile [(**Gallardo-Moreno et al., 2002**) ; (**Bayoudh et al., 2006**) ; (**Bruinsima et al., 2007**)].

La plupart des bactéries à Gram négatif ont de longues chaînes de polysaccharides dans leur lipopolysaccharides ayant pour résultat une surface hydrophile, tandis que les bactéries à

Gram positif ont la partie d'acide lipotéichoïques qui se prolonge à l'extérieur de la cellule rendant leur surface hydrophobe (**Frank, 2001**).

Toutes ces courbes de cinétique (**Figures 17, 18 et 19**) suivent les étapes de formation des biofilms à savoir une adhésion initiale réversible suivie d'une irréversible, d'une étape de maturation et enfin d'une dispersion qui commence à partir de la 48^{ème} heure et s'achève vers la 72^{ème} heure.

En présence du désinfectant qui est le glutaraldéhyde à 2%, la cinétique de la formation de biofilm suit celle décrite précédemment à la seule différence que les Log 10 UFC/cm² enregistrés sont plus faible.

Pour les trois espèces bactériennes, le glutaraldéhyde à 2% est efficace au moment de l'attachement réversible des bactéries, ce qui est expliqué par la présence des liaisons chimiques non covalentes ou des liaisons faibles (des forces de long distance et de faible amplitude) entre les bactéries et le support et donc la plupart des bactéries sont en mode planctonique ce qui permet au désinfectant d'éliminer facilement ces forces et donc l'élimination des bactéries quel que soit la souche étudiée.

Le désinfectant est moins efficace au moment de l'adhésion irréversible vers la 6^{ème} heure pour toutes les souches de *S. aureus* et *K. pneumoniae*, et vers la 8^{ème} heure pour les souches de *P. aeruginosa*.

La transition vers une adhésion irréversible correspond à la synthèse de structures à la surface de la bactérie, ainsi que d'une profonde modification du profil d'expression des gènes (**Schembri et al., 2003**). L'adhésion est rendue possible grâce à la sécrétion de polymères extracellulaires qui vont former des ponts de fixation entre la cellule et la surface ou entre deux cellules. Ces exopolymères ont différents rôles, ils assurent l'attachement irréversible des micro-organismes à la surface, ils permettent le piégeage des éléments nutritifs nécessaires à la croissance bactérienne et ils protègent également les micro-organismes des agressions de nature biochimiques, chimiques ou biologiques.

Donlan (2002) a révélé que les EPS et les lipo-polysaccharides(LPS) sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles.

L'alginate ou d'autres polysaccharides ont été identifiés comme les principaux ingrédients du biofilm du *P. aeruginosa*, jouant un rôle important dans la maintenance des structures et la résistance aux antimicrobiens (**Wei et Ma, 2013**).

A l'étape de maturation le désinfectant devient inefficace par rapport à son effet sur les bactéries planctoniques, ce qui explique la consolidation du biofilm par formation d'une

matrice d'exopolymères composée de différentes molécules organiques extracellulaires, avec des polysaccharides, des EPS et parfois des protéines ou des acides nucléiques.

L'épaississement de biofilm s'accompagne par une stratification physiologique, pour avoir comme conséquence l'apparition des différents états physiologiques qui sont des cellules actives proches de zone superficielle, les cellules en croissance intermédiaire et les cellules en dormance qui sont responsables d'une grande partie de la tolérance associée aux biofilms (Sylla, 2001).

Selon **Hall-Stoodly et al., 2004** la caractéristique la plus notable des staphylocoques adhérents qui colonisent les dispositifs médicaux est la quantité abondante d'EPS (également connu sous le nom de glycocalyx ou «slime») qui encadre et les protège contre les cellules de défense de l'hôte et du traitement antibiotique.

Certaines bactéries peuvent se détacher du biofilm mature et rentrer dans la phase de dissémination. Un grand nombre de bactéries quittent la structure tridimensionnelle, elles se dispersent grâce à des forces de cisaillement et vont, par conséquent, contaminer d'autres sites, constituant de véritables réservoirs de bactéries pathogènes (**Jouenne, 2008**).

Selon **Otto, 2008** le détachement de cellules du biofilm mature de *S. aureus* permet la dissémination des bactéries et la colonisation de nouveaux sites d'infection chez l'homme.

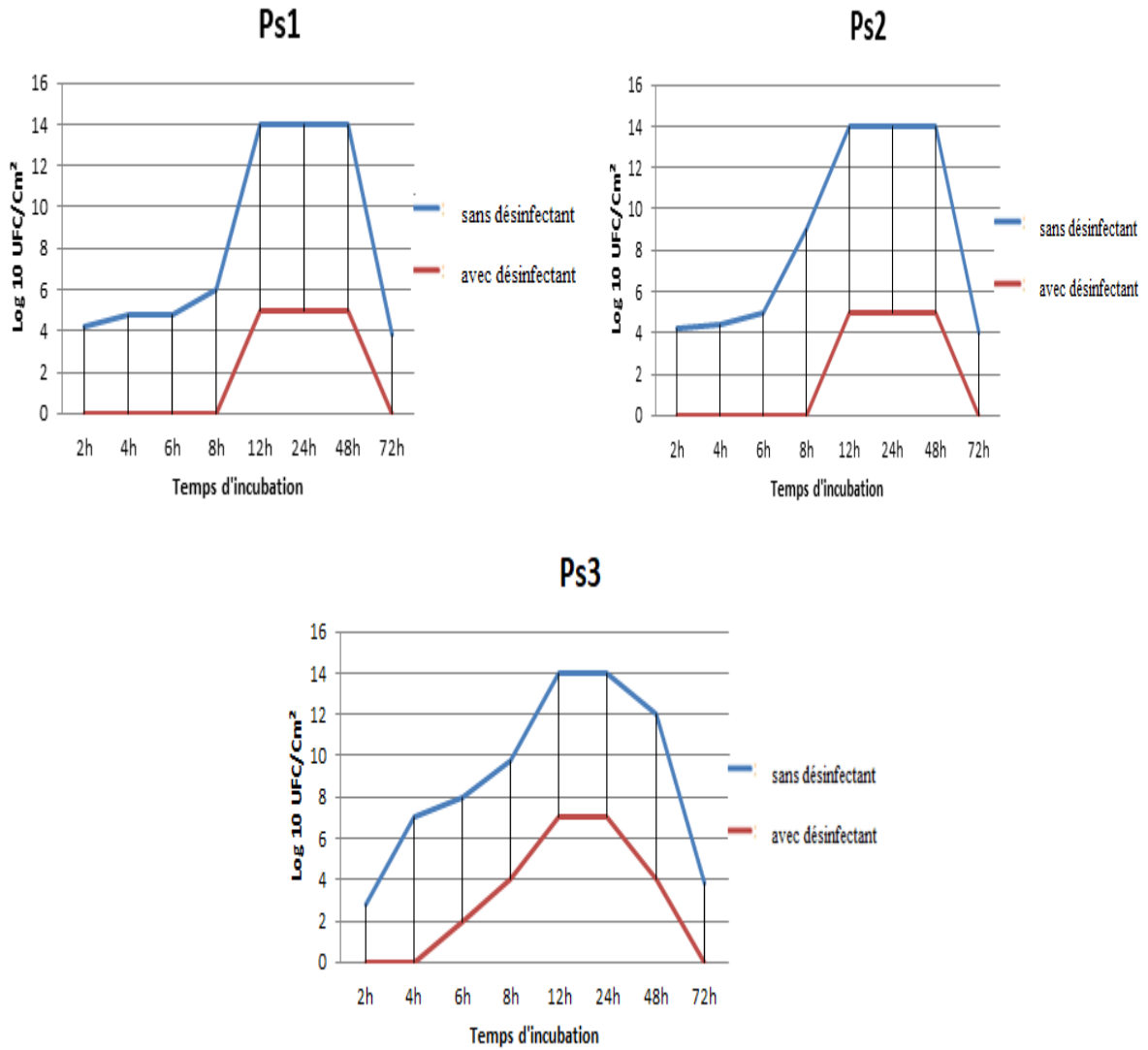


Figure 17 : Cinétique de la formation du biofilm *in vitro* des souches *Pseudomonas aeruginosa* avec et sans désinfectant.

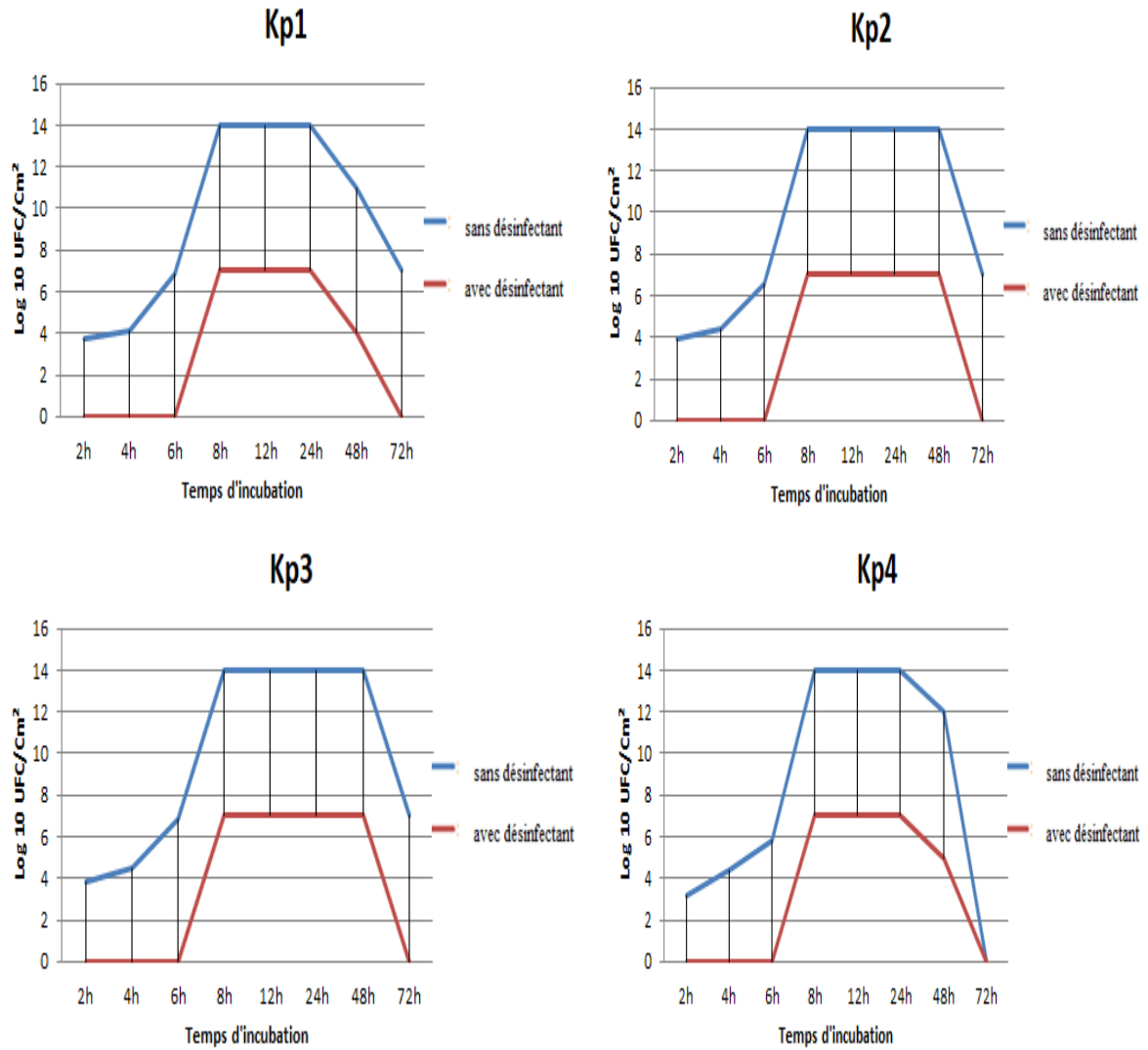


Figure 18 : Cinétique de la formation du biofilm *in vitro* des souches de *Klebsiella pneumoniae* avec et sans désinfectant.

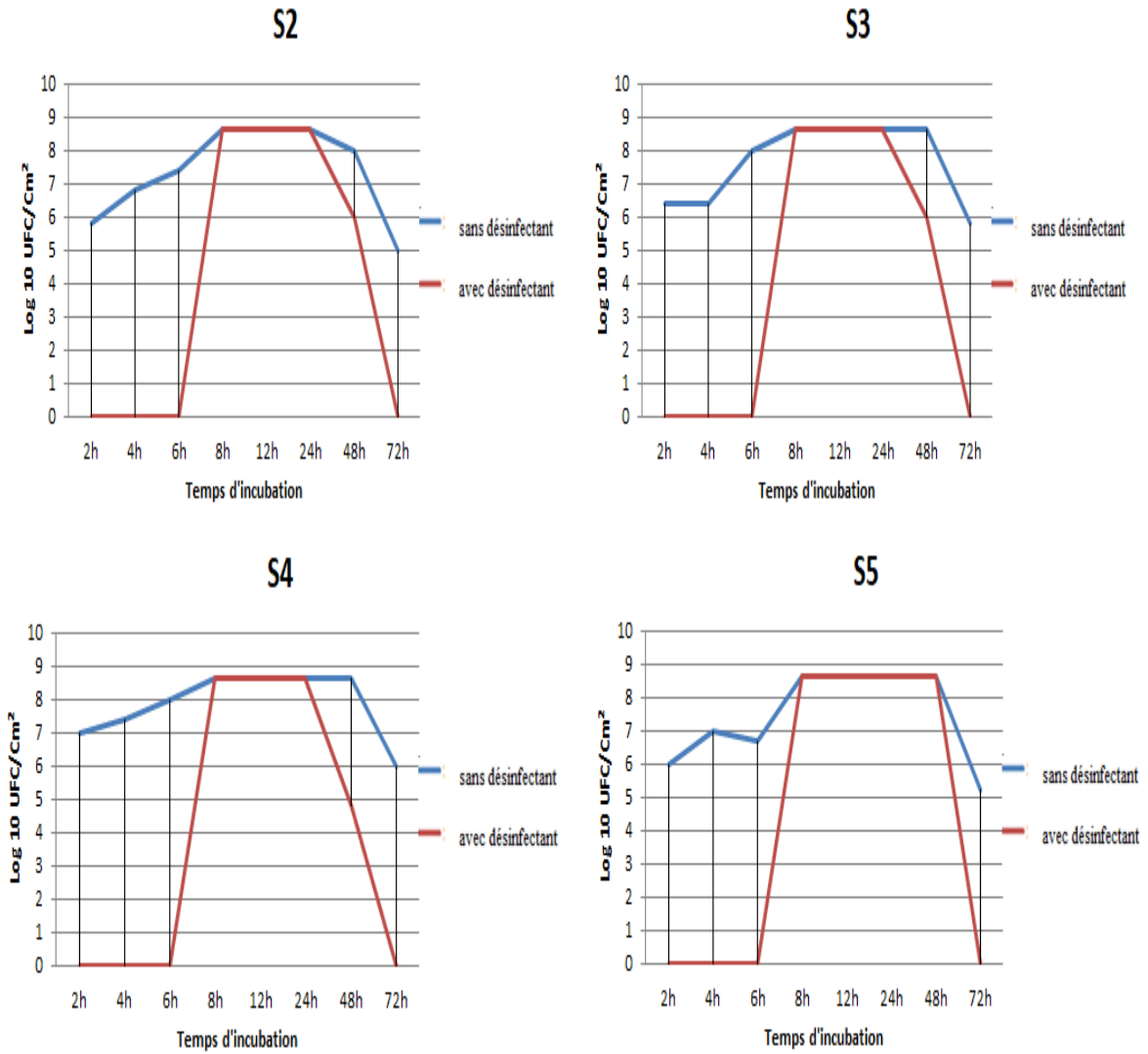


Figure 19 : Cinétique de la formation du biofilm *in vitro* des souches de *Staphylococcus aureus* avec et sans désinfectant.

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

Afin de mieux comprendre la formation et la persistance du biofilm sur les canaux d'endoscope, les étudiants mastérants ont essayé d'étudier *in vitro* l'effet de quelques paramètres tel que le temps de contact du désinfectant (glutaraldéhyde à 2%) et sa concentration. Pour cela seules les souches excellentes formatrices de biofilm ont été choisies soient :

3 souches *Klebsiella pneumoniae* (k2-k3-k4) et une souche de référence (KP700603),

2 souches *Pseudomonas aeruginos* (Ps1, Ps2) et une souche de référence (ATCC27853),

3 souches *Staphylococcus aureus* (S3, S4, S5) et deux souches de références (S Réf 1, SRéf2).

L'efficacité du désinfectant à différentes concentrations : solution mère (Solution commercialisée de glutaraldéhyde à 2%), solutions mères diluée à 75, 50 et 25 % étaient testée vis-à-vis du mode sessile des bactéries étudiées.

Les résultats obtenus sont présentés dans les histogrammes suivants :

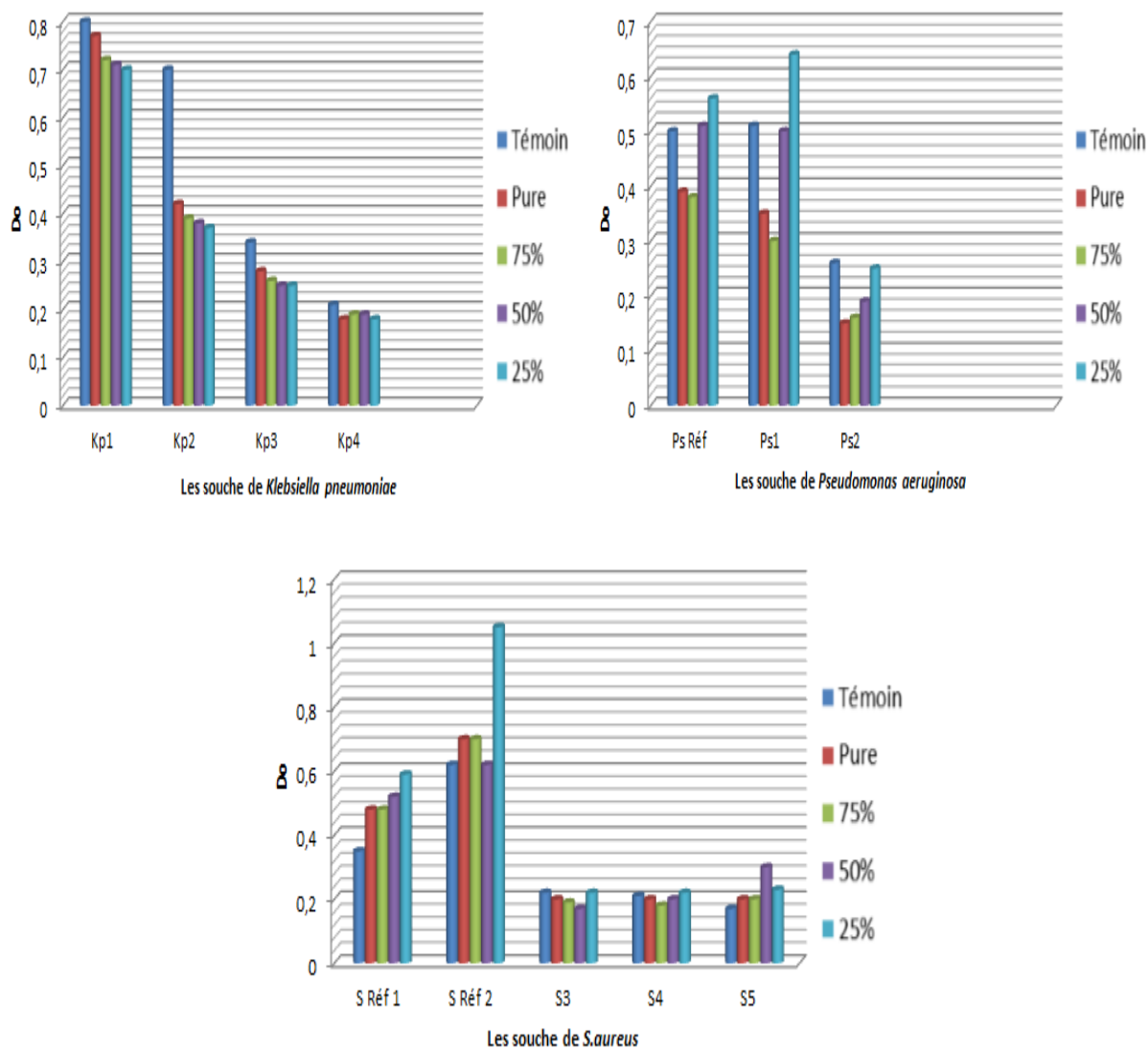


Figure 20 : Effet des concentrations du désinfectant sur les bactéries de *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* en mode biofilm de 24h pendant un temps de contact de 15min.

Après un temps de contact de 15min le désinfectant n'a pas un grand effet sur le biofilm de l'ensemble des souches de *K. pneumoniae* avec une légère diminution de la DO, les concentrations 75, 50 et 25 % de glutaraldéhyde ont presque le même effet donc on assiste à un impact négatif du désinfectant sur ces souches (**Figure 20**).

Les souches de *S. aureus* réagissent pratiquement de la même façon que les *K. pneumoniae*, ou le désinfectant n'agit pas sur l'adhésion les DO ont légèrement diminué par rapport à la DO initiale, celui-ci demeure inefficace, il perd sa capacité à inhiber le biofilm bactérien et provoque un effet contraire.

Pour ces deux espèces (*Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae*) 15 min de contact du glutaraldéhyde n'influe pas sur l'adhésion et les bactéries en mode biofilm ne sont pas détruites.

Pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, après 15 min de contact le désinfectant à l'état pur et à une concentration de 75% fait baisser leur adhésion, contrairement aux autres concentrations où on assiste à une augmentation de la DO des bactéries en mode biofilm et donc à une nouvelle adhésion.

Après 30min de contact, il est vrai que les DO diminuent par rapport à celles de 15min mais on remarque les mêmes allures et le même comportement des bactéries.

On assiste à une inefficacité du désinfectant sur les *K. pneumoniae* et *S. aureus* et cela indépendamment des concentrations du désinfectant alors que pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, le glutaraldéhyde agit plus ou moins à des concentrations de 100 et 75%, mais reste inefficace et accélère l'adhésion à 25%.

Pseudomonas aeruginosa préfère se localiser et former facilement des biofilms à l'intérieur des canaux pour se protéger de l'action des désinfectants (**Marchetti et Pineau, 2005**).

Tsuji et al. (1999) a montré que La solution de glutaraldéhyde pouvait éliminer 85 à 100% de la contamination bactérienne des endoscopes après dix minutes d'exposition, contrairement à cette étude où la solution désinfectante n'avait pas un grand effet.

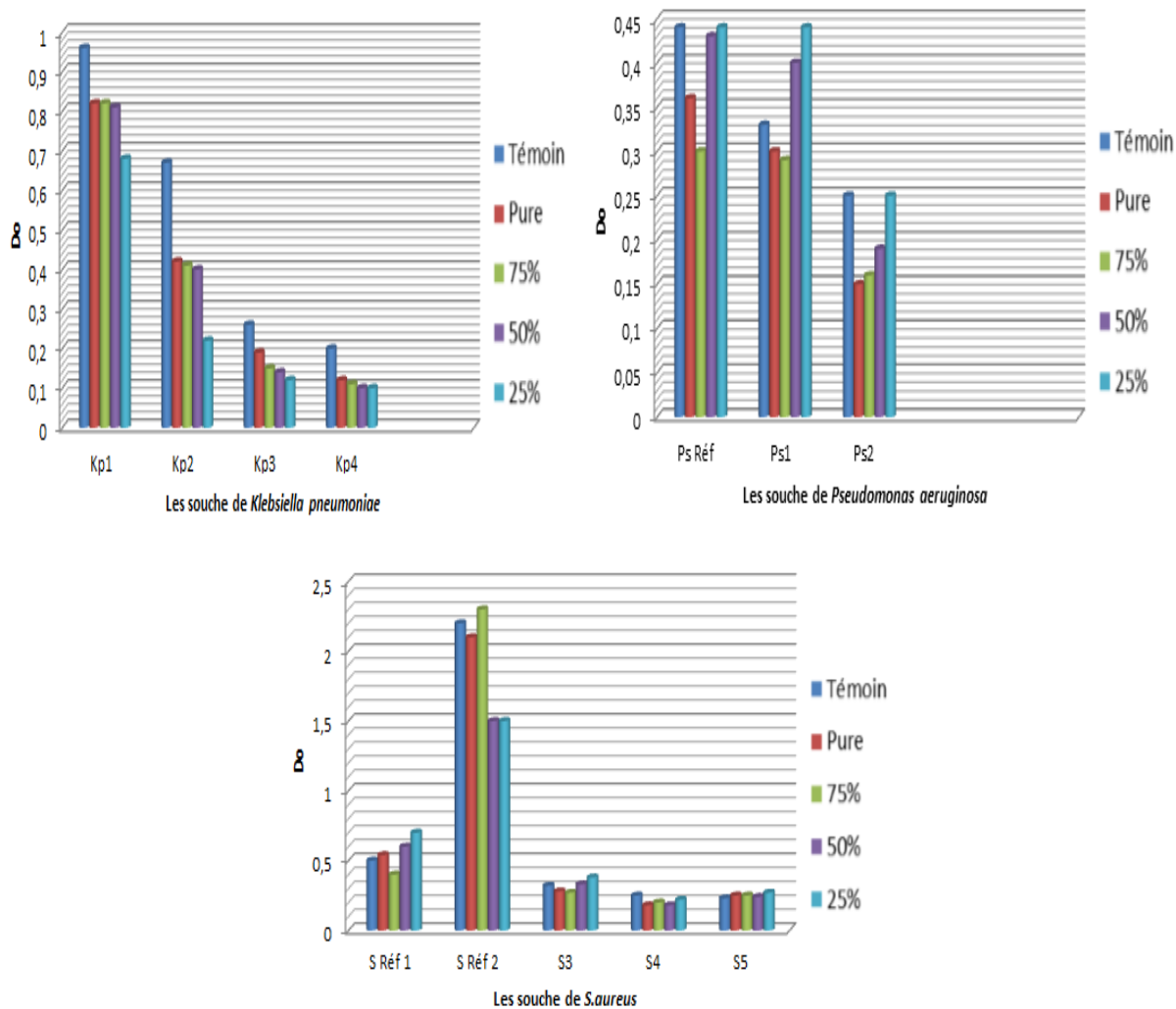


Figure 21 : Effet des concentrations du désinfectant sur les bactéries de *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* en mode biofilm de 24h pendant un temps de contact de 30 min.

Cette partie nous confirme encore que les *K. pneumoniae* et les *S. aureus* ont une plus grande capacité à s'adhérer et à former un biofilm sur supports abiotiques et si elles sont présentes dans les canaux d'endoscopes la désinfection au glutaraldéhyde ne permet pas de les éradiquer.

Quel que soit le support abiotique, une fraction du biofilm n'est pas éradiqué par le désinfectant même avec un temps de contact allongé, car les bactéries adhérentes sont très difficiles à éliminer et constituent un facteur non négligeable dans la résistance aux antibiotiques et aux désinfectants et constituent donc une source majeure d'infection hospitalière.

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

Bekkari et al. (2016) ont expliqué la résistance au désinfectant par l'acquisition d'une résistance de la part des bactéries vis-à-vis l'utilisation de même produit de désinfectant avec la même concentration à chaque fois. Car le désinfectant à base d'aldéhyde entraîne la fixation de la matrice et puis les microorganismes fixées au sein de cette matrice (p. ex. biofilm et/ou sécrétions résiduelles du patient) peuvent ne pas être tués de façon adéquate [(**Alvarado et al., 2000**) ; (**Axon et al., 2001**)].

Des travaux effectués par **Bridier et al. (2011)** sur la résistance des bactéries vis-à-vis des désinfectants montre que cette résistance est dû d'une façon directe ou indirecte à l'architecture de la paroi bactérienne et sa résistance à l'action des antimicrobiens.

Conclusion

Un certain nombre de facteurs, notamment les retards dans le retraitement, la formation de biofilm, les problèmes de conception des endoscopes et les dommages aux endoscopes, contribuent à l'infection associée à l'endoscopie gastro-intestinale. Des méthodes pour améliorer le retraitement des endoscopes, le dépistage de la contamination des endoscopes peuvent être essentielles pour prévenir de futures infections et épidémies.

Il devient de plus en plus évident qu'il faut immédiatement concentrer l'attention sur le problème du lavage et désinfection des endoscopes sous des concentrations plus élevés avec certains détergents soit pour supprimer le biofilm établi ou alors le retarder.

Car l'adhésion de bactéries telles *Staphylococcus aureus*, et *Klebsiella pneumoniae* est observée sur support abiotique dès la 8eme heure contrairement aux souches de *Pseudomonas aeruginosa* qui prennent plus de temps, la maturité de son biofilm est vers la 48eme heure. Le désinfectant ne semble pas avoir un effet sur des biofilms matures et donc son enlèvement impératif dans les canaux d'endoscopes réduira la probabilité de compromettre l'action désinfectante ultérieure.

Des recherches continues sur les mécanismes physico-chimiques d'adhérence et d'élimination des biofilms sont nécessaires pour optimiser la composition des détergents utilisés pour éliminer le biofilm.

Il devient de plus en plus évident, qu'il faut immédiatement concentrer l'attention sur le problème du lavage et désinfection des endoscopes, sous des concentrations plus élevés avec certains détergents, soit pour supprimer le biofilm établi ou alors de le retarder.

De même il est nécessaire d'étudier et de comprendre l'installation de ces différents microorganismes dans les canaux internes des endoscopes afin de pouvoir les éliminer.

Références bibliographiques

1. **Aissa K. (2012).** Profil de la résistance de *pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques aux services de réanimation à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V de rabat entre 2006 et 2010. Th. doct: Pharmacie: Université Mohammed V de rabat.
2. **Alvarado C. J., Reichelderfer M. (2000).** APIC guideline for infection prevention and control in flexible endoscopy. *American journal of infection control*, 28(2), 138-155.
3. **Aumeran C., Thibert E., Chapelle F. A., Hennequin C., Lesens O., Traore O. (2012).** Assessment on experimental bacterial biofilms and in clinical practice of the efficacy of sampling solutions for microbiological testing of endoscopes. *Journal of clinical microbiology*, 50(3), 938-942.
4. **Axon A. T. R., Beilenhoff U., Bramble M. G., Ghosh S., Kruse A., McDonnell G. E., Spencer K. (2001).** Variant Creutzfeldt-Jakob disease (VCJD) and gastrointestinal endoscopy. *Endoscopy*, 33(12), 1070-1080.
5. **Bagley S. T., Seidler R. J., Talbot H. W., Morrow J. E. (1978).** Isolation of *Klebsiella* from within living wood. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36(1), 178-185.
6. **Baillif S., Hartmann D., Freney J., Kodjikian L. (2010).** Implant intraoculaire et adhésion bactérienne: influence des conditions environnementales, des propriétés bactériennes et des caractéristiques du biomatériau. *Journal français d'ophtalmologie*, 33(3), 210-221.
7. **Baudin M. (2017).** Couplage de rapporteurs génétiques et d'une molécule active pour l'étude de la dispersion de biofilms. Th. doct: Biologie. France: Université Paris-Saclay, 158p.
8. **Bayouh S., Othmane A., Bettaieb F., Bakhrouf A., Ouada H. B., Ponsonnet L. (2006).** Quantification of the adhesion free energy between bacteria and hydrophobic and hydrophilic substrata. *Materials Science and Engineering: C*, 26(2-3), 300-305.
9. **Becheur H., Harzic M., Colardelle P., Deny P., Coste T. (2000).** Contamination des endoscopes et des pinces à biopsies par le virus de l'hépatite C. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 24(10), 906-910.
10. **Bekkari H., Touijer H., Berrada S., Ettaybi M., Benchemsi N., Maniar S., Lalami A. E. O. (2016).** Evaluation de la contamination des eaux utilisées en milieu hospitalier: Effets d'antibiotiques et de désinfectant usuels sur les germes isolés (Surveillance of bacteriological quality and resistance to disinfectants and antibiotics in a provincial hospital in Morocco).

11. **Bellifa S. (2014).** Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen Th. doct: Microbiologie : Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.
12. **Beloin C., Ghigo J. M. (2005).** Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends in microbiology*, 13(1), 16-19.
13. **Bengoechea J. A., Sa Pessoa J. (2019).** *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS microbiology reviews*, 43(2), 123-144.
14. **Bisognano C., Vaudaux P., Rohner P., Lew D. P., Hooper D. C. (2000).** Induction of fibronectin-binding proteins and increased adhesion of quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* by subinhibitory levels of ciprofloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(6), 1428-1437.
15. **Bridier A., Briandet R., Thomas V., Dubois-Brissonnet F. (2011).** Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*, 27(9), 1017-1032.
16. **Bruinsma S. P., Cagan R. L., Baranski T. J. (2007).** Chimaerin and Rac regulate cell number, adherens junctions, and ERK MAP kinase signaling in the *Drosophila* eye. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(17), 7098-7103.
17. **Cabrolier N., Lafolie J., & Bertrand X. (2014).** Épidémiologie et facteurs de risques des infections liées à *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal des Anti-infectieux*, 16(1), 8-12.
18. **Camran Nezhat M.D. (2001).** Nezhat's History of Endoscopy: A Historical Analysis of Endoscopy Ascension Since Antiquity (1^e éd. ; vol. 199). Tuttlingen, Germany : EndoPress
19. **Castro Melo P., Ferreira L .M., Filho A. N., Zafalon L. F., Godoy Vicente H .I., de Souza V. (2013).** Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Brazilian journal of microbiology*.44 (1): 1517-8382.
20. **Chaieb K., Mahdouani K., Bakhrouf A. (2005).** Detection of icaA and icaD loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in à dialysis unit. *Journal of Hospital Infection*, 61(3), 225-230.
21. **Chapuis C. (2006).** Prévention du risque infectieux en endoscopie digestive. *Hépatogastro & Oncologie Digestive*, 13(4), 267-274.
22. **Chalvet De Rochemonteix, A. (2009).** Les biofilms et la peau. Th. doct: vétérinaire. École vétérinaire de Maisons-Alfort.

23. **Chibi A. (2015).** Evaluation de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* isolées de CHU Tlemcen. Th. doct: Microbiologie : Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.
24. **Chmielewski R. A. N., Frank J. F. (2003).** Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(1), 22-32.
25. **Choi H.H., Cho Y.S. (2015).** Endoscope Reprocessing: *Update on Controversial Issues* .*J. Clin Endosc*, Vol. 48, pp. 358.
26. **Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Eachy E.H. (1985).** Adherence of biofilm producing strains of *Staphylococci epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity*, pp. 318-32.
27. **Clutterbuck A. L., Woods E. J., Knottenbelt D. C., Clegg P. D., Cochrane C. A., Percival S. L. (2007).** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary microbiology*, 121(1-2), 1-17.
28. **Conseil superieur d'hygiene. (1996).** Entretien du matériel endoscopique et prévention des infections.
29. **Costerton J. W. (1999).** Introduction to biofilm. *International journal of antimicrobial agents*, 11(3-4), 217-221.
30. **David V. (2017).** Evaluation médico-économique de l'utilisation des bronchoscopes souples: exemple du CHU de Limoges de 2013 à 2017. Th. doct: Pharmacie : Université Toulouse III - Paul Sabatier.
31. **Deflandre J., Cajot O., CRINE M., LABALUE J. (2001).** Risques de contamination par le virus de l'hépatite C des endoscopes utilisés dans un service hospitalier de gastroentérologie. *RMLG. Revue médicale de Liège*, 56(10), 696-698.
32. **Denis F., Le Hello S., Barraud O. (2016).** Bacilles à Gram négatif aérobies et aéro-anaérobies. In *Bactériologie Médicale* (pp. 301-387). Elsevier Masson.
33. **Dong Y., Chelius M. K., Brisse S., Kozyrovska N., Kovtunovych G., Podschun R., Triplett E. W. (2003).** Comparisons between two *Klebsiella*: The plant endophyte *K. pneumoniae* 342 and a clinical isolate *K. pneumoniae* MGH78578. *Symbiosis*, 35(1), 247-259.
34. **Donlan R. M. (2002).** Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881.
35. **Dumortier J., de Leusse A. (2006).** La nasogastrosopie: place actuelle et future dans l'arsenal endoscopique; pourquoi se développe-t-elle lentement. *Acta Endoscopica*, 36(2), 475-476.

- 36. Duport C., Decousser J. W. (2012).** Endoscopie: gestion du risque infectieux. *EMC-Biologie Médicale*, 7(4), 1-12.
- 37. El Fertas-Aissani R., Messai Y., Alouache S., Bakour R. (2013).** Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathologie Biologie*, 61(5), 209-216.
- 38. El Khomssi L. (2017).** La désinfection de l'endoscope en milieu hospitalier: Enquête à l'Hôpital Ibn Sina.
- 39. Elmeskini K. (2011)** Etude épidémiologique des infections à *Pseudomas aeruginosa*. Th. doct: Université Mohammed v Rabet, pp. 3.
- 40. Flemming H. C. (2011).** Microbial biofouling: unsolved problems, insufficient approaches, and possible solutions. *In Biofilm highlights* (pp. 81-109). Springer, Berlin, Heidelberg.
- 41. Filloux A., Vallet I. (2003).** Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *M/S: médecine sciences*, 19(1), 77-83.
- 42. Fomba n'dji D. (2006).** Hypertension artérielle et grossesse dans le service de Gynécologie obstétrique du centre de sante de référence de la commune II du district de Bamako. Th. doct: Pharmacie et d'Odontostomatologie : Université de bamako
- 43. Frank J. F. 2001.** Microbial attachment to food and food contact surfaces. *Adv. Food. Nutr. Res.* **43**: 319-369.
- 44. Freeman D., Falkiner F., Keane C. (1989).** New method for detecting slime production by coagulase negative *Staphylococci*, *J. Clin Pathol.* pp. 872-874.
- 45. Fu W., Forster T., Mayer O., Curtin J. J., Lehman S. M., Donlan R. M. (2010).** Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an *in vitro* model system. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(1), 397-404.
- 46. Gad G., EL-Feky M., EL-Rehewy M., Hassan M., Abolella H., Abd El-Baky R. (2009).** Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *Journal of Infection Devices.* 3(5):342-351.
- 47. Gallardo-Moreno A. M., González-Martín M. L., Pérez-Giraldo C., Bruque J. M., Gómez-García A. C. (2002).** Serum as a factor influencing adhesion of *Enterococcus faecalis* to glass and silicone. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(11), 5784-5787.
- 48. Galtier-Boissière E. (1924).** Larousse médical illustré. Editions Larousse (FR).

- 49. Gervaise A. (2008).** Désinfection, stérilisation et maintenance du matériel. pp.51-59.
- 50. Global Harmonization Task Force Study Group 1. (2005).** Information document concerning the definition of the term “MedicalDevice”. The Global Harmonization Task Force (GHTF/SG1/N29R16:2005).
- 51. 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.
- 52. Hafiane A., Ravaoarino M. (2008).** Various typing methods of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients. *Medecine et maladies infectieuses*, 38(5), 238-247.
- 53. Hall-Stoodley L., Costerton J. W., Stoodley P. (2004).** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 95-108.
- 54. Hall S., McDermott C., Anoopkumar-Dukie S., McFarland A. J., Forbes A., Perkins A. V., Grant G. D. (2016).** Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, 8(8), 236.
- 55. Harrison Balestra C., Cazzaniga A. L., Davis S. C., Mertz P. M. (2003).** A wound isolated *Pseudomonas aeruginosa* grows a biofilm *in vitro* within 10 hours and is visualized by light microscopy. *Dermatologic surgery*, 29(6), 631-635.
- 56. Hassaine H., Kaf Nemer N., Hammoumi S. (2017).** Evaluation de la contamination bactérienne et formation de biofilm sur endoscopes digestifs EPH Maghnia et Ghazaou et Mémoire de master : Université abou bekr belkaid Tlemcen.
- 57. Hiltunen A. K., Savijoki K., Nyman T. A., Miettinen I., Ihalainen P., Peltonen J., Fallarero A. (2019).** Structural and Functional Dynamics of *Staphylococcus aureus* Biofilms and Biofilm Matrix Proteins on Different Clinical Materials. *Microorganisms*, 7(12), 584.
- 58. Hola V., Ruzicka F. (2011).** The Formation of Poly-Microbial Biofilm on Identification of catabolites repression as a physiological regulatorok biofilm formation illustrée par l'exemple des infections acquises au cours de la pratique sportive, Thèse de Immunol 322,249-289.
- 59. Johannes K.M., Knobloch M.A., Horstkotte H., Dietrich M. (2002).** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology*. 191: 101–106.
- 60. Jouenne T. (2008).** Biofilms bactériens. *Techniques de l'ingénieur*, Dossier bio600, 10(05).

- 61. Kara-Terki I. (2014).** Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen. Th. doct: Microbiologie: Université Abou Bekr Blekaid Tlemcen.
- 62. Kerr K. G., Snelling A. M. (2009).** *Pseudomonas aeruginosa*: à formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection*, 73(4), 338-344.
- 63. Kouch M. (2015).** Etude phytochimique et biologique d'une espèce végétale endémique algérienne « *Thymus numidicus* Poiret ». Th. doct: Biologie: Université de Badji Mokhtar-Annaba, pp. 16.
- 64. Kovaleva J. (2016).** Infectious complications in gastrointestinal endoscopy and their prevention. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(5), 689-704.
- 65. Kovaleva J. (2017).** Endoscope drying and its pitfalls, *Journal of Hospital Infection*, doi: 10.1016/j.jhin.2017.07.012.
- 66. Kovaleva J., Meessen N. E. L., Peters F. T. M., Been M. H., Arends J. P., Borgers R. P., Degener J. E. (2009).** Is bacteriologic surveillance in endoscope reprocessing stringent enough,. *Endoscopy*, 41(10), 913-916.
- 67. Kovaleva J., Peters F. T., van der Mei H. C., Degener J. E. (2013).** Transmission of infection by flexible gastrointestinal endoscopy and bronchoscopy. *Clinical microbiology reviews*, 26(2), 231-254.
- 68. Kuchma S. L., Connolly J. P., O'toole G. A. (2005).** A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 187(4), 1441-1454.
- 69. Kurmoo Y., Hook A. L., Harvey D., Dubern J. F., Williams P., Morgan S. P., Alexander M. R. (2020).** Real time monitoring of biofilm formation on coated medical devices for the reduction and interception of bacterial infections. *Biomaterials Science*, 8(5), 1464-1477.
- 70. Lebeaux D., Lucet J. C., Barbier F. S. (2016).** Nouvelles recommandations pour les infections associées au biofilm: implications en réanimation. *Réanimation*, 25(3), 308 317.
- 71. Lee H. W., Koh Y. M., Kim J., Lee J. C., Lee Y. C., Seol S. Y., Cho D. T. (2008).** Capacity of multidrug resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clinical microbiology and infection*, 14(1), 49-54.
- 72. Li P., Poon Y. F., Li W., Zhu H. Y., Yeap S. H., Cao Y., Kang E. T. (2011).** A polycationic antimicrobial and biocompatible hydrogel with microbe membrane suctioning ability. *Nature materials*, 10(2), 149-156.

73. Leusse A., Vahedi K., Edery J., Tiah D., Fery–Lemonnier E., Cellier C., Jian R. (2007). Capsule endoscopy or push enteroscopy for first-line exploration of obscure gastrointestinal bleeding , *Gastroenterology*, 132(3), 855-862.
74. Marchetti B., Pineau L. (2005). Risque infectieux exogène en endoscopie digestive. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2005(376), 67-73.
75. Marion-Ferey K., Pasmore M., Stoodley P., Wilson S., Husson G., Costerton JW. (2003). Élimination des biofilms des tubes en silicone: évaluation de l'efficacité des procédures de décontamination par dialyse à l'aide d'un modèle *in vitro*. *J Hosp Infect*, 53 (1): 64-71.
76. Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay DJ., Fatma T., Rattan A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: An evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology* .24 (1):25-9.
77. Mc Dougald D., Rice S. A., Barraud N., Steinberg P. D., Kjelleberg S. (2012). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 39-50.
78. Meghdas I., Hamze M., Dabboussi F., Baida N., Izard D. (2004). Taxonomie du genre *Pseudomonas*: rétrospective et actualité. *Lebanese Science Journal*, 5(1), 115.
79. Ministère des affaires sociales et de la santé. (2016). Instruction n° DGOS/PF2/DGS/VSS1/2016/220 du 4 juillet 2016 relative au traitement des endoscopes souples thermosensibles à canaux au sein des lieux de soins, pp. 7,15.
80. Mirani Z. A., Fatima A., Urooj S., Aziz M., Khan M. N., Abbas T. (2018). Relationship of cell surface hydrophobicity with biofilm formation and growth rate: A study on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *Iranian journal of basic medical sciences*, 21(7), 760.
81. Morgan R., Kohn S., Hwang S. H., Hassett D. J., Sauer K. (2006). BdlA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 188(21), 7335-7343.
82. Morris C. E., Monteil C. L., Berge O. (2013). The life history of *Pseudomonas syringae* : linking agriculture to earth system processes. *Annual review of phytopathology*, 51, 85-104.
83. Nagant C., Tré-Hardy M., Devleeschouwer M., Dehaye J. P. (2010). Study of the initial phase of biofilm formation using a biofomic approach. *Journal of Microbiological Methods* 82:243- 248.

- 84. Nasr R. A., AbuShady H. M., Hussein H. S. (2012).** Biofilm formation and presence of icaAD gene in clinical isolates of *staphylococci*. *Egyptian journal of medical human genetics*, 13(3), 269-277.
- 85. Nelson D. B. (2003).** Infectious disease complications of GI endoscopy: part II, exogenous infections. *Gastrointestinal endoscopy*, 57(6), 695-711.
- 86. Norden C. W., Bryant R., Palmer D., Montgomerie J. Z., Wheat J., Jones S. M., Aber R. C. (1986).** Chronic osteomyelitis caused by *Staphylococcus aureus*: controlled clinical trial of nafcillin therapy and nafcillin-rifampin therapy. *Southern medical journal*, 79(8), 947-951.
- 87. Oncel S., Pinar E., Sener G. (2010).** Evaluation of bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis. *Journal Otolaryngol Head Neck Surg.* (39):52–55.
- 88. O'Toole G., Kaplan H. B., Kolter R. (2000).** Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.
- 89. Otto M. (2008).** *Staphylococcal* biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322: 207-228.
- 90. Ostría-Hernández M. L., Juárez-de la Rosa K. C., Arzate-Barbosa P., Lara-Hernández A., Sakai F., Ibarra J. A., Vidal J. E. (2018).** Nosocomial, Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from Mexico City produce Robust Biofilms on abiotic surfaces but not on Human Lung Cells. *Microbial Drug Resistance*, 24(4), 422-433.
- 91. Paharik A. E., Horswill A. R. (2016).** The *staphylococcal* biofilm: adhesins, regulation, and host response. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, 529-566.
- 92. Pajkos A., Vickery K., Cossart Y. (2004).** Is biofilm accumulation on endoscope tubing a contributor to the failure of cleaning and decontamination, *Journal of Hospital Infection*, Vol. 58, pp. 224–229.
- 93. Palazzo L. (Ed.). (2011).** Echo-endoscopie digestive: Avec la collaboration des membres du Club francophone d'écho-endoscopie. *Springer Science & Business Media*.
- 94. Panda S., Chaudhary U., Dube K. (2016).** Comparison of four different methods for detection of biofilm formation by uropathogens. *Indian J Pathol Microbiol.* (59): 177-9. 38-
- 95. Parsek M. R., Greenberg E. P. (2005).** Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in microbiology*, 13(1), 27-33.
- 96. Pericolini E., Colombari B., Ferretti G., Iseppi R., Ardizzoni A., Girardis M., Blasi E. (2018).** Real-time monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on endotracheal tubes in vitro. *BMC microbiology*, 18(1), 84.

- 97. petignat C., Dumas C-L., Attinger M., (2008).** Risque de transmission d'infection lors d'un examen endoscopique, forum (31),37-40.
- 98. Pozzetto B. (2007).** Eléments d'assurance qualité en hygiène relatifs au contrôle microbiologique des endoscopes et à la traçabilité en endoscopie. *Ministère de la san des solidarités DGS/DH tées OS, CTINILS.*
- 99. Racha A. N., Abu Shady H.M., Hussein H.S. (2012).** Biofilm formation and presence of icaAD gene in clinical isolates of *staphylococci*. *Egyptian Journal of Medica. Human and Genetic* .13: 269–274.
- 100. Redah D., Konutse A. Y., Agbo K., Dogbey E. H., Napo-Koura G. (2001).** Le diagnostic endoscopique d'oesophagite à *Candida albicans* est-il fiable, Corrélations avec les examens anatomo-pathologique et mycologique. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 25(2), 161-163.
- 101. Roberts M.S., Charles G. (2013).** The role of biofilms in reprocessing medical devices. *American Journal of Infection Control*, Vol. 41, pp. 577-580.
- 102. Roux A., Ghigo J. M. (2006).** Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France.*
- 103. Salacha R. (2010).** Les Patatines de *Pseudomonas Aeruginosa*: secrétées ou non secrétées, Telle est la question. Th. Doct: université Aix-Marseille.
- 104. Satorres S. E., Alcaráz L. E. (2007).** Prevalence of icaA and icaD genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients and hospital staff. *Central european journal of public health*, 15(2).
- 105. Sauer K., Rickard A. H., Davies D. G. (2007).** Biofilms and biocomplexity. *Microbe-American Society for Microbiology*, 2(7), 347.
- 106. Schaechter M. (1999).** Eisenstein. Microbiologie et pathologie infectieuse. Bruxelles: De Boeck Université.
- 107. Schembri M. A., Kjærgaard K., Klemm P. (2003).** Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Molecular microbiology*, 48(1), 253-267.
- 108. Sefraoui I. E. K. (2015).** Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents hôpitaux de l'ouest algérien. Th. doct: Microbiologie: Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.
- 109. Shumway et Broussard J. (2003).** Maintenance of gastrointestinal endoscopes, *journal of bacteriology*, (18) 254-261.
- 110. Spach D. H., Silverstein F. E., Stamm W. E. (1993).** Transmission of infection by gastrointestinal endoscopy and bronchoscopy. *Annals of internal medicine*, 118(2), 117-128.

- 111. Spiers A. J., Bohannon J., Gehrig S. M., Rainey P. B. (2003).** Biofilm formation at the air–liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Molecular microbiology*, 50(1), 15-27.
- 112. Stanley N. R., Britton R. A., Grossman A. D., Lazazzera B. A. (2003).** Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. *Journal of Bacteriology*, 185(6), 1951-1957.
- 113. Stepanović S., Vuković D., Dakić I., Savić B., Švabić-Vlahović M. (2000).** A modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, 40(2), 175-179.
- 114. Sylla Y. (2011).** Nettoyage en place des lignes agro-industrielles: Etude Cinétique d'élimination des biofilms négatifs au sein des installations fermées dans les industries agroalimentaires. Th. doct: Génie des Procédés : institut des sciences et technologies Paris.
- 115. Systchenko R. (2000).** Recommandations pour la mise en place de procédures de nettoyage et de désinfection en endoscopie digestive. *Acta Endoscopica*, Vol. 30(3), pp. 329-339.
- 116. Thomas S. (2018).** Investigation de non-conformités microbiologiques f'endoscopes souples thermosensibles : étude épidémiologie clinique et environnementale. Th. doct: Pharmacie: Université de Nantes, pp. 40.
- 117. Tomaras A. P., Dorsey C. W., Edelmann R. E., Actis L. A. (2003).** Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology*, 149(12), 3473-3484.
- 118. Touati A., Achour W., Abbassi A. (2007).** 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*, 55 : 277–282.
- 119. Touati M., Diene S. M., Dekhil M., Djahoudi A., Racherache A., Rolain J. M. (2013).** Dissemination of a class I integron carrying VIM-2 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital intensive care unit in Annaba, Algeria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(5), 2426-2427.
- 120. Tré-Hardy M., Vanderbist F., Traore H. (2008),** In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures. Urinary Catheters, *Urinary Tract Infections*, 153- 172.
- 121. Tsuji S., Kawano S., Oshita M., Ohmae A., Shinomura Y., Miyazaki Y., Maeda T. (1999).** Endoscope disinfection using acidic electrolytic water. *Endoscopy*, 31(07), 528-535.
- 122. Van Houdt R., Michiels C. W. (2005).** Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in microbiology*, 156(5-6), 626-633.

- 123. Van Oss C. J. (1995).** Hydrophobicity of biosurfaces origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 5(3-4), 91-110.
- 124. Wang H., Sodagari M., Chen Y., He X., Newby B. M. Z., Ju L. K. (2011).** Initial bacterial attachment in slow flowing systems: effects of cell and substrate surface properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 87(2), 415-422.
- 125. Wei Q., Ma L. Z. (2013).** Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of molecular sciences*, 14(10), 20983-21005.
- 126. Wertheim H. F., Melles D. C., Vos M. C., van Leeuwen W., van Belkum A., Verbrugh H. A., Nouwen J. L. (2005).** The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet infectious diseases*, 5(12), 751-762.

Annexes

Annexe : Préparation des milieux de culture et des solutions

Annexe 1 : Préparation du milieu sélectif Mac Conkey

➤ Mac Conkey (poudre)	51,59 g
➤ Eau distillé	1000 mL

Annexe 2 : Préparation du milieu sélectif Cétrimide

Cétrimide (poudre).....	45.3 g
Eau distillé	1000 mL

Annexe 3 : Préparation du milieu sélectif Chapman

Chapman (poudre).....	111 g
Eau distillé	1000 mL

Annexe 4 : Préparation du milieu Rouge Congo

BHIB	37 g
Saccharose.....	50 g
Agar-agar.....	10 g
Rouge Congo.....	0,8 g

Annexe 5 : Préparation de la solution du Cristal Violet à 1%

Cristal Violet (poudre)	1g
Eau distillé.....	100 mL

Annexe 6 : Préparation de bouillon TSB

Tryptone	17,0 g
Peptone papaïnique de soja	3,0g
Glucose	2,5g
Sels biliaires	1,5g
Chlorure de sodium	5,0g
Phosphate dipotassique	4,0g
Novobiocine	0,020g
Eau distillée	1000 ml

Résumés

Résumé

Les endoscopes jouent un rôle diagnostique et thérapeutique très importants, après chaque procédure endoscopique ils peuvent être contaminés par des germes opportunistes tels *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* et autres, pouvant engendrer des biofilms résistants aux désinfectants. Cette étude est une synthèse et comparaison des résultats de 3 masters antérieurs sur le rôle du désinfectant (Glutaraldéhyde), sa concentration et son temps de contact sur la croissance de ces 3 bactéries en mode biofilm isolées de canaux d'endoscope .

Les résultats ont montré que les *K. pneumoniae* et les *S. aureus* adhèrent et forment un biofilm plus rapidement sur supports abiotiques que les souches de *Pseudomonas aeruginosa*. La désinfection au glutaraldéhyde ne permet pas de les éradiquer indépendamment de sa concentration et de son temps de contact. Cela est dû probablement aux caractéristiques des parois bactériennes de ces espèces et du support étudié.

Le procédé de nettoyage et de désinfection des canaux l'endoscope nécessite alors une plus grande importance.

Mots clés : Endoscope, Contamination, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, biofilms, désinfection.

Abstarct

Endoscopes play a very important diagnostic and therapeutic role, after each endoscopic procedure they can be contaminated by opportunistic germs as *Klebseilla pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and others, which can generate biofilms resistant against disinfectant. This study is a synthesis and comparison of the results of 3 previous masters about the role of the disinfectant (Glutaraldehyde), its concentration and its contact time against the growth of these 3 bacteria in biofilm isolated from endoscope canals. The results showed that *K. pneumoniae* and *S. aureus* adhere and form a biofilm more quickly on abiotic supports than *Pseudomonas aeruginosa*.

Disinfection with glutaraldehyde doesn't eradicate them regardless of its concentration and contact time. This is probably due to the characteristics of the bacterial walls of these species and support studied

The cleaning and disinfection process of endoscope canals should requires greater importance.

Keywords : Endoscope, Contamination, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, biofilms, disinfection.

المخلص

تلعب المناظير الداخلية دورًا تشخيصيًا وعلاجيًا مهمًا للغاية، بعد كل إجراء بالمنظار يمكن أن تكون ملوثة عن طريق الجراثيم الانتهازية مثل كلبيسيلا الرئوية، بسودومناس أيغوجنوزة، المكورات العنقودية الذهبية، وغيرها والتي يمكن أن تولد اشربة حيوية (الببوفيلم) مقاومة للمطهرات.

هذه الدراسة عبارة عن حوصلة ومقارنة لنتائج 3 دراسات سابقة حول دور المطهر (الجلوتارالدهيد) ، وتركيزه ومدة الاتصال به على نمو هذه البكتيريا الثلاثة في وضع الاشربة الحيوية المعزولة من قنوات التنظير الداخلي.

أظهرت النتائج أن كلبيسيلا الرئوية والمكورات العنقودية الذهبية تلتصق وتشكل اشربة حيوية بسرعة أكبر على الدعامة اللاحيوية من سلالات بسودومناس أيغوجنوزة.

لا يسمح التطهير بالجلوتارالدهيد من القضاء عليها بغض النظر عن تركيزه ووقت الاتصال به ربما يرجع ذلك إلى خصائص الجدران البكتيرية لهذه الأنواع والدعامة الذي تمت دراستها. لذلك تتطلب عملية تنظيف وتعقيم قنوات المنظار الداخلي أهمية أكبر.

الكلمات الدالة : منظار داخلي ، تلوث ، بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية ، كلبيسيلا الرئوية ، بسودومناس أيغوجنوزة
الاشربة الحيوية ، التطهير