



*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
Université L'Arbi Ben M'Hidi, Oum-El Bouaghi  
Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



NO d'ordre

NO de série

*Mémoire*

*Présenté dans le but de l'obtention du diplôme de*

*MASTER*

*Filière : Science Biologiques*  
*Option : microbiologie appliquée*  
*Thème*

*Évaluation des pratiques d'hygiène et  
de sécurité au niveau des laboratoires  
de biologie à l'université d'Oum El  
Bouaghi*

Présenté par :

LAMRAOUI KARIM & RAHAB SIRINE & ZAIDI AYA

Devant le jury :

Présidente	: <i>M<sup>me</sup></i> Malki .S	MCA	Université L'Arbi Ben M'Hidi ,OEB
Rapporteur	: <i>M<sup>me</sup></i> Aberkane. M	MCB	Université L'Arbi Ben M'Hidi ,OEB
Examineur	: <i>M<sup>me</sup></i> Kaouache. S	MAA	Université L'Arbi Ben M'Hidi ,OEB

2022-2023

# Remerciement

Tous d'abord nous tenons à remercier le bon *Dieu* tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.

Nous exprimons nos profondes gratitude et respectueuses reconnaissances à notre encadrante *M<sup>me</sup> Aberkane. M* pour son encadrement, conseils et sacrifices afin de donner le meilleur et pour son suivi durant la période de préparation de notre mémoire de fin d'étude.

Nos remerciements vont aux membres du jury *M<sup>me</sup> Kaouache. S* et *M<sup>me</sup> Malki. S* qui nous ont fait l'honneur d'accepter de jurer notre travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à tous les professeurs qui par leurs conseils et leurs efforts durant tous les années passées nous sommes là, vraiment un grand remerciement pour leurs qualité d'enseignement qui nous a été dispensé.

# *Dédicace*

En témoignage d'amour et d'affection, je dédie ce modeste travail avec une grande fierté à tous ceux qui me sont chers :

\*Ma très chère mère , qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.

\* Mon très cher père , qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie.

\*\*Que Dieu vous protège et que la réussite soit toujours à ma portée pour que je suis puisse vous combler de bonheur.

\*Mon chère frère et mes belles sœurs ,et puisse Dieu vous donne santé, bonheur et réussite.

Merci pour votre présence, soutien et de m'avoir encouragée à aller plus loin.

A tous les autres que je n'ai pas cités mais à qui je pense aussi.

A toute ma famille.

## Résumé

Les laboratoires sont des lieux favorables pour la multiplication et le développement des microorganismes tel que les bactéries, les champignons et les virus.

Cette étude s'intéresse à l'évaluation de la performance en matière d'hygiène et de sécurité et de respect des consignes d'asepsie dans le laboratoire de biologie durant la réalisation des travaux de fin d'étude de l'année universitaire 2022/2023 à l'université d'Oum El Bouaghi, en se focalisant sur les contaminations fongiques et bactériennes avant et après les manipulations. L'objectif principal de cette étude est de quantifier et d'identifier les contaminants présents dans le laboratoire, ainsi que de proposer des mesures préventives pour minimiser les risques pour la santé des chercheurs et la qualité des échantillons pour prévenir les éventuelles contaminations.

La méthodologie de cette étude comprenait des prélèvements réguliers effectués avant et après les manipulations au laboratoire. Des échantillons ont été collectés sur les surfaces de travail, les équipements, les gants et les échantillons manipulés. Des analyses de contrôle ont été réalisées pour détecter et identifier la présence de champignons, de levures et de bactéries, en utilisant des techniques de culture, de microscopie et macroscopie.

Les résultats de l'étude ont révélé des contaminations fongiques et bactériennes avant et après les manipulations dans plusieurs zones du laboratoire. Les surfaces de travail et les équipements étaient particulièrement touchés, et des contaminants ont également été détectés sur les gants et les échantillons manipulés. Parmi les contaminants identifiés figuraient des espèces courantes de champignons et de levures, ainsi que des bactéries potentiellement pathogènes. Ces contaminations pouvaient compromettre la validité des résultats expérimentaux et représentaient un risque pour la santé du personnel du laboratoire.

**Mots clés : Contrôle, Hygiène, Contamination, Laboratoire de Biologie, OEB.**

## **Abstract**

Laboratories are favourable places for the multiplication and development of microorganisms such as bacteria, fungi and viruses.

This study is interested in the assessment of performance in terms of hygiene and safety and respect for aseptic instructions in the biology laboratory during the realization of the end of study of the university year 2022/ 2023 At the University of Oum El Bouaghi, focusing on fungal and bacterial contaminations before and after manipulations. The main objective of this study is to quantify and identify the contaminants present in the laboratory, as well as to propose preventive measures to minimize the health risks of researchers and the quality of samples to prevent any contaminations.

The methodology of this study included regular samples taken before and after laboratory manipulations. Samples were collected from work surfaces, equipment, gloves and handled samples. Control analyzes were carried out to detect and identify the presence of fungi, yeasts and bacteria, using culture, microscopy and macroscopy techniques.

The results of the study revealed fungal and bacterial contamination before and after manipulations in several areas of the laboratory. Work surfaces and equipment were particularly affected, and contaminants were also detected on gloves and samples handled. Among the contaminants identified were common species of fungi and yeasts, as well as potentially pathogenic bacteria. These contaminations could compromise the validity of the experimental results and represented a health risk for laboratory personnel.

**Keywords: control, hygiene, contamination, biology laboratory, OEB.**

## المخلص:

المختبرات هي أماكن مواتية لتكاثر وتطور الكائنات الحية الدقيقة مثل البكتيريا والفطريات والفيروسات.

تهتم هذه الدراسة بتقييم الاداء من حيث النظافة والسلامة واحترام تعليمات التعقيم في مخابر الاحياء اثناء انجاز نهاية الدراسة الجامعية للعام 2023/2022 بجامعة ام البواقي بالتركيز على الفطريات. والتلوثات البكتيرية قبل وبعد التلاعب. الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تحديد الملوثات الموجودة في المختبر وتحديد لها ، وكذلك اقتراح تدابير وقائية لتقليل المخاطر الصحية للباحثين وجودة العينات لمنع أي تلوث.

تضمنت منهجية هذه الدراسة عينات منتظمة تؤخذ قبل وبعد التلاعب المختبري. تم جمع العينات من أسطح العمل والمعدات والقفازات وعينات مناولة. تم إجراء تحاليل تحكم لكشف وتحديد وجود الفطريات والخمائر والبكتيريا باستخدام تقنيات الزراعة والفحص المجهرى والميكروسكوب.

وكشفت نتائج الدراسة عن وجود تلوث جرثومي وفطري قبل وبعد التلاعب في عدة مناطق من المختبر. تأثرت أسطح ومعدات العمل بشكل خاص ، كما تم الكشف عن الملوثات على القفازات والعينات التي تم التعامل معها. من بين الملوثات التي تم تحديدها كانت الأنواع الشائعة من الفطريات والخمائر ، وكذلك البكتيريا المسببة للأمراض المحتملة. يمكن أن تؤثر هذه التلوثات على صحة النتائج التجريبية وتمثل خطرًا صحيًا على العاملين في المختبر.

**الكلمات المفتاحية:** مراقبة , النظافة, تلوث, مختبر علم الاحياء, ام البواقي.

**Table des matières**

Liste des figures  
Liste des tableaux  
Liste des abréviations

Table des matières

**Mémoire ..... 0**

***Evaluation des pratiques d'hygiène et de sécurité au niveau des laboratoires de biologie à l'université d'Oum El Bouaghi..... 0***

***2022-2023 ..... 0***

L'eau de robinet de laboratoire microbiologie ..... 13  
62..... 13

L'eau distillée de laboratoire BTV ..... 13  
62..... 13

Dénombrement sur milieu (TGEA) et (PCA) ..... 13  
64..... 13

***Introduction..... 1***

***Partie 1 Synthèse bibliographique ..... 3***

***Chapitre I Les Consignes générales en Hygiène et Sécurité au Laboratoire..... 4***

Rappel sur la notion de risque en laboratoire : ..... 3

Toute personne a sa part de responsabilité = Sécurité: ..... 3

II. Groupes de risque : ..... 7

Tenues et équipements de protection : ..... 7

Protection du visage : ..... 7

III. Équipement de sécurité en laboratoire : ..... 11

Douche oculaire et douche d'urgence : ..... 11

Fig 06 : Extincteurs à gaz (CO<sub>2</sub>) (en rouge) selon la norme NF EN 3-7: 2004 ..... 13

Fig 07 : Extincteurs à poudre (en jaune) selon la norme NF EN 3-7: 2004..... 13

Fig 08 : Extincteurs à eau (en bleue) selon la norme NF EN 2004 .....	14
3. Les règles générales de sécurité selon l’OMS (2012) .....	14
a. Se protéger .....	14
b. Travailler proprement .....	14
c. Prévenir les accidents .....	14
a. Être responsable .....	15
b. Être préventif .....	15
1. Information générale sur le risque chimique .....	17
III.2. Agent Chimique CMR : .....	17
<b>Chapitre II Les stratégies de surveillance microbiologique .....</b>	<b>3</b>
I. Rappel sur la démarche d’assurance qualité .....	24
I.1. Origine du concept .....	24
Le système actuel .....	25
II. Stratégie pour les contrôles microbiologiques de l’eau : .....	31
II.1. Les prélèvements sont réalisés hors cycle de désinfection des réseaux. ....	33
<b>Partie 2: Etude expérimentale .....</b>	<b>24</b>
<b>Chapitre III Matériel et méthodes.....</b>	<b>24</b>
I. Matériel : .....	36
I.1. Échantillonnage et méthode de prélèvement : .....	37
I.2. Technique de Prélèvement : .....	40
<b>Technique des écouvillons :</b> .....	40
<b>Technique de sédimentation :</b> .....	40
Un écouvillon de coton hydrophile est immergé dans une solution stérile de Ringer Le prélèvement est effectué par frottement sur la surface du paillasse et de poignée de robine et l’étuve ; l’écouvillon est alors immergé dans 10 ml de Ringer .....	41
I.3. Isolement : .....	41
I.4. Recherche et dénombrement des coliformes totaux, fécaux en milieu liquide : .....	42
II. Identification : .....	45
II.1. Examen macroscopique des caractères cultureux .....	45
III. La galerie API 20: .....	47
<b>Chapitre IV Résultats et discussions.....</b>	<b>54</b>

I. Résultats d'identification : .....	48
Aspect macroscopique des colonies : .....	48
a. Résultats des surfaces : .....	48
Examen microscopique : .....	55
IV. Résultats du test catalase : .....	57
Résultat des tests de la galerie classique : .....	57
V. Résultat de la Galeries API 20E : .....	59
Résultat de la Galeries API 20NE : .....	59
VI. Résultats de la recherche et du dénombrement des micro-organismes : .....	61
a. Les coliformes totaux .....	61
b. Les streptocoques fécaux : .....	62
Tableau 30 : L'eau de robinet de laboratoire microbiologie .....	62
Tableau 31 : L'eau distillée de laboratoire BTV .....	62
<i>Discussion</i> .....	65
<b><i>Conclusion et perspectives</i></b> .....	<b>61</b>
Conclusion.....	69
<b><i>Références bibliographiques</i></b> .....	<b>70</b>

***Liste des Abréviations***

- ADBD** : Analyses De Biologie Délocalisées
- ADH** : L'arginine Dihydrolase
- AFNOR** : Association Française de Normalisation
- ARS** : Surveillance Analytique des eaux potables
- BCPL** : Pourpre de Bromocrésol Simple Concentration
- BTV** : Biotechnologie Végétale
- CCP** : Points Critiques de Contrôle
- CEN** : Comité Européen de Normalisation
- DAOM** : Déchets Assimilables aux Ordures Ménagères
- DASRI** : Déchets d'Activités de Soins à Risque Infectieux
- DM** : Dispositifs Médicaux
- ESB** : Enceintes de Sécurité Biologique
- ÉPI** : Équipements de Protection Individuelle
- GN** : Gélose Nutritive
- HACCP** : Hazard Analysis Critical Control Point
- ISO** : International Standardisation Organisation
- Labo** : Laboratoires
- LBM** : Laboratoires de Biologie Médicale
- LDC** : lysine Décarboxylase
- NPP** : Nombre le Plus Probable
- ODC** : L'Ornithine Décarboxylase

**ONPG** : Ortho- Nitrophényl-  $\beta$ - Galactopyranoside

**PCA** : Plate Count Agar

**QO** : Qualification Opérationnelle

**SNV** : Science de la Nature et la Vie

**SS** : Salmonella Shigella

**TDA** : Test Direct à l'Antiglobuline

**TGEA** : Glucose-Tryptone-Extrait de levure

**TSI** : Triple-Sugar-Iron

**ZEM** : Zones à Environnement Maitrisé

*Liste des figures*

<b>Fig 01</b>	Masque facial pour la manipulation des cryogènes	P 08
<b>Fig 02</b>	Sarrau jetable imperméable (à ouverture dans le dos)	P 09
<b>Fig 03</b>	Hotte chimique	P 11
<b>Fig 04</b>	Trousse de premiers soins	P 12
<b>Fig 05</b>	Douche d'urgence et douche oculaire	P 12
<b>Fig 06</b>	Extincteurs à gaz (CO <sub>2</sub> ) (en rouge) selon la norme NF EN 3-7: 2004	P 13
<b>Fig 07</b>	Extincteurs à poudre (en jaune) selon la norme NF EN 3-7: 2004	P 13
<b>Fig 08</b>	Extincteurs à eau (en bleue) selon la norme NF EN 2004	P 14
<b>Fig 09</b>	Les risques chimiques	P 16
<b>Fig 10</b>	Agent Chimique CMR	P 18
<b>Fig 11</b>	Processus d'apparition d'un incendie et explosion (INRS, 2021b).	P 18
<b>Fig 12</b>	dit triangle de feu	P 19
<b>Fig 13</b>	Roue de Deming	P 24
<b>Fig 14</b>	Diagramme d'Ishikawa (ou « diagramme en arêtes de poisson »)	P 24
<b>Fig 15</b>	Schéma représentatif du protocole du travail	P 39
<b>Fig 16</b>	Les points analysés dans notre laboratoire (photos personnelles)	P 40
<b>Fig 17</b>	Protocole utilisé pour la coloration de Gram (	P 43
<b>Fig 18</b>	Test de catalase (+)	P 45
<b>Fig 19</b>	Recherche et dénombrement des coliformes totaux, fécaux en milieu liquide (NPP).	P 45
<b>Fig 20</b>	La galerie API 20E	P 47
<b>Fig 21</b>	Résultat (+) du test catalase	P 57
<b>Fig 22</b>	Résultat (-) du test catalase	P 57
<b>Fig 23</b>	Résultats des tests classiques	P 57
<b>Fig 24</b>	Résultats des profils biochimiques des API 20 E	P 59
<b>Fig 25</b>	Résultats des profils biochimiques des API 20 NE	P 60
<b>Fig 26</b>	Répartition des germes contaminants identifiés	P 61
<b>Fig 27</b>	Résultats de dénombrement des coliformes	P63
<b>Fig 28</b>	Nombre des coliformes en fonction des postes des prélèvements	p63
<b>Fig 29</b>	Résultats de Dénombrement sur milieu (TGEA) et (PCA)	p64

**Liste des tableaux**

<b>Tableau 01</b>	Les types de risques	P05
<b>Tableau 02</b>	Les différentes classes d'enceintes de sécurité biologique	p06
<b>Tableau 03</b>	Dans la cadre de ces contrôles, on recherche des micro-organismes et/ou particules inertes en suspension dans l'air.	P28
<b>Tableau 04</b>	Dénombrement des micro-organismes cultivables et physiques	p29
<b>Tableau 05</b>	Les deux principales techniques utilisées sont (surfaces):	p35
<b>Tableau 06</b>	Matériel utilisé dans notre travail.	p36
<b>Tableau 07</b>	Présentation des postes du prélèvement	p37
<b>Tableau 08</b>	Technique de prélèvement de l'aire	P40
<b>Tableau 09</b>	Microorganismes recherchés	p41
<b>Tableau 10</b>	Recherche et dénombrement des coliformes totaux, fécaux en milieu liquide :	p42
<b>Tableau 11</b>	Les principaux staphylocoques isolés en microbiologie.	p44
<b>Tableau 12</b>	Les tests de galerie classique	p46
<b>Tableau 13</b>	Résultat de lecture macroscopique paillasse n° 1	p48
<b>Tableau 14</b>	Résultat de lecture macroscopique paillasse n° 2	p49
<b>Tableau 15</b>	Résultat de lecture macroscopique paillasse n°3	p50
<b>Tableau 16</b>	Résultat de lecture macroscopique poignée de robinet :	p51
<b>Tableau 17</b>	Résultat de lecture macroscopique étuve :	p52
<b>Tableau 18</b>	Résultat de lecture macroscopique tasse :	p52
<b>Tableau 19</b>	Résultats de l'air groupe 1 & 2 :	p53
<b>Tableau 20</b>	Résultat de lecture macroscopique laboratoire de biochimie :	p54
<b>Tableau 21</b>	Résultat de lecture macroscopique laboratoire de BTV :	p54
<b>Tableau 22</b>	Aspect microscopique des cellules bactériennes (objectif X100)	p55
<b>Tableau 23</b>	Résultats des tests d'oxydase et de catalase	p58
<b>Tableau 24</b>	Résultats des tests d'identification biochimique	p58

## *Liste des tableaux*

---

<b>Tableau 25</b>	Résultat de la Galeries API 20E:	p59
<b>Tableau 26</b>	Résultat de la Galeries API 20NE :	p59
<b>Tableau 27</b>	L'eau distillée de laboratoire microbiologie	p61
<b>Tableau 28</b>	L'eau de robinet de laboratoire microbiologie	p61
<b>Tableau 29</b>	L'eau distillée de laboratoire BTV	p62
<b>Tableau 30</b>	L'eau distillée de laboratoire de microbiologie : 3 germes/100ml	p62
<b>Tableau 31</b>	L'eau de robinet de laboratoire microbiologie	p62
<b>Tableau 32</b>	L'eau distillée de laboratoire BTV	p62
<b>Tableau 33</b>	Dénombrement sur milieu (TGEA) et (PCA)	p64

# *Introduction*



Les découvertes scientifiques sont devenues si familières que nous utilisons des outils, des appareils sans penser vraiment à nous prémunir de moyens de protection adéquats contre les risques de contaminations microbiennes **(Leleu, 2011)**.

Les laboratoires de biologie jouent un rôle crucial dans la recherche scientifique, la découverte de nouvelles connaissances et le développement de traitements médicaux. Cependant, ces environnements de travail présentent des risques potentiels en termes de contamination, pouvant compromettre la validité des résultats et la sécurité des travailleurs du laboratoire.

Ces environnements sont bien évidemment les plus exposés aux risques d'infection créés par la présence des conditions favorisant la prolifération et la diffusion de microorganismes pathogènes (les virus, les bactéries, les parasites et les champignons)

**(Boulangier, 2007)**

Afin de garantir des conditions optimales de travail et de minimiser les sources de contamination, il est essentiel d'évaluer rigoureusement les pratiques d'hygiène et de sécurité existantes en laboratoire.

L'objectif de cette thèse est d'examiner de manière approfondie l'hygiène et la sécurité en laboratoire de biologie, en se concentrant sur l'évaluation des sources potentielles de contamination. En identifiant les domaines critiques et les pratiques à risque, nous pourrions proposer des recommandations spécifiques visant à réduire les risques et à améliorer la fiabilité des recherches.

La première partie de ce modeste travail est une synthèse bibliographique qui portera sur l'évaluation des normes d'hygiène en laboratoire de biologie. Nous examinerons les protocoles et les réglementations en vigueur, en mettant l'accent sur les bonnes pratiques de manipulation des échantillons, de l'élimination des déchets, du nettoyage et de la désinfection des surfaces. L'objectif sera d'identifier les lacunes potentielles dans les protocoles actuels et de proposer des mesures correctives appropriées.

Ensuite, nous aborderons l'évaluation de la sécurité en laboratoire de biologie. Cela inclura l'analyse des risques associés à l'utilisation de produits chimiques, de substances potentiellement dangereuses et d'équipements spécifiques. Nous étudierons également les protocoles d'urgence et les plans de

contingence en cas d'accidents ou de situations critiques. L'objectif sera d'identifier les zones de vulnérabilité et de proposer des améliorations pour renforcer la sécurité des travailleurs du laboratoire.

Une autre partie de ce mémoire se concentrera sur l'évaluation des équipements de protection individuelle (EPI) et des dispositifs de sécurité en laboratoire. Nous examinerons l'adéquation et l'efficacité des EPI tels que les gants, les blouses et les lunettes de protection. De plus, nous évaluons les dispositifs de sécurité tels que les hottes à flux laminaire, les armoires de sécurité chimique et les systèmes de ventilation. L'objectif sera de déterminer si ces équipements répondent aux normes de sécurité requises et d'identifier d'éventuelles améliorations.

Enfin, nous analyserons les méthodes d'évaluation et les outils disponibles pour mesurer l'efficacité des mesures d'hygiène et de sécurité appliquées en laboratoire de biologie. Cela comprendra l'utilisation de contrôles de qualité, d'audits internes, d'inspections régulières et de systèmes de signalement des incidents. En évaluant de manière systématique ces indicateurs, nous pourrons surveiller l'efficacité des mesures respectées.

*Partie 1*

*Synthèse bibliographique*



# *Chapitre I*

*Les Consignes générales en Hygiène et Sécurité au  
Laboratoire*



## **Rappel sur la notion de risque en laboratoire :**

Hygiène, c'est l'ensemble des moyens collectifs ou individuels, les principes et les pratiques visant à préserver ou à favoriser la santé (AFNOR, 2006). Il en est ainsi des mesures préventives à mettre en oeuvre dans le cadre de la lutte contre les maladies contagieuses. Par exemple ; on cite, dans un laboratoire :

Exécution des contrats de nettoyage.

Interdiction de prendre des repas dans le labo.

Aération des locaux de travail.

Cependant, faire de la prévention, c'est donc réduire les risques, car en pratique, la suppression totale d'un risque est impossible.

## **Toute personne a sa part de responsabilité = Sécurité :**

La sécurité peut être résumée comme :

C'est la situation dans laquelle quelqu'un ou quelque chose n'est exposée à aucun danger et à aucun risque d'agression physique ou d'accident. C'est l'état de ce qui inspire confiance, l'absence d'accidents ou de risque inacceptable.

C'est l'ensemble des mesures de prévention et de secours nécessaires en toutes circonstances à la sauvegarde du personnel de laboratoire.

La sécurité n'est pas l'affaire d'un spécialiste, mais celle de chacun.

Chacun est responsable de sa sécurité et celle des personnes qui l'entourent.

La sécurité est avant tout une affaire de comportement individuel, à tous les niveaux, en commençant par les responsables de laboratoire (Picot & Ducret, 2013).

Ainsi, chacun des membres de la communauté universitaire qui utilise ou a sous sa responsabilité des matières dangereuses doit les entreposer, les transporter, les utiliser et les éliminer dans le respect des lois et règlements en vigueur de façon à assurer sa propre santé, sécurité et intégrité physique, de même que celles de ses collègues, protéger l'environnement et ne pas nuire aux organismes vivants.

### **I.1.1. Comprendre les notions de base (danger, risque):**

À l'origine de tout accident, même mineur, il existe un risque ou danger, qui, sous certaines conditions, conduit aux accidents. Dans ce paragraphe, on présente les notions de risque, de danger et de facteurs de risques. On tente, en les présentant parallèlement, de tisser une réflexion sur ce qui les rapproche plus que sur ce qui les oppose.

Dans leur acception courante ou en fonction des domaines d'application, danger, risque et aléa se confondent totalement ou partiellement. L'accident est défini comme un événement imprévu et soudain, ayant entraîné des dégâts corporels et matériels (OMS, 2009). Les dégâts provoqués peuvent être plus ou moins importants, à caractère temporaire ou permanent.

Le **danger** ou phénomène dangereux, est la propriété ou capacité intrinsèque par laquelle une chose (par exemple : matières, matériel, méthodes et pratiques de travail) est susceptible de causer un dommage (une lésion ou une atteinte à la santé). Le danger est donc une « cause capable de provoquer un dommage » (sur une cible ou un enjeu) (Assailly, 2010).





Le **risque** est la probabilité que le dommage potentiel se réalise dans les conditions d'utilisation et/ou d'exposition et l'ampleur éventuelle du dommage (Assailly, 2010).

« *Le danger est un état, le risque sa mesure* » Les facteurs de risques sont des éléments qui peuvent augmenter ou diminuer la probabilité de survenance d'un accident ou la gravité d'un événement. Les facteurs de risques complètent Dans le présent contexte, quand on parle d'exposition, il s'agit du contact entre le danger et une personne, pouvant dès lors entraîner un dommage (Desroches *et al.*, 2015). Sans exposition, pas de possibilité de dommage. Le risque est donc la probabilité que quelqu'un soit atteint par un danger.

#### **I.1.1.1. Les types de risques :**

À l'origine de tout accident il existe un ou plusieurs risques ou dangers et, lorsque les nombreux paramètres sont réunis, le risque donne naissance à un accident. Le caractère imprévu ou fortuit de cet événement soudain s'explique par le nombre et la complexité des paramètres qui déterminent le passage de la situation de risque à l'accident (Tableau 01).

**Tableau 01 : Les types de risques (Picot & Ducret, 2013)**

	<p><b>Dangers ?</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Formes dangereuses (verre brisé, aiguille...)</li> <li>➤ Plancher glissant</li> <li>➤ Électricité</li> <li>➤ Températures extrêmes (chaud ou froid)</li> <li>➤ Équipement sous haute pression ou vide</li> <li>➤ Bruits et vibrations</li> </ul>	<p><b>Blessures et atteintes</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Coupures, piqûres et possibilité de contamination</li> <li>▪ Chute</li> <li>▪ Électrifications, électrocution</li> <li>▪ Brûlures, engelures</li> <li>▪ Détérioration de l'acuité auditive, de l'équilibre</li> <li>▪ Fatigue, stress, diminution de la vigilance</li> </ul>
	<p><b>Proviennent de</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Absorption de produits toxiques, corrosifs, irritants, réactifs.</li> <li>➤ Exposition à des substances inflammables</li> <li>➤ Exposition à des gaz, fumées...</li> <li>➤ Exposition à des poussières ou fibres</li> </ul>	<p><b>Blessures et atteintes</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Dommage organes cibles</li> <li>▪ Brûlure chimique</li> <li>▪ Intoxication, irritation</li> <li>▪ Maux de tête</li> <li>▪ Problème respiratoire</li> </ul>
	<p><b>Proviennent de</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Virus, bactérie, parasite....</li> <li>➤ Morsures, égratignures ou piqûres d'animaux</li> <li>➤ Allergies</li> </ul>	<p><b>Blessures et atteintes</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Rhume, grippe, hépatite</li> <li>▪ Rage, tétanos</li> </ul>
	<p><b>Proviennent de</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Rayons X, gamma</li> <li>➤ Particules alpha, bêta</li> <li>➤ Neutron</li> </ul>	<p><b>Blessures et atteintes</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Troubles neurologiques et physiques</li> <li>▪ Altération d'ADN (cancer, leucémie)</li> </ul>

### I.1.1.2. Risques physiques :

Ce sont les risques dus aux ambiances de travail (ambiance thermique, ambiance sonore, les vibrations, ambiance lumineuse) et les risques dus aux rayonnements (rayonnements ionisants, rayonnements ultra-violets et infrarouges, ondes électromagnétiques).

### I.1.1.3. Le bruit :

C'est une source d'inconfort, qui peut conduire à une baisse de vigilance ou de précision des gestes qui augmente le risque d'accident et qui peut conduire à un coup de chaleur ou une hypothermie parfois mortelle (INRS, 2021). En effet, de mauvaises conditions thermiques dans les locaux de travail peuvent être à l'origine de maux de tête, gêne respiratoire, rhumes, douleurs.

### Exemples :

Travail en ambiance froide, humide (chambre froide, congélateurs,...) aggravé par une mobilité réduite.

Travail en ambiance chaude (verrière, laminoir, fonderie...) aggravé par les efforts physiques.

#### **I.1.1.4. Risques chimiques :**

Les produits chimiques sont partout, sous forme liquide, solide ou gazeuse. On les retrouve, comme substances pures ou mélanges, dans toutes les activités et secteurs professionnels. Les risques chimiques sont donc liés à une exposition professionnelle à ces substances chimiques. Les utilisateurs de produits chimiques qu'ils soient étudiants ou ingénieurs dans les laboratoires, sur les chantiers ou les exploitations agricoles, sous-estiment bien souvent, lorsqu'ils ne les ignorent pas, la dangerosité des produits chimiques manipulés et les risques auxquels ils sont exposés. Les conséquences sur la santé sont de degrés très variables (Moran & Masciangiol, 2010).

#### **I.1.1.5. Risques biologiques :**

**Tableau 02 :** Les différentes classes d'enceintes de sécurité biologique (CNRS, 2017).

<b>Equipements</b>	<b>Caractéristiques de sécurité</b>
<b>ESB du type I</b>	<p>Ils assurent simultanément la protection du manipulateur par la création d'un flux d'air entrant dans l'enceinte et de l'atmosphère par l'évacuation du flux d'air hors de l'enceinte à travers un filtre à très haute efficacité.</p> <p>Ils n'assurent pas la protection du produit car celui-ci est baigné par de l'air en provenance directe du laboratoire.</p>
<b>ESB du type II</b>	<p>Ils assurent la protection du manipulateur par une aspiration créée au bord avant du plan de travail constituant une barrière immatérielle entre le manipulateur et la manipulation.</p> <p>Ils assurent également la protection de l'atmosphère par l'évacuation du flux d'air hors de l'enceinte à travers un filtre à très haute efficacité.</p>
<b>ESB du type III</b>	<p>Ils assurent la protection du manipulateur par la création d'un volume entièrement fermé et du produit par l'alimentation de l'enceinte en air à travers un filtre à très haute efficacité.</p> <p>Ils assurent également la protection de l'atmosphère par l'évacuation du flux d'air hors de l'enceinte à travers, en général, deux filtres à très haute efficacité placés en série.</p>

## **II. Groupes de risque :**

Les organismes infectieux peuvent être évalués selon différentes caractéristiques, soit la pathogénicité, la dose infectieuse, le mode de transmission, les hôtes, les mesures préventives ainsi que la disponibilité d'un traitement efficace (Cris & Piero, 2020). L'analyse de ces paramètres permet d'établir une classification selon le groupe de risque, c'est-à-dire le danger qu'il représente pour la santé dans un contexte de manipulation en laboratoire (Tableau 02).

Quatre groupes de risque ont ainsi été déterminés :

- **Groupe de risque 1** : présente un risque faible pour le manipulateur et la collectivité.
- **Groupe de risque 2** : présente un risque modéré pour le manipulateur et faible pour la collectivité.
- **Groupe de risque 3** : présente un risque élevé pour le manipulateur et faible pour la collectivité.
- **Groupe de risque 4** : présente un risque élevé pour le manipulateur et la collectivité.

## **Tenues et équipements de protection :**

Les équipements de protection individuelle (ÉPI) ont pour rôle de réduire à un niveau acceptable l'exposition d'un travailleur à un ou plusieurs types de risque. Ils doivent être bien entretenus et inspectés avant chaque utilisation (Shematek & Wood, 2012). L'annexe 1 présente les différents équipements de protection personnelle auxquels les étudiants, ingénieurs et enseignants devraient avoir accès.

### **Protection du visage :**

#### **II.1.1. Lunettes de protection :**

Au laboratoire de chimie, les lunettes de sécurité doivent être portées en tout temps. Cette obligation s'étend non seulement aux étudiants, mais aussi à toute personne entrant dans les laboratoires : ingénieurs, enseignants, etc. Les responsables du laboratoire ont la stricte responsabilité d'appliquer ce règlement en tout temps.

Dans les laboratoires de recherche biologique, le port des lunettes de protection est requis lors de manipulations de produits chimiques ou de matières biologiques risquant de produire des éclaboussures. Le travail avec des animaux requiert également le port de lunettes de sécurité.

### **Remarque :**

Certains modèles de lunettes de sécurité se portent par-dessus comme les lunettes correctrices. Le port de **lentilles cornéennes** est permis mais est cependant déconseillé aux personnes qui travaillent dans le laboratoire pendant la manipulation de produits chimiques volatils. Cependant, les employés et les étudiants qui portent des lentilles cornéennes doivent en aviser les personnes responsables du laboratoire. Elles ne remplacent pas les lunettes de sécurité. (**Shematek & Wood, 2012**).

### **II.1.2. Écran de protection :**

La fenêtre de la hotte constitue une bonne protection contre les éclaboussures de produits corrosifs ou dangereux, il est tout de même suggéré de porter des lunettes de protection en plus de travailler avec la vitre baissée devant son visage (**Shematek & Wood, 2012**).

Le **masque facial** devrait être porté chaque fois qu'une manipulation comporte un danger d'explosion ou de projection (**Fig. 1**). Il sert également à protéger des projections de liquides cryogéniques et de liquides portés à une température élevée. Un écran résistant aux explosions peut aussi être placé entre le montage et le travailleur.



**Fig. 01 :** Masque facial pour la manipulation des cryogènes (**Shematek & Wood, 2012**).

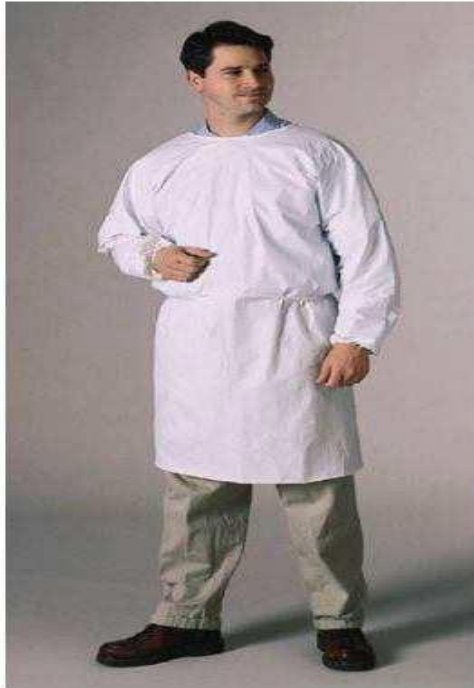
#### **II.1.2.1. Couvre-tête :**

Les cheveux longs doivent être attachés de façon sécuritaire dans les laboratoires, surtout lorsqu'une manipulation exige de travailler en présence d'une flamme nue ou avec des appareils comportant des parties mobiles. Le port d'un voile ou d'un foulard n'est pas recommandé, voire interdit lors du travail sur les machines ou montages avec pièces mobiles (**Shematek & Wood, 2012**). S'ils sont portés au cou ou à la tête, ils doivent être portés de façon à ce qu'ils ne puissent s'accrocher, les parties de tissus excédentaires doivent être attachées au même titre que les cheveux.

### II.1.2.2. Le port du sarrau ou tablier :

Le port du sarrau ou tablier, attaché correctement, est obligatoire pour tous les employés et les étudiants travaillant dans un laboratoire. Le coton est privilégié pour ses propriétés non inflammables. Si le travail requiert l'utilisation de composés pyrophoriques, ou d'une flamme, alors un traitement qui rend le tissu résistant au feu serait souhaitable (**Gramond, 2014**). La fermeture du sarrau par bouton pression permet de l'enlever très rapidement, en cas de feu ou de renversement de produits.

Il est recommandé de porter un sarrau atteignant les genoux (**Fig. 2**), et dont les manches rejoignent les gants, pour ne pas laisser de peau non protégée.



**Fig. 2.** Sarrau jetable imperméable (à ouverture dans le dos) (**Shematek & Wood, 2012**).

### II.1.2.3. La protection des pieds :

Chaque laboratoire exige le port de chaussures fermées aux deux bouts et à talon plat. Des chaussures fermées de type chausson de ballerine, ou espadrilles en filet, peuvent être autorisées ou non par le

responsable du laboratoire. Le port de chaussures fermées recouvrant le pied en entier est toutefois obligatoire dans les laboratoires lors de la manipulation de radio-isotopes. (**Shematek & Wood, 2012**).

#### **II.1.2.4. Protection du système respiratoire :**

#### **II.1.2.5. Masques pour vapeurs organiques et inorganiques :**

Afin de se protéger contre les vapeurs de natures organique et inorganique, deux types de masques et de cartouches sont mis à la disposition de l'utilisateur. Les **demi-masques** et **masques faciaux complets** peuvent être utilisés avec des cartouches avec filtre spécifique muni ou non d'un pré-filtre P100 (**Guy Gautret, 2008**). Les cartouches avec charbon activé offrent une protection contre les vapeurs organiques, de chlore, de dioxyde de soufre, de dioxyde de chlore, de chlorure d'hydrogène, de sulfure d'hydrogène, d'ammoniac, de méthylamine, de formaldéhyde et de fluorure d'hydrogène. Les cartouches ayant en plus un pré-filtre P100 offrent la même protection chimique en plus de fournir une protection contre tous les types d'aérosol à particules.

#### **II.1.2.6. Hotte chimique selon la Norme AFNOR NF X 15- 211: 2009 :**

Les manipulations impliquant l'utilisation de solvants et d'autres produits volatils (inflammables ou combustibles), d'acides ou de bases concentrées, doivent obligatoirement être effectuées sous une hotte chimique. Les opérations pouvant dégager des poussières ou des fumées nocives doivent également être effectuées sous une hotte. L'utilisateur doit s'assurer que sa hotte fonctionne de façon adéquate. Il est facile de vérifier le bon fonctionnement d'une hotte en attachant un bout de papier au bas de la vitre de la hotte. Le papier doit être aspiré vers l'intérieur.



**Fig 03 :** Hotte chimique Norme AFNOR NF X 15- 211: 2009

Afin que la hotte assure le degré le plus élevé de protection, les directives suivantes devraient être observées (Guy Gautret, 2008):

Tout le gros appareillage à l'intérieur de la hotte devrait être placé sur des blocs ou des pattes pour permettre à l'air de circuler dessous.

Seules les matières employées dans une expérience en cours devraient être placées dans la hotte. L'encombrement de la hotte peut créer des perturbations au niveau de la circulation d'air.

Utiliser la hotte avec la vitre baissée le plus possible, sans nuire aux activités.

Travailler le plus loin possible à l'intérieur de la hotte. Un minimum de 15 cm est recommandé.

Tenez-vous debout devant la hotte, avec seuls les avant-bras à l'intérieur. La vitre baissée protégera ainsi votre visage et votre cou de toute projection.

Éviter de laisser du papier dans la hotte, en particulier en travaillant avec des produits inflammables. Des papiers aspirés dans le conduit de la hotte peuvent réduire dramatiquement son efficacité.

Tous les transferts de produits chimiques et de solvants devraient être faits sous la hotte (remplissage de pissettes par exemple). Des quantités limitées devraient être manipulées.

### III. Équipement de sécurité en laboratoire :

#### Douche oculaire et douche d'urgence :

Si un produit chimique devait entrer en contact avec les yeux, le visage ou toute autre partie du corps, il convient d'utiliser la **douche oculaire** ou la **douche d'urgence** sans tarder pour en atténuer les effets néfastes (Fig. 4). Les parties affectées doivent être rincées pendant au moins 15 minutes (Shematek & Wood, 2012). Puisque ces appareils sont utilisés lors de situations d'urgence, impliquant parfois un certain degré de panique, il est essentiel que l'aire entourant les douches oculaires et les douches d'urgence soit maintenue dégagée en tout temps. N'hésitez pas à demander de l'aide lorsque vous avez besoin de vous servir d'une de ces douches, il peut être

difficile de se rincer correctement les yeux seuls. Toute personne travaillant dans le laboratoire doit avoir repéré leur emplacement et savoir opérer la douche d'urgence et la douche oculaire.



**Douche fixe de premiers secours**  
douche de sécurité

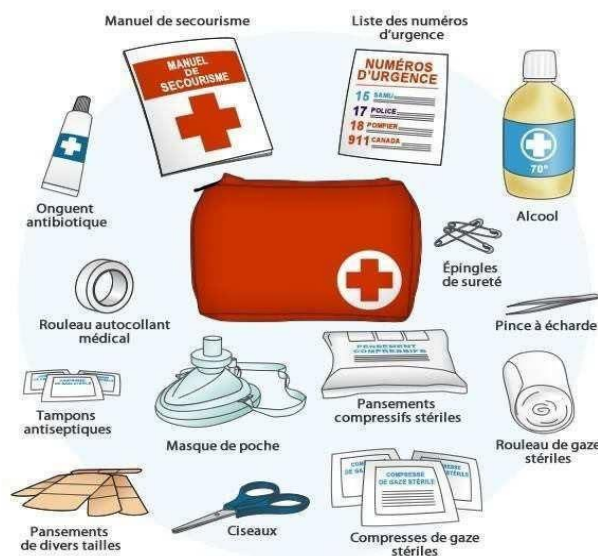


**Douche oculaire**  
rince-œil

**Fig. 4 :** Douche d'urgence et douche oculaire (Shematek & Wood, 2012).

### III.1.1. Trousse de premiers soins selon L'article R4224-14 du code du travail

Une trousse de premiers soins conforme aux règlements en vigueur doit être accessible dans chaque laboratoire. Chaque utilisateur du laboratoire doit connaître l'emplacement de la trousse. Elle est gérée par les personnes responsables du laboratoire, qui doivent en faire l'inventaire régulièrement et voir à ce que son contenu soit renouvelé, selon les besoins.



**Fig 5 :** Trousse de premiers soins  
(Shematek & Wood, 2012).

### III.1.2. Extincteurs :

Les extincteurs constituent un équipement qui permet de lutter contre le feu. Pour repérer facilement l'agent contenu dans un Extincteur, le poignée de transport, est coloré en rouge, jaune et bleu. Ainsi, on distingue plusieurs types d'extincteurs :

**Fig 06 : Extincteurs à gaz (CO<sub>2</sub>) (en rouge) selon la norme NF EN 3-7: 2004**

En baissant le taux d'oxygène dans l'air, le gaz contenu dans l'extincteur (très souvent du dioxyde de carbone) étouffe le feu. Conservé sous pression à l'état liquide, et donc à basse température, agit également par refroidissement (Shematek & Wood, 2012). Le dioxyde de carbone est plus léger que l'air au-delà de 179°C ce qui explique la nécessité de bien couvrir toute la surface occupée par les flammes afin que le gaz puisse agir. Ainsi, l'utilisation d'un extincteur au CO<sub>2</sub> est efficace contre un **Feu de liquide (alcools, solvants organiques, huiles, graisses)**, mais aussi sur **l'électronique**.



**Fig 07 : Extincteurs à poudre (en jaune) selon la norme NF EN 3-7: 2004**

Il contient un produit chimique agissant par étouffement des flammes, tout en isolant le combustible (Shematek & Wood, 2012). Par ailleurs, leur utilisation engendre la naissance de nuages de poudre diminuant la visibilité et très irritant.

Cependant, ce sont les extincteurs les plus rapides en matière d'extinction du feu, et constituent la solution la plus efficace pour

les feux de classe C (**Feu de métaux sodium, magnésium et de gaz propane, gaz de ville**).



### Fig 08 : Extincteurs à eau (en bleue) selon la norme NF EN 2004

Ils contiennent un additif émulseur, rendant l'eau plus pénétrante, plus mouillante résultant en une meilleure efficacité dans la lutte contre les flammes (Shematek & Wood, 2012). Ils doivent être inspectés tous les ans, et subir un contrôle visuel au moins tous les 6 mois. Ce type d'extincteurs est donc très efficace dans les feux de classe A (**Feu de matériaux solides (bois, tissus, carton, papiers)**)



## 3. Les règles générales de sécurité selon l'OMS (2012)

### 3.1. Les bonnes pratiques de laboratoire

#### a. Se protéger

Toute personne **doit informer** le responsable du labo en cas de problème de santé majeur, d'**allergie** connue à un produit, d'**asthme** ou en cas de **grossesse**.

Porter des **lunettes de sécurité** en tout temps.

Remplacer ses **lentilles cornéennes** par des verres correcteurs.

Porter les **ÉPI** et une tenue adéquate.

S'exposer le **moins possible** aux **produits dangereux**.

Éviter le travail **en solitaire** et surtout en dehors des heures normales.

#### b. Travailler proprement

**Séparer** les **zones propres** d'écriture et de lecture des **zones de manipulation**.

**Ne pas porter** de gants dans les **zones propres**.

#### c. Prévenir les accidents

**Éviter** les mouvements brusques, **marcher** au lieu de courir.

Fumer, manger ou garder de la nourriture dans les laboratoires **est interdit**.

Les laboratoires **sont réservés** aux personnes autorisées seulement.

**Se laver** les mains en quittant le laboratoire.

### 3.2. La préparation du travail en laboratoire

Les **dangers** et les **risques** reliés à mon travail et aux matières dangereuses utilisées.

Les équipements de protection individuelle (**ÉPI**) à utiliser.

Les **règles de sécurité** et les **procédures** s'appliquant à mon travail.

Le fonctionnement et le bon usage des **équipements**.

L'emplacement et l'usage de chaque **équipement** d'urgence (extincteurs d'incendie, la trousse de premiers soins...). **l'OMS (2012)**

#### 1. Pendant le travail en laboratoire

##### a. Être responsable

**Rester** concentré : **éviter** la musique ou la multitâche impliquant le cellulaire, téléphone intelligent.

**Exécuter** les travaux impliquant des matières **dangereuses** sous une **hotte** ou une **enceinte de sécurité biologique** et **s'assurer** de leur bon fonctionnement.

##### b. Être préventif

**Ne pas laisser** d'expérience **sans surveillance**, à moins qu'elle ne comporte aucun risque.

**Ranger** les matières ou substances **dangereuses** immédiatement après leurs utilisations.

**Identifier** les contenus **de tous les récipients** de manière claire et lisible.

**Attacher** les cheveux longs et **porter** des **souliers fermés**.

**Travailler sans bijoux**.

**Ne pas laisser** de bouteilles sur le sol, ni de porte d'armoire ou de tiroir ouvert.

##### c. Avant de quitter le laboratoire

**Se laver** les mains (pour soi et pour les autres).

**Laisser** les lieux **propres** et **fonctionnels**.

**Laisser** vos **coordonnées** à proximité pour vous rejoindre en cas de problème.

**Fermer** les appareils de chauffage, l'électricité, les conduites d'eau et de gaz.

**Effectuer le nettoyage** des lieux : appareil ou aire de travail.

**Étiqueter, emballer** et **éliminer** tous les **déchets** selon les procédures appropriées.

**Verrouiller** la porte du laboratoire à la sortie. **POMS (2012)**

### III.1.3. Les risques chimiques :

Tout le monde utilise des produits chimiques, que ce soit lors d'activités professionnelles ou domestiques. On dénombre actuellement sur le marché plus de substances pures qui, par mélange, donnent des millions de préparations. On trouve les produits chimiques sous forme liquide, solide, gazeuse, comme :



**Fig 09** : Les risques chimiques **POMS (2012)**

Produits de base, dans les opérations de synthèse chimique, l'industrie pharmaceutique, le traitement de surface de métaux, la peinture, la teinture ou le blanchiment des textiles.

Produits annexes comme solvants, diluants, colles, additifs, fluides d'usage... Produits de nettoyage des locaux, du matériel, du personnel.

Produits d'emballage comme la mousse de polyuréthane. **(Nichan, 2011)**

## 1. Information générale sur le risque chimique

### 1.1. Les risque chimique

Les risques chimiques sont le résultat de l'exposition à un ou plusieurs produits chimiques dangereux ou à leur utilisation. Présents dans tous les secteurs d'activités, ces produits peuvent avoir des effets immédiats sur la santé de manière aiguë telle que les lésions, brûlures, irritations, intoxication...ou chronique sur le long terme pour aboutir à des pathologies (cancer, ...) (**Nichan, 2011**). Les propriétés physicochimiques (inflammabilité, explosivité, toxicité, réaction dangereuse) des substances utilisées, manipulées ou stockées révèlent le danger auquel l'exposition représente des situations dangereuses susceptibles d'être l'origine du risque chimique.

### 1.2. Les produits chimique dangereux

C'est des substances et mélanges de substances capables de provoquer un ou plusieurs des effets suivants : intoxication, irritation, lésion, brûlure, incendie, explosion.

Exemple de Produits chimiques dangereux (**Nichan, 2011**):

**Très toxiques** : azide de sodium, hygromycine B, actinomycine D, Wortmannine.

**Acides et bases fortes** : HCl, NaOH, KOH (réactifs sur l'eau).

**Inflammables** : acétone, éthanol, alcool isoamylique, butanol, isopropanol.

**Fluides cryogéniques** : CO<sub>2</sub> et N<sub>2</sub>, toxiques par gelures pour l'homme.

Remarque :

Substances : les éléments chimiques et leurs composés tels qu'ils se présentent à l'état naturel ou tels qu'ils sont obtenus par tout procédé de production Exemples : acétone, chlorure de sodium, alcool éthylique, plomb.

Mélanges : mélanges ou solutions composés de deux substances ou plus.

### III.2. Agent Chimique CMR :

Certains agents chimiques ont, à moyen ou long terme, des effets cancérogènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction (**Nichan, 2011**). Ils sont dénommés agents CMR.

Acide Borique. Bleu Trypan, Bleu Evans et Acridine Orange. Bromure D'éthidium (BET), B mercaptoéthanol et Acrylamide. Iodure de Propidium, formaldéhyde, Para-formaldéhyde, Formamide. Hexane, Phénol, Chloroforme, Méthanol, Toluène.

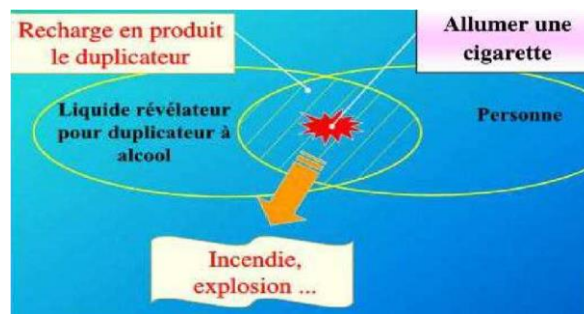
**Fig 10 :** Agent Chimique CMR

Pour pouvoir maîtriser les risques chimiques, il est nécessaire de comprendre le processus d'apparition d'un dommage.



### III.2.1. Risque d'incendie et d'explosion

Les produits chimiques peuvent jouer un rôle dans le déclenchement d'un incendie par leur présence dans l'air ambiant ou en cas de mélange avec d'autres produits. Ils peuvent également aggraver l'ampleur d'un incendie (Fig 11). De nombreuses substances peuvent également, dans certaines conditions, provoquer des explosions (Nichan, 2011). Ce sont pour la plupart des gaz et des vapeurs, mais aussi des poussières inflammables et des composés particulièrement instables.



**Fig 11 :** Processus d'apparition d'un incendie et explosion (INRS, 2021b).

Ainsi, la réaction de combustion à l'origine de l'incendie nécessite la présence simultanée de trois éléments, une matière combustible, de l'oxygène et une température d'inflammation.

Cette température d'inflammation peut être atteinte en présence d'une flamme, d'une étincelle, d'une source de chaleur, d'un frottement. Ces trois éléments sont généralement présentés dans un triangle (Fig. 12), dit triangle de feu (Nichan, 2011). La déclaration d'un feu est donc consécutive à la coexistence

de trois conditions :

- présence d'un combustible
- présence d'un comburant (oxygène)
- présence d'une source de chaleur

Les trois côtés du triangle du feu (**Fig 12**) indiquent les conditions pour la naissance d'un feu. Il ne peut pas y avoir de feu si l'un de ces éléments manque. Si les trois éléments sont combinés dans les bonnes proportions, le triangle de feu est fermé et un feu prend naissance. Quand on retire un de ces facteurs, le feu s'éteint. Ce triangle est donc aussi un instrument utile pour prévenir et combattre l'incendie.



**Fig. 12.** Le triangle du feu (INRS , 2021b)

### III.2.2. Risque d'intoxication :

Tout produit, pur ou en mélange, qui pénètre, par une voie quelconque, dans l'organisme humain, est susceptible de perturber voire modifier le fonctionnement normal du corps. Le produit absorbé se fixe préférentiellement sur un ou plusieurs organes du corps ; il y a alors dysfonctionnement plus ou moins important qui se traduit par l'apparition de pathologies. Suivant différents paramètres, dont essentiellement la nature et la réactivité du produit chimique absorbé, l'intoxication se manifeste de deux façons différentes, accidentelle ou chronique (Aubert *et al.*, 2018).

### III.2.3. Les bonnes pratiques de laboratoire :

#### L'affichage

À l'entrée de chaque laboratoire, une affiche indique :

Le nom du laboratoire et ses coordonnées

Les consignes de sécurité, les avertissements et les dangers

Les personnes responsables

Les principes élémentaires

Se protéger

Porter des lunettes de sécurité en tout temps.

Remplacer ses lentilles cornéennes par des verres correcteurs.

Les verres correcteurs ne sont pas des lunettes de sécurité.

Porter les équipements de protection et une tenue adéquate.

Le sarrau doit rester dans le labo et en tout temps ranger séparément des vêtements de ville.

S'exposer le moins possible aux produits dangereux.

Éviter le travail en solitaire et surtout en dehors des heures normales.

Travailler proprement

Séparer les zones propres d'écriture et de lecture des zones de manipulation. Ne pas porter de gants dans les zones propres.

Prévenir les accidents

Éviter les mouvements brusques, marcher au lieu de courir.

Fumer, manger ou garder de la nourriture dans les laboratoires est à proscrire. La nourriture ne doit jamais être en contact avec de la verrerie, des ustensiles ou des équipements de laboratoire.

Les laboratoires sont réservés aux personnes autorisées seulement.

Se laver les mains en quittant le laboratoire et avant de consommer de la nourriture (en dehors du labo).

### **III.2.4.LA MÉTHODE HACCP : ASSURER LA SÉCURITÉ MICROBIOLOGIQUE**

L'HACCP est l'abréviation de Hazard Analysis Critical Control Point. Il s'agit principalement d'un outil de travail qui facilite l'identification et la gestion des risques en termes d'hygiène alimentaire et de contrôle sanitaire. L'objectif est d'éliminer tous les dangers pouvant être nocifs sur l'homme ou de mettre en place des dispositifs permettant de réduire leur probabilité. Cette méthode se base sur sept principes et sa mise en place se fait en différentes étapes. Il s'applique sur trois types de danger : chimiques comme les pesticides ou les additifs, biologiques comme les virus et les bactéries ou physiques comme le bois et le verre.

## **Avantages de la méthode HACCP**

L'HACCP est un outil permettant d'assurer la sécurité sanitaire des aliments et reposant sur des bases scientifiques :

identification de manière systématique de tous les dangers biologiques, chimiques et physiques ;

élaboration des mesures préventives nécessaires à leur contrôle. On entend par le terme de contrôle, l'élimination du risque ou sa réduction à un niveau acceptable ;

vérification de la maîtrise du risque par des contrôles et, le cas échéant, réajustement.

### **III.2.4.1.LES OBJECTIFS DE LA MÉTHODE HACCP**

Concrètement, l'HACCP est une méthode globale au service des professionnels de laboratoire et qui permet de garantir l'hygiène et la sécurité de notre travail.

Les objectifs de la **méthode HACCP** sont d'anticiper et contrôler les dangers suivants :

- Les dangers physiques : la présence d'un corps étranger dans les boîtes de pétri
- Les dangers biologiques : bactéries , levures, champignons ,
- Les dangers chimiques : la présence de pesticide ou d'un produit d'entretien des boîtes  
(**hygien-alimentaire-haccp, 2017**)

### **III.2.4.2.Au sein de la démarche HACCP, existent 7 grands principes.**

- Principe HACCP 1 : Analyser les dangers
- Principe HACCP 2 : Identifier les CCP (points critiques de contrôle)
- Principe HACCP 3 : Fixer un seuil critique par CCP
- Principe HACCP 4 : Établir un système de surveillance par CCP
- Principe HACCP 5 : Établir des mesures correctives
- Principe HACCP 6 : Vérifier et valider le plan HACCP
- Principe HACCP7: Enregistrer et constituer des registres (**hygien-alimentaire-haccp, 2017**).

### **III.2.4.3.L'application de système HACCP dans laboratoire microbiologique :**

1. Formation de l'équipe HACCP : Constituez une équipe comprenant des microbiologistes, des spécialistes de la sécurité alimentaire, des responsables de la qualité et d'autres experts pertinents. Cette équipe sera responsable de la mise en œuvre du système HACCP et de la gestion des risques associés aux contaminations des boîtes de Petri.
2. Analyse des processus : Analysez en détail les processus liés à l'utilisation des boîtes de Petri dans le laboratoire. Identifiez les différentes étapes, y compris la préparation des milieux de culture, l'ensemencement des échantillons, l'incubation, l'observation et l'interprétation des résultats.
3. Identification des dangers microbiologiques: Identifiez les dangers microbiologiques potentiels qui pourraient contaminer les boîtes de Petri. Cela peut inclure la présence de micro-organismes pathogènes dans l'environnement, les risques de contamination croisée, les erreurs de manipulation des boîtes de Petri, etc.
4. Détermination des points critiques de contrôle (PCC) : Identifiez les points critiques de contrôle spécifiques dans les processus d'utilisation des boîtes de Petri. Par exemple, la préparation stérile des milieux de culture, l'asepsie lors de l'ensemencement des échantillons, l'incubation à la température appropriée, etc.
5. Établissement des limites critiques : Établissez des limites critiques pour chaque PCC identifié. Par exemple, la limite critique pour la contamination croisée peut être l'absence de croissance microbienne sur les boîtes témoins non inoculées. Les limites critiques doivent être spécifiques et mesurables pour permettre une évaluation objective.
6. Mise en place de procédures de surveillance : Établissez des procédures de surveillance pour chaque PCC afin de s'assurer que les limites critiques sont respectées. Cela peut inclure des vérifications régulières de la stérilité des milieux de culture, des contrôles microbiologiques périodiques des boîtes de Petri, des enregistrements de température d'incubation, etc.
7. Développement d'actions correctives : Prévoyez des actions correctives à entreprendre en cas de dépassement des limites critiques ou de non-conformité aux procédures. Par exemple, en cas de contamination avérée, il peut être nécessaire de reprendre

l'ensemencement à partir de nouvelles boîtes stériles et de prendre des mesures pour éviter une nouvelle contamination.

8. Mise en place d'un système de documentation : Établissez un système de documentation pour enregistrer toutes les étapes du processus HACCP, les résultats de surveillance, les actions correctives prises, les incidents de contamination.
9. Vérification du système HACCP : Effectuez régulièrement des audits internes pour vérifier l'efficacité du système (**hygien-alimentaire-haccp, 2017**)

# *Chapitre II*

*Les stratégies de surveillance microbiologique*



# I. Rappel sur la démarche d'assurance qualité

## I.1. Origine du concept

Les grands concepteurs sont les professeurs William Edwards Deming (1900-1993) et Kaoru Ishikawa (1915-1989).

Pour Deming, la mise en œuvre du management de la qualité se décline en quatre parties PDCA (figure 13) qui correspondent à :

1. **Plan** : définir les exigences de la demande afin de mettre en œuvre des processus de réalisation adaptés.
2. **Do** : réaliser précisément les processus prédéfinis.
3. **Check** : surveiller et contrôler la réalisation afin de garantir la conformité du produit.
4. **Act** : agir, prendre des mesures en cas de dérive afin de les corriger ou de les arrêter.

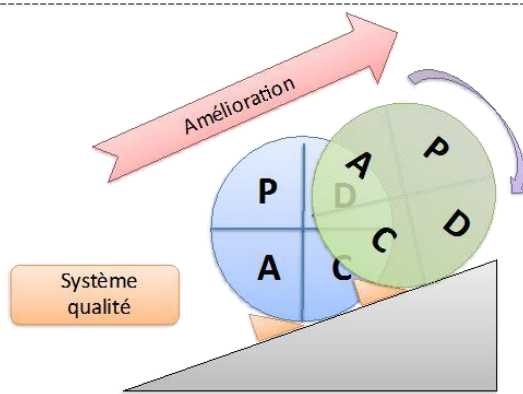


Fig 13 : Roue de Deming

L'approche d'Ishikawa correspond à l'analyse des causes en utilisant le diagramme des causes à effets ou règle des 5 M (figure 14 )

1. **Matière** : matériaux utilisés durant les processus.
2. **Matériel** : équipements disponibles et nécessaires.
3. **Méthode** : mode opératoire à suivre.
4. **Main-d'œuvre** : personnel disponible.
5. **Milieu** : environnement dans lequel se réalise le processus.

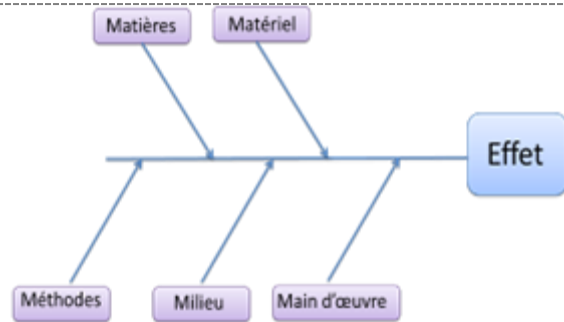


Fig 14 : Diagramme d'Ishikawa

(ou « diagramme en arêtes de poisson »)

## **Le système actuel**

Le système de la qualité est décrit sur le plan mondial à travers les normes ISO (International Standardisation Organisation), regroupant plus de 150 pays. Actuellement quatre normes principales sont en vigueur :

- NF EN ISO 9000 (2005) Systèmes de management de la qualité - Principes essentiels et vocabulaire,
- NF EN ISO 9001 (2008) Systèmes de management de la qualité,
- NF EN ISO 9004 (2009) Gestion des performances durables d'un organisme - Approches de management par la qualité,
- NF EN ISO 9011 (2011) Lignes directrices pour l'audit des systèmes de management.

Les normes ISO sont reprises :

- au niveau européen par les normes CEN (Comité Européen de Normalisation) créées pour harmoniser les différentes normes des états membres,
- au niveau national par l'AFNOR (Association Française de NORmalisation).

Pour les laboratoires demandant l'accréditation, les normes à respecter sont :

- pour la biologie médicale (LBM) :
  - la norme NF EN ISO 15189 (2012) Laboratoires de biologie médicale - Exigences concernant la qualité et la compétence - Laboratoires d'analyses de biologie médicale ;
  - la norme NF EN ISO 22870 (2006) - Analyses de biologie délocalisées (ADB) - Exigences concernant la qualité et la compétence ;
- pour les prélèvements et les analyses environnementales : la norme NFEN ISO/CEI 17025 (2005) Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.

Ces documents décrivent l'ensemble des prescriptions relatives au management (système qualité, maîtrise documentaire, sous-traitances...) et aux techniques (personnel, méthodes et validations de méthodes, équipement...).

### **I.1.1.Stratégie pour les contrôles de l'air :**

#### **Préambule**

Il n'y a pas de texte réglementaire spécifiques pour la surveillance de l'air, seulement des normes d'application non obligatoire (NF S90-351 (2013), NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016), NF EN ISO 14698 (2004), et des recommandations de sociétés savantes (guide ASPEC <sup>(6)</sup> « la biocontamination – salles propres, environnements maîtrisés et zones de confinement », guides SF2H « Qualité de l'air au bloc opératoire et autres secteurs interventionnels » <sup>(7)</sup> et « Risque infectieux fongique et travaux en établissement de santé » <sup>(9)</sup>). Les établissements ont la possibilité de reprendre les objectifs de qualité d'air des normes ou des objectifs différents qu'ils définissent eux-mêmes et qu'ils sont à même de justifier (par exemple, diminuer les valeurs maximum des classes microbiologiques, viser la classe ISO 6 pour certains locaux...)

Hors contexte particulier (épidémies, recherches fongiques), les contrôles d'air se justifient uniquement dans des zones à environnement maîtrisé (ZEM) et s'échelonnent tout le long de la vie de ces zones sous la forme de :

#### **I.1.2. Qualification opérationnelle (QO) (ou fonctionnelle) : processus effectué lors de la mise en service de la ZEM qui permet d'assurer qu'elle est capable de satisfaire aux exigences spécifiées.**

Les mesures sont effectuées après 48 h de fonctionnement, hors présence humaine, locaux totalement équipés et portes fermées et comportent (norme NF S90351 (2013)) : la classification particulière, la classification microbiologique, la cinétique d'élimination des particules, la classification microbiologique des surfaces, la vérification des paramètres aérauliques de la zone (vitesses de déplacement d'air des flux d'air entrant, débits d'air de soufflage, de reprise et d'extraction, taux de brassage horaire, taux d'air neuf, visualisation des flux d'air (identification des zones mortes et vérification de la laminarité des flux unidirectionnels), la vérification des pressions différentielles (gradient ou cascade de pressions), la vérification de la température et éventuellement de l'hygrométrie (% HR).

### **I.1.3. Requalification périodique :**

La requalification intervient afin de démontrer la conformité aux exigences requises selon la classe spécifiée et comprend la vérification des conditions préalables exigées pour les essais.

La norme NF S90-351 (2013) préconise une périodicité annuelle et après tout changement susceptible d'impacter les conditions environnementales (travaux, changement de filtre terminal...). Les essais effectués en requalification sont effectués « au repos » et sont identiques à ceux réalisés en QO.

**Surveillance des performances** : elle permet de « démontrer un fonctionnement satisfaisant, en dehors des phases de requalification et/ou de qualification. Cela se traduit par un programme de mesurages défini et justifié, qui peut permettre de suivre, le cas échéant, les performances d'une installation en activité et de déterminer le maintien de la conformité sur des points critiques » (NF 90-351 (2013)). Il s'agit d'une surveillance des paramètres physiques de la ZEM qui pour certains sont suivis en continu (différentiel de pression, perte de charge des filtres...). Des contrôles particuliers peuvent également être effectués au cours de certains processus notamment dans l'industrie pharmaceutique (comptage particulier en continu).

**Contrôles d'environnement en routine** : « L'analyse environnementale, qualitative et/ou quantitative, correspond à l'analyse d'échantillons d'origine environnementale. Cette recherche de contaminants chimiques et/ou biologiques a pour objectif de vérifier l'efficacité des processus de maîtrise de la qualité de l'environnement, d'optimiser les procédures, de suivre les points critiques de maîtrise et de dresser un historique des contaminations » (NF S90-351 2013)). Ces contrôles sont effectués au repos après bionettoyage.

Dans ce document, les contrôles de l'air seront limités à l'aérobiocontamination et aux comptages particuliers en gardant à l'esprit que les autres paramètres sont également surveillés et que, en cas de résultats non conformes, tous les paramètres sont pris en compte pour élaborer une conduite à tenir avec les acteurs concernés (ingénieur et services techniques en charge de la maintenance des centrales de traitement d'air et des ZEM, service de soins concernés...).

#### I.1.4. Contrôles de l'aérobiocontamination et comptage particulaire :

**Tableau 03 :** Dans la cadre de ces contrôles, on recherche des micro-organismes et/ou particules inertes en suspension dans l'air. ( Landrin A , 2005).

Aérobiocontamination	Comptage particulaire
<p><b>Recherche de bactéries, levures et champignons filamenteux</b></p> <p><i>Pour</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- S'assurer que les classes microbiologiques sont conformes aux valeurs attendues ;</li> <li>- Suivre des indicateurs de résultats (démarche qualité) ;</li> <li>- Localiser des sources de contamination ;</li> <li>- Effectuer des recherche(s) spécifique(s) ;</li> <li>- Participer à la qualification (opérationnelle ou requalification) les zones à un environnement maîtrisé (ZEM) ;</li> <li>- Permettre, lors des travaux, de s'assurer de l'isolation correcte du chantier et de la remise à niveau quand les travaux sont terminés.</li> </ul>	<p><b>Recherche de particules inertes (viables et non viables)</b></p> <p><i>Pour</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- S'assurer que les classes particulières sont conformes aux valeurs attendues ;</li> <li>- Suivre des indicateurs de résultats (démarche qualité) ;</li> <li>- Participer à la qualification (opérationnelle ou requalification) les zones à environnement maîtrisé (ZEM) ;</li> <li>- Permettre, lors des travaux (ZEM), de s'assurer de l'isolation correcte du chantier et de la remise à niveau quand les travaux sont terminés.</li> </ul>

**I.1.5. Les points à surveiller prioritairement sont préalablement définis par une analyse de risque et reportés sur le plan des locaux (plan d'échantillonnage)**

**Tableau 04 : Dénombrement des micro-organismes cultivables et physiques (SF2H , 2015)**

Aérobiococontamination	Comptage particulaire
<p><b>Objectif</b> : Dénombrement des micro-organismes cultivables à l'aide d'un aérobiocollecteur en cours de validité</p> <p><b>Méthode</b> : L'air étant un milieu fluctuant et hétérogène, un prélèvement unique est insuffisant, c'est pourquoi, en routine, les prélèvements sont adaptés en fonction du contexte et des résultats obtenus en concertation avec l'EOH/CLIN. Ils sont associés à des prélèvements de surface dans le cadre d'une recherche de flore fongique.</p> <p><b>Pour</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Avoir une image de la contamination microbiologique (particules viables et cultivables) à un instant « T »,</li> <li>- Mettre en évidence d'éventuelles dérives : dans ce cas, il est impératif de réaliser les prélèvements en nombre suffisant et toujours dans les mêmes conditions car la numération n'est en aucun cas le nombre exact de micro-organismes présents,</li> </ul>	<p><b>Objectif</b> : Dénombrement des particules à l'aide de compteurs de particules physiques en cours de validité.</p> <p><b>Méthode</b> : L'analyse de la contamination particulaire de l'air peut se faire de 2 manières :</p> <p><b>1. La classe d'empoussièrement</b> (statique)<sup>1</sup></p> <p>La propreté particulaire doit être définie pour un ou plusieurs des trois états d'occupation définis par la norme NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016) : à réception ou après construction, au repos et en activité :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- s'il s'agit d'une qualification : le respect de la norme est indispensable et le nombre de points à prélever est défini en fonction de la surface de la zone (NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016))</li> <li>- s'il s'agit d'une surveillance en routine : l'analyse de risque doit prendre en compte la source d'émission des particules : <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <math>\geq 0,5 \mu\text{m}</math> ou inférieures (représentatives de la qualité de l'air délivré par système de traitement d'air)</li> </ul> </li> </ul>

D'après la norme ISO/DIS14644-1 (2014) la classification d'une salle ou d'une zone propre est définie comme le niveau de propreté particulaire de l'air applicable à cette salle. Ce niveau est spécifié en termes de classes ISO, pour lesquelles sont définies des concentrations maximales admissibles pour chaque taille de particules.

<ul style="list-style-type: none"> <li>- Compléter la recherche de flore fongique (<i>Aspergillus</i>....) dans l'air par des contrôles de surfaces car le passage du « nuage » aspergillaire est bref et les prélèvements de surface permettent d'améliorer la recherche (vision dans le temps de la sédimentation des spores, sous réserve que les surfaces n'aient pas un bionettoyage régulier).</li> <li>- En qualification opérationnelle la NF S90351 précise que pour la « classification microbiologique de l'air : un plan d'échantillonnage est défini pour être joint à l'appel d'offres en se référant à la norme NF EN ISO 14698 parties 1 et 2. L'utilisateur doit faire référence aux textes réglementaires auxquels il est soumis (BPPH, BPP) ».</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <math>\geq 1^2</math> et <math>5 \mu\text{m}^3</math> (représentatives des procédures de nettoyage/et de l'émission par les personnes).</li> <li>▪ et utiliser des compteurs de performance identique (débit,...) en respectant la même méthodologie.</li> </ul> <p><b>Pour</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disposer d'éléments pour qualifier ou requalifier une salle (démontrer la conformité aux exigences requises suivant la classe spécifiée),</li> <li>- Surveiller la qualité de l'air par rapport aux critères attendus et détecter d'éventuelles dérives (en dehors des phases de qualification).</li> </ul> <p><b>2. La cinétique d'élimination des particules (dynamique)</b></p> <p>La cinétique d'élimination des particules n'est pas une analyse réalisée en routine. Elle est demandée lors des qualifications de zone ou quand se pose un problème évoquant un dysfonctionnement de la ventilation (classe d'empoussièrement non conforme, classe de biocontamination non conforme et non expliquée, lors d'une épidémie...) ;</p> <p>Deux approches sont possibles pour déterminer la cinétique d'élimination des particules :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- dans une salle en activité, en fin de programme : mesurer la contamination particulaire lors de la</li> </ul>
--	---

Les tailles  $\geq$  à 0,5, 1 et  $5 \mu\text{m}$  sont demandées par les bonnes pratiques de stérilisation . Pour la classe ISO 5 : les limites de l'échantillonnage et de l'exploitation statistique des résultats rendent inappropriés la mesure des particules de taille  $5 \mu\text{m}$  du fait de leur faible quantité dans cette classe de risque. 15 La cinétique d'élimination des particules permet d'apprécier les performances de la centrale de traitement d'air et l'efficacité dynamique de cette installation. Elle est définie par le temps nécessaire pour réduire de 90 % le niveau de contamination particulaire d'une salle venant d'être utilisée. La limite de classe est fixée par un temps maximal de décontamination.

	<p>sortie des occupants de la salle, puis réaliser des mesures successives jusqu'à ce que la concentration particulaire initiale soit atteinte,</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- dans une salle hors activité : provoquer un « empoussièrement » artificiel quantifié et standardisé puis effectuer des mesures successives jusqu'à ce que la concentration particulaire initiale soit atteinte.</li> </ul> <p><i>Pour</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Connaître le temps minimal pour qu'une salle (zone) retrouve son état initial après l'arrêt de l'activité (temps de repos), - Evaluer la performance du système de traitement d'air.</li> </ul>
--	---

## II.Stratégie pour les contrôles microbiologiques de l'eau :

Les contrôles microbiologiques de l'eau ne sont réglementés que pour les paramètres de potabilité et pour le paramètre légionnelle.

On recherche :

Des micro-organismes (bactéries) tels que ceux prévus par les textes réglementaires et/ou les recommandations,

Des micro-organismes ciblés (bactéries, champignons, parasites, virus) dans le cadre d'une investigation (comme une épidémie suspectée être d'origine hydrique...).

Pour Evaluer la conformité d'une eau à une spécification réglementaire de qualité ,Disposer d'indicateurs de résultats contribuant à assurer la sécurité de l'usage de l'eau : caractérisation de toute contamination, son niveau, ses variations aléatoires, l'existence de tendance ou de cycles..., détection d'une biodégradation de la qualité de l'eau dans le réseau, prévention de problèmes sanitaires liés à l'eau. (CTINILS, Ministère de la santé , 2002)

Dans l'établissement de santé, les prélèvements d'eau sont effectués sur les points utilisés à des fins de consommation humaine, sanitaires, de soins, de traitement des dispositifs médicaux (DM) .

Il convient de disposer des plans des réseaux d'eau chaude et froide et de l'aide de l'ingénieur et/ou de personnels techniques pour élaborer judicieusement la cartographie des risques et le plan d'échantillonnage.

Les points d'échantillonnage doivent être choisis en :

- Définissant des points critiques de l'établissement afin de surveiller les évolutions de la qualité dans le réseau ;
- Prenant en compte, dans le programme de surveillance, les évolutions microbiologiques en fonction des variations possibles de la température de l'eau froide ou chaude ;
- Prenant en compte les points « à risques » soit de par leur localisation (zone stagnante, bras morts), soit de par l'usage qui en est fait (douche, aérosol...) ou des personnes exposées.

C'est pour cela que le plan d'échantillonnage doit intégrer des points critiques (a priori ceux où le risque de contamination est majoré) et des points alimentant des patients fragiles... Situés dans un environnement propre et facilement accessible, ils représentent :

des points techniques : aval du compteur, vannes de départ et retour de boucle, vanne de pied de colonnes, ballon d'eau chaude, points sur la chaîne de production d'eau de dialyse, d'un procédé de traitement d'eau (adoucisseur, filtre, osmose...)... , des points d'usage : robinet, douche.... avec comme objectifs de contrôler :

Les conditions de maîtrise du réseau interne (eau qui parvient au point d'usage), l'exposition (eau telle qu'elle est utilisée), l'efficacité d'un traitement.

Pour obtenir une image la plus fiable de la qualité de l'eau utilisée car les micro-organismes ne forment pas une solution parfaite dans l'eau mais une suspension ayant son propre degré d'hétérogénéité.

Disposer de points représentatifs : les micro-organismes sont fixés majoritairement sous forme de micro-colonies ou de biofilms à la surface interne des canalisations. Le relargage de ce dernier, fonction des forces de cisaillement (ouvertures des robinets, purges, « coup de bélier »...) exercées, influe sur la concentration des micro-organismes retrouvés dans l'échantillon. **(CTINILS, Ministère de la santé , 2002).**

## **II.1. Les prélèvements sont réalisés hors cycle de désinfection des réseaux.**

**Qualité de l'eau dans les conditions d'utilisation** : prélèvement sans désinfection ni purge (premier jet)

Remarque : pour l'eau à usage de soins standard, on utilise le plus souvent de l'eau mitigée (eau froide + eau chaude) et le contrôle portera sur cette eau ;

**Qualité de l'eau dans le réseau interne de l'établissement (eau qui parvient au point d'usage)** ; prélèvement après démontage des accessoires (aérateur, pommeau de douche...), désinfection et purge : de 30 secondes minimum pour les analyses type potabilité/soins standards à 2 à 3 minutes pour la recherche de légionnelles (eau chaude sanitaire, tour aéroréfrigérantes).

Pour connaître les conditions d'exposition pour les utilisateurs des points d'eau ,  
Apprécier les conditions de maîtrise du réseau

Mettre en place la CAT la plus adaptée et non disproportionnée par rapport à la contamination (coût élevé et pouvant dégrader le réseau).

**Rappel** : Les critères de potabilité sont définis par les articles R.1321-1 à R.1321-5, du code de la santé publique (Décret 2001-1220 du 20 décembre 2001), relatifs aux eaux destinées à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles. L'innocuité de l'eau d'entrée doit être garantie vis-à-vis de la population de l'établissement y compris les paramètres microbiologiques (flore aérobie revivifiable). En pratique, le guide de l'eau 2005 <sup>(14)</sup> propose : « Afin de minimiser les frais analytiques, un dialogue est indispensable avec les autorités chargées de la surveillance analytique des eaux potables (ARS) et le producteur d'eau local. Il est conseillé que le point d'alimentation de l'établissement de santé figure comme point de référence entrant dans le programme analytique de surveillance du réseau public de la commune concernée. Le directeur de l'établissement de santé, qui est responsable de la qualité de l'eau aux points d'usage, peut disposer ainsi, en s'adressant (**Ministère de la santé, 2005**).

### **II.1.1. Stratégie pour les contrôles microbiologiques des surfaces :**

Il n'y a pas de textes réglementaires spécifiques pour la surveillance microbiologique des surfaces. Les normes (NF S90-351 (2013), NF EN ISO 14698-1 (2004)) ou les recommandations de sociétés savantes <sup>(1)(6)(11)</sup> traitant de l'environnement abordent plus ou moins ce sujet et peuvent servir de base de travail pour les établissements de santé.

On recherche des micro-organismes (bactéries, levures, champignons filamenteux) présents sur une surface :

- Pour contrôler des points critiques identifiés par une analyse de risque intégrée dans une démarche qualité ou dans un programme d'assurance qualité (bloc opératoire, stérilisation, pharmacie à usage interne, cuisine...) (**Ougier-Diebolt M , 2013**).
- Mettre en œuvre des recommandations de bonnes pratiques (ex : stérilisation...) ;
- Contribuer à une meilleure connaissance de la contamination aérienne (sédimentation des particules de l'air) en particulier lors de suivi de travaux dans les secteurs à empoussièrement maîtrisé ou secteurs adjacents ;
- Aider à la validation des procédures de bionettoyage des surfaces lors des changements de produit ou de méthode ;
- Rechercher une origine environnementale dans le cadre d'une enquête épidémiologique qui le justifie ;
- Visualiser la qualité microbiologique de l'environnement dans un but pédagogique.

Remarque : En aucun cas, ces prélèvements d'environnement ne doivent être systématiques en dehors du cadre très spécifique d'une démarche qualité (exemples : bloc opératoire, stérilisation ou HACCP en cuisine...) ou d'une investigation pour laquelle le rôle de l'environnement est suspecté. (**Landers TF , et al , 2010**).

**II.1.2. La ou les méthode(s) est (sont) choisie(s) en fonction des objectifs mais la même méthodologie est recommandée pour une meilleure reproductibilité.**

**Tableau 05 : Les deux principales techniques utilisées sont (surfaces): ( Meunier O, et al ,2005)**

Méthode par empreinte gélosée	Méthode par écouvillonnage
<p><b>Objectif</b> : Détection de micro-organismes viables et aérobies sur des surfaces planes, pleines, lisses et sèches, plutôt dans le cadre d'une démarche qualité.</p> <p><b>Méthode</b> : Récupérer les micro-organismes « détachables » et cultivables en appliquant directement un milieu gélosé sur la surface à prélever de façon standardisée (temps de contact et pression exercée sur la boîte).</p> <p><b>Pour</b>            Détecter la présence de micro-organismes cultivables <b>aérobies</b>,            Contribuer à la connaissance de l'écosystème d'une surface donnée (aspect qualitatif),            Quantifier le nombre de micro-organismes cultivables et « détachables » de la surface (rendement) par des méthodes testées, validées et reproductibles</p>	<p><b>Objectif</b> : Détection de micro-organismes viables (aérobies et/ou anaérobies) sur des surfaces irrégulières non planes et/ou des zones difficiles d'accès et/ou pour des recherches ciblées (conditions de culture particulières, épidémie...)</p> <p><b>Méthode</b> : Récupérer les micro-organismes « détachables » et cultivables en écouvillonnant la surface à prélever.</p> <p>Remarque : en dehors des écouvillons, il existe d'autres supports de prélèvements (éponges, carrés d'essuyage...) qui permettent d'échantillonner de grandes surfaces.</p> <p><b>Pour</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Prélever les zones irrégulières ou difficiles d'accès,</li> <li>- Apprécier de manière qualitative la flore microbienne,</li> <li>- Apprécier grossièrement le nombre de micro-organismes présents (aspect semi quantitatif),</li> </ul> <p>Adapter les conditions et milieux de culture aux microorganismes recherchés (par exemple <i>Clostridium difficile</i>...).</p>

*Partie 2:*  
*Etude expérimentale*



*Chapitre III*  
*Matériel et méthodes*



**I. Matériel :**

L'objectif de notre travail est de vérifier le niveau d'hygiène et le niveau de respect et d'application des conditions d'asepsie dans les laboratoires où se déroulent les expérimentations des travaux de fin de cycle des différentes spécialités des sciences biologiques à l'université de Larbi ben M'hidi d'Oum el Bouaghi, ce qui nous permettra d'identifier les microorganismes préalablement présents dans les laboratoires ainsi que ceux résultants des manipulations et qui peuvent être en cause de la contamination et l'échec du travail des étudiants, voire même la propagation de plusieurs maladies.

Le matériel et les réactifs utilisés dans la partie expérimentale sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 06 :** Matériel utilisé dans notre travail.

Appareillage	les milieu de culture	Les réactifs et les colorons utilisés	Autre materiel
Autoclave. Etuve. four pasteur Réfrigérateur.	Gélose nutritive. Milieu PCA Milieu TGEA Milieu Sabouraud Milieu Hektoen Milieu Chapman Milieu Gélose SS Milieu Mac Conkey Bouillon BCPL Bouillon Schubert Bouillon Roth Bouillon Litsky Eva	L'alcool a 95° Fuchsine. Huile de cèdre. Lugol. Réactifs de Kovacs. Rouge de méthylène Violet de Gentiane. Réactif de TDA. Rouge de méthylène Violet de Gentiane. Voges-Proskauer (VPI, VPII)  Disque d'oxydase Peroxyde d'hydrogène	Etiquettes. Anse de platine. Bec bunsen. Boîtes de pétri stériles Ecouillons. Micro pipettes. Seringues Tubes à hémolyse Système API20E. Système API20NE  <b>Verreries :</b> Lames et lamelles. Pipettes Pasteur. Tubes à essai stériles

**I.1. Échantillonnage et méthode de prélèvement :**

De nombreuses méthodes de mesures de la contamination des surfaces sont aujourd'hui Proposées. Parmi ces dernières, nous pouvant citer la technique de chiffonnage, la technique de recouvrement des surfaces par gélose, la technique d'écouvillonnage, la technique de scotch test...etc. Dans notre étude, nous avons choisi la méthode d'écouvillonnage car elle est simple, très pratique et s'applique à tous les types de surfaces (planes et /ou non planes). Cette technique nous permet de prélever les parties les plus difficiles.

**Tableau 07 : Présentation des postes du prélèvement.**

<b>Prélèvement</b>	<b>Le moment de prélèvement</b>	<b>Numéro de prélèvement</b>	<b>mode de prélèvement</b>
<b>Laboratoires 1 microbiologie</b>	Avant le travail	P 01	Écouvillonnage sur Paillasse
	Avant le travail	P 02	Écouvillonnage sur Paillasse
	Avant le travail	P 03	Écouvillonnage sur Paillasse
	Fin le travail	P 04	Écouvillonnage sur Paillasse
	Fin de travail	P 05	Écouvillonnage sur Paillasse
	Fin de travail	P 06	Écouvillonnage sur Paillasse
<b>Laboratoires 2 microbiologie</b>	Avant le travail	P 07	Écouvillonnage sur Paillasse
	Avant le travail	P 08	Écouvillonnage sur Paillasse
	Fin de travail	P 09	Écouvillonnage sur Paillasse
	Fin de travail	P 10	Écouvillonnage sur Paillasse
<b>Laboratoires BTV</b> <b>Laboratoires biochimie</b>	Fin de travail	P 11	Écouvillonnage sur Paillasse
	Fin de travail	P 12	Écouvillonnage sur Paillasse

<b>L'eau distillée Et de robinets du laboratoire 1</b>	Pendant le travail	P 13	Flacon sterile
	Pendant le travail	P 14	Flacon sterile
<b>L'eau distillée Et de robinets du laboratoire 2</b>	Pendant le travail	P 15	Flacon sterile
	Pendant le travail	P 16	Flacon sterile
<b>L'eau distillée Et de robinets du laboratoire BTV</b>	Pendant le travail	P 17	Flacon sterile
	Pendant le travail	P 18	Flacon sterile

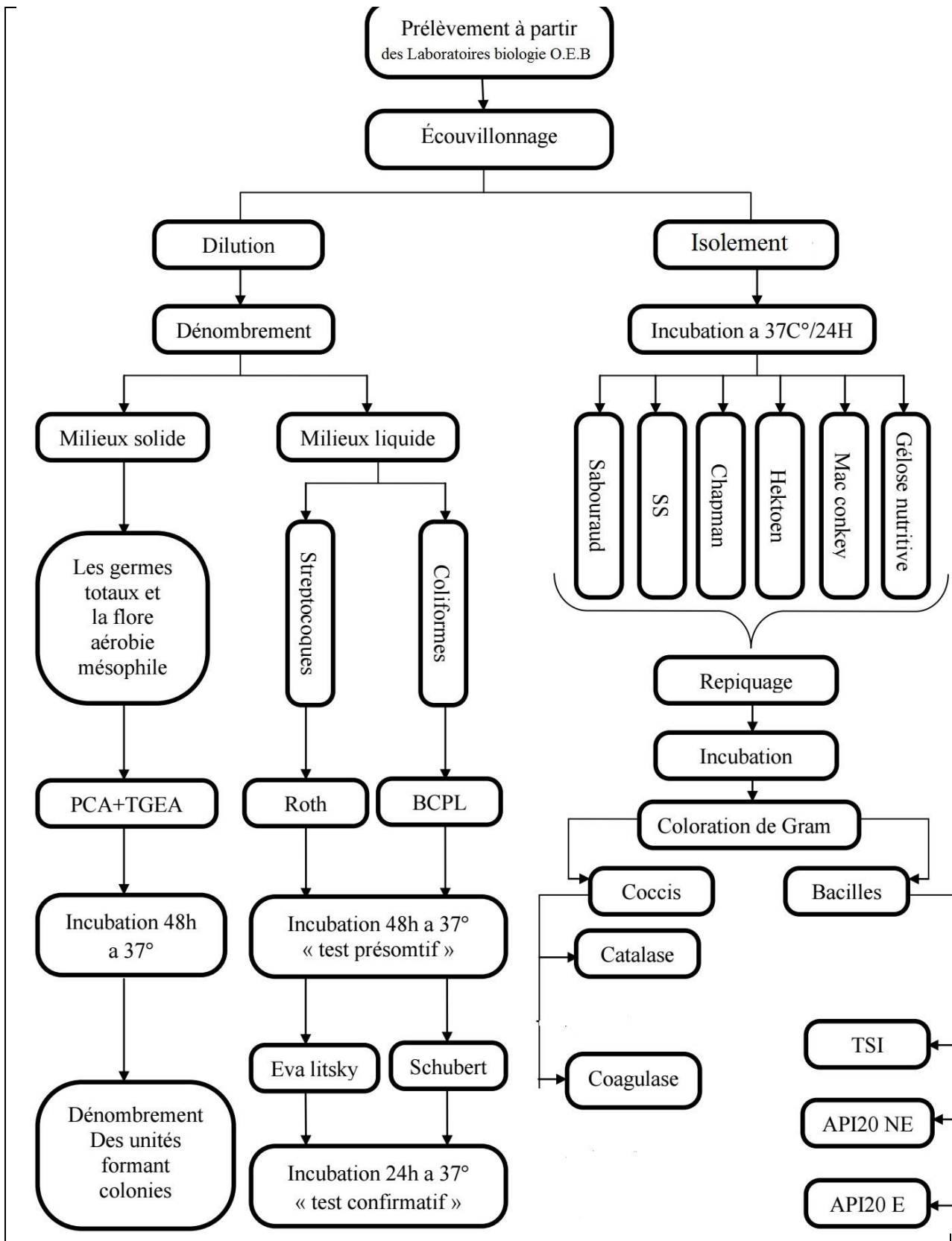


Fig 15 : Schéma représentatif du protocole du travail

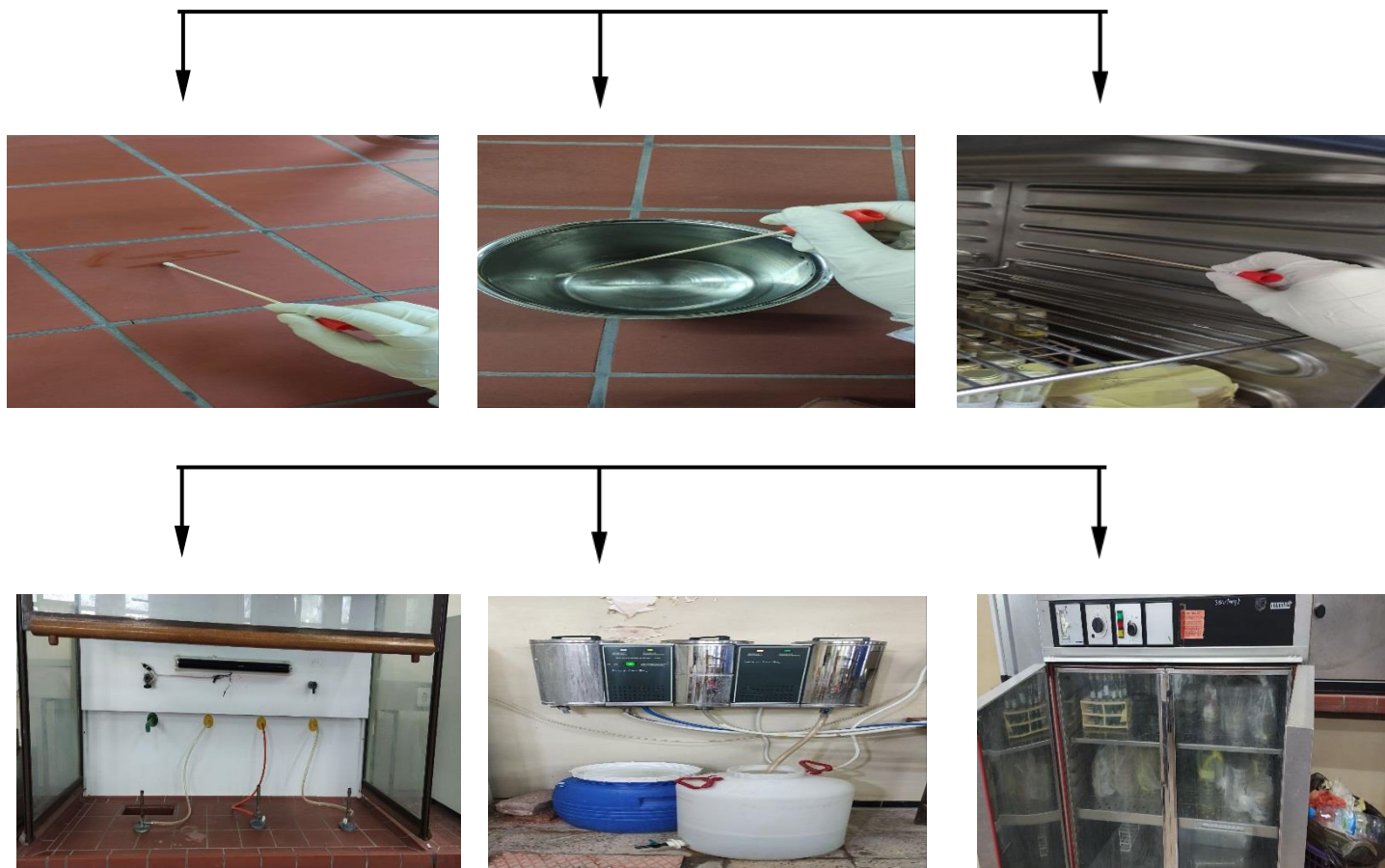


Fig 16 : Les points analysés dans notre laboratoire (photos personnelles)

I.2. Technique de Prélèvement :

Tableau 08 : Technique de prélèvement de l'aire

Le point de prélèvement	Technique
<p><b>Prélèvement de l'air</b></p>	<p><b>Technique des écouvillons :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Prendre un écouvillon stérile et le faire passer sur la surface de la paillasse</li> <li>- Faire l'ensemencement sur boîte de Pétri contenant du Plate Count Agar (PCA).</li> </ul> <p><b>Technique de sédimentation :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Prendre boîtes de Pétri, déposez 3 d'entre elles sur une paillasse du laboratoire et les ouvrir pendant 30, 15 et 5 min chacune loin du bec Bunsen. La quatrième boîte est ouverte devant le bec Bunsen pendant 30 min.</li> </ul>

<p><b>Prélèvement des surfaces (paillasse):</b></p>	<p><b>Écouvillonnage :</b> Un écouvillon de coton hydrophile est immergé dans une solution stérile de Ringer Le prélèvement est effectué par frottement sur la surface du paillasse et de poignée de robine et l'étuve ; l'écouvillon est alors immergé dans 10 ml de Ringer</p>
<p><b>Prélèvement d'eau :</b></p>	<p><b>Robinet :</b> Le prélèvement de l'eau du robinet implique de nettoyer et de stériliser le robinet, de laisser couler l'eau pendant quelques minutes avant de prélever l'échantillon, de stériliser le contenant d'échantillon et de stocker l'échantillon dans un endroit frais et sombre jusqu'à ce qu'il soit analysé.</p> <p><b>Distillée :</b> Le prélèvement de l'eau distillée implique de nettoyer et de stériliser le contenant d'échantillon, de prélever l'eau distillée directement à partir du système de distillation et de stocker l'échantillon dans un endroit frais et sombre jusqu'à ce qu'il soit analysé.</p>

I.3. Isolement :

Tableau 09 : Microorganismes recherchés

Milieu	Microorganismes	Techniques
<b>Gélose Nutritive</b>	<i>Salmonella, Pseudomonas Escherichiacoli, Yersinia Shigella...etc</i>	Un isolement consiste à disperser des micro-organismes à la surface d'un milieu gélosé en boîte de Pétri : cela permet d'obtenir des colonies bien distinctes. La méthode la plus utilisée est la méthode des quadrants : à partir d'un point de dépôt, les bactéries sont étalées sur les 4 quadrants successifs de la gélose .
<b>Sabouraud</b>	levures et des moisissures saprophytes ou pathogènes et champignon	
<b>Hektøn</b>	Entérobactéries pathogènes (ex, <i>Serratia, Klebsiella, etc...</i> )	
<b>Chapman</b>	staphylocoques. (ex, <i>staphylocoques aureus etc,...</i> )	
<b>Gélose SS</b>	<i>Salmonella, Shigella, etc,...</i>	
<b>Mac Conkey</b>	<i>Salmonella, Proteus, Yersinia, Pseudomonas</i>	

		<p>A partir des milieux d'enrichissement nous avonsensemencé plusieurs milieux de culture gélosés afin d'isoler le maximum des bactéries présentes sur les surfaces analysées. L'ensemencement a été effectuée par des stries transversales sur des boites de Pétri contenant les géloses selectives</p>
--	--	--

**I.4. Recherche et dénombrement des coliformes totaux, fécaux en milieu liquide :**

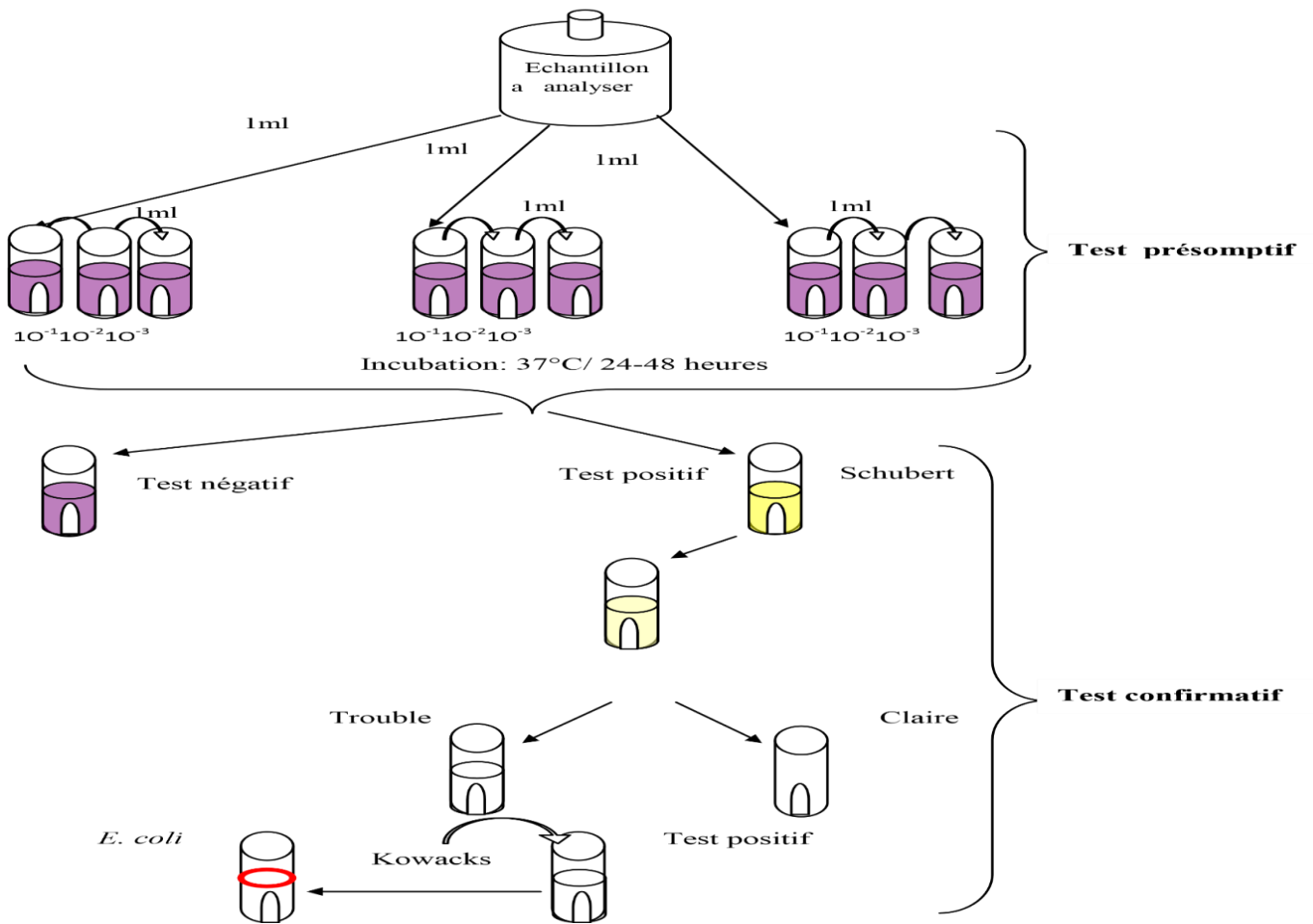
La recherche et le dénombrement des coliformes et l'identification de *E coli* ont été effectués par la méthode de nombre le plus probable (NPP) appelée aussi la colimétrie. Cette technique présente des avantages par rapport à la technique de dénombrement sur plaque :

- Elle permet d'analyser des quantités importantes d'eau.
- Elle est plus favorable à la multiplication des microorganismes fragiles que la culture sur support solide (Rejsek, 2002).

**Tableau 10 : Recherche et dénombrement des coliformes totaux, fécaux en milieu liquide :**

Milieu	Mode opératoire	Lecture
<p><b>BCPL(Bromo-cresol pourpre lactose)</b></p>	<p><b>Test de présomption</b>                      Il effectué en utilisant le bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol simple concentration (BCPL S/C). Tous les tubes sont munis de cloches de Durham pour déceler le dégagement éventuel de gaz dans le milieu. (Mouffok, 2001; Lebres , 2008).                      réaliser trois dilutions décimales successives (<math>10^{-1}</math>, <math>10^{-2}</math>, <math>10^{-3}</math>) avec trois répétitions par dilution. Les dilutions sont toujours effectuées dans des conditions aseptiques.                      Prélever 1ml d'eau à analyser à l'aide d'une pipette pasteur stérile et la porte dans le premier tube de la série contenant 9ml de BCPL, pour obtenir la dilution <math>10^{-1}</math> (Fig19. ).</p>	<p>Sont considérés positifs les tubes présentant à la fois :                      Un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune (ce qui constitue le témoin de la fermentation du lactose présent dans le milieu).                      La production de gaz traduite par le soulèvement de la cloche de Durham introduit dans le milieu (au moins 1/10 de la cloche devra être vide) (Tandia, 2007).                      Ces deux caractères étant témoins de la fermentation du lactose dans</p>

	<p>Nous prélevons 1ml de la dilution <math>10^{-1}</math> précédente et l'ajouter à un tube contenant 9ml de BCPL, pour obtenir la dilution <math>10^{-2}</math>.</p> <p>Transférer 1ml de la dilution <math>10^{-2}</math> dans un tube contenant 9ml de BCPL, pour obtenir la dilution <math>10^{-3}</math>.</p> <p>Refaire la technique pour les 2 autres séries.</p> <p>-L'incubation se fait à <math>37^{\circ}\text{C}</math> pendant 24 à 48 heures (Lebres ,2002; Rouaiguia, 2009).</p>	<p>les conditions opératoires décrites. (Fig19.). Noter le nombre de tubes positifs dans chaque série. et se reporter aux tables NPP pour obtenir le nombre de coliformes totaux présents dans 1ml (Mouffok , 2001).</p>
--	---	--



Incubation :  $44^{\circ}\text{C}$ , pendant 24-48 heures

Fig 19 : Recherche et dénombrement des coliformes totaux, fécaux en milieu liquide. (NPP)

### 1.5. Recherche des staphylocoques :

On entend par staphylocoques à coagulase positive, les bactéries qui se présentent sous forme de cocci à Gram positive, sphériques, isolées ou regroupées formant ainsi des grappes de raisin, ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs, possédant l'enzyme catalase et la coagulase. Ils sont capables de se développer en 24 à 48 heures à  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  sur un milieu sélectif Chapman au mannitol qui contient un inhibiteur : fortes concentrations en chlorure de sodium (75g/l) (Pechère *et al.*, 1982), (Carbonnelle, 1988), (Labres *et al.*, 2008).

Le milieu de Chapman est caractérisé par sa forte concentration en chlorure de sodium ce qui permet un isolement sélectif des staphylocoques. La fermentation du mannitol est indiquée par le virage au jaune de l'indicateur coloré, « le rouge de phénol », autour des colonies (Rodier, 2009).

Après la période d'incubation spécifiée, les Staphylocoques à coagulase positive ou plus particulièrement *Staphylococcus aureus*, apparaissent sous forme de petites colonies lisses légèrement bombées à contours réguliers et pigmentées en jaune (fermentation du mannitol) ou en blanc (Ait K *et al* 2008), (Rodier, 2009).

**Tableau 11 : Les principaux staphylocoques isolés en microbiologie. (Sayad, 2008).**

Staphylocoque	<i>aureus</i>	<i>intermedius</i>	<i>saprophyticus</i>	<i>epidermitis</i>
Catalase	+	+	+	+
Coagulase	+	+	-	-
Mannitol en anaérobie	+	-	-	+

**II. Identification :**

**II.1. Examen macroscopique des caractères cultureux**

L'aspect des colonies dépend du milieu, de la durée et la température d'incubation. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir des colonies bien isolées. La description des colonies doit mentionner plusieurs éléments (Joffin, 2001).

**II.2. Examen microscopique après coloration de Gram**

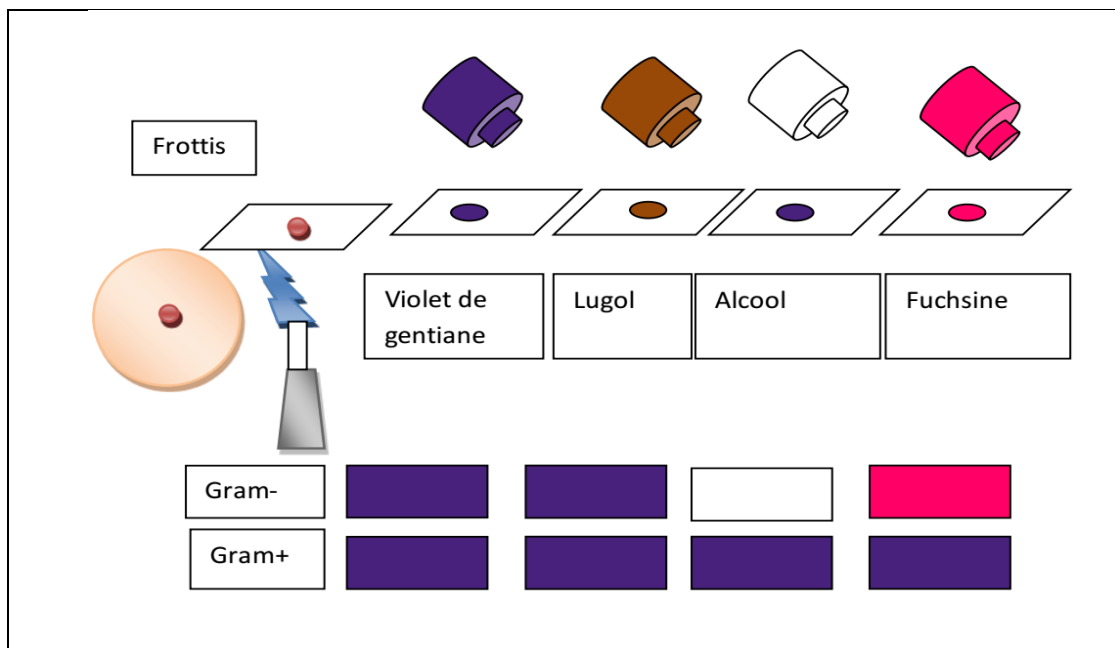


Figure 17 : Protocole utilisé pour la coloration de Gram (Delarras, 2007).

**II.3. Études des caractères biochimiques :**

**II.3.1. Test de catalase :**

C'est une enzyme qui décompose l'eau oxygénée en eau et en oxygène gazeux. La méthode consiste à prélever une colonie du germe à étudier sur l'extrémité d'une pipette pasteur fermée que l'on plonge ensuite dans un millilitre d'eau oxygénée. Le dégagement de bulles gazeuses signe la présence de l'enzyme (Fig18) (Carbonnelle, 1988)



Fig. 18 : Test de catalase (+)

Tableau 12 : Les tests de galerie classique

Test	Technique	lecture
<b>TSI (Triple-Sugar-Iron)</b>	<p>-Le test est effectué en inoculant TSI avec une aiguille d'inoculation en poignant la crosse et en striant l'inclinaison, puis en incubant à 37 ° C pendant 18-24 heures</p> <p>-Lors de l'incubation, la bactérie utilise d'abord du glucose, puis du lactose et du saccharose</p>	<p>-Lactose-saccharose positif : pente virant au jaune</p> <p>-Glucose positif : culot jaune</p> <p>-H2S positive : noircissement du milieu dans la zone joignant la pente et le culot.</p> <p>-Production de gaz : présence de bulles de gaz dans le culot</p>
<b>Nitrat de Simmons</b>	<p>-La pente du milieu estensemencée par strie longitudinale, réalisée à l'anse, à partir d'une suspension de la culture solide en eau distillée stérile.</p> <p>- Mettre à l'étuve 24 heures à 37°C.</p>	<p>-s'il y a une culture avec une alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur au bleu), la bactérie est de Citrate positive</p> <p>-S'il ya pas de culture et la couleur du milieu inchangée, la bactérie est de citrate négatif</p>
<b>Test urée indole</b>  <b>Test urée indole</b>	<p>-Ensemencer un milieu urée – indole avec une suspension bactérienne. Incuber 18 à 24 heures à 37 °C. - Tester l'indole en ajoutant 0,2-0,3 ml de réactif Indole Kovacs.</p>	<p>-Uréase positive : le milieu présente une coloration rouge violacée ou orange foncée.</p> <p>-Uréase négative : le milieu a une teinte jaune</p> <p>-L'apparition d'une couleur rouge distincte dans la couche supérieure est un test positif et l'absence de couleur rouge est un test négatif</p>
<b>catalase</b>	<p>placer quelques gouttes de 10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur une lame et à frotter dans une boucle d'organismes.</p>	<p>-Si la colonie est catalase positive, bulle de gaz produite</p> <p>-Aucune production de bulles n'indique un résultat négatif.</p>
<b>ONPG (ortho- nitrophényl- β-galactopyranoside)</b>	<p>Le test peut être effectué en fabriquant une suspension lourde de bactéries dans une solution saline stérile et en ajoutant des disques ou des comprimés ONPG</p>	<p>- ONPG (+) : milieu de couleur jaune ;</p> <p>- ONPG (-): milieu sans couleur.</p>

	préparés commercialement. La suspension est incubée à 35°C,	
<b>Mannitol mobilité</b>	Ce milieu , qui n'est que faiblement gélosé , est coulé en tubes et ensemencé par piqûre centrale au moyen du fil de platine droit chargé de la semence	-Lorsque l'indicateur coloré passe du rouge au jaune , ce qui correspond à l'acidification du milieu , le mannitol a été utilisé . -Le caractère mobile est défini dans ce milieu par un trouble envahissant toute la largeur de la gélose de part et d'autre de la piqûre centrale ,alors qu'une bactérie immobile ne se développe que le long de la piqûre centrale.
<b>lysine décarboxylase ( LDC ) , l'ornithine décarboxylase ( ODC ) et l'arginine dihydrolase ( ADH )</b>	-Ensemencer les trois tubes avec une suspension bactérienne	Jaune : - violet (peut être léger) : +

**III.La galerie API 20 :**

La galerie API 20 est un système pour l'identification des Entérobactéries et autres bacilles Gram négatif, en utilisant 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données (Fig20.).

**Principe :**

La galerie API 20 E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.



**Fig 20 : La galerie API 20E**

# *Chapitre IV*

## *Résultats et discussions*



I. Résultats d'identification :

Aspect macroscopique des colonies :

a. Résultats des surfaces :

Tableau 13: Résultat de lecture macroscopique paillasse n° 1 :

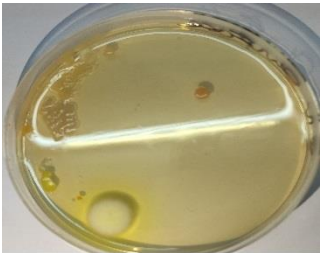

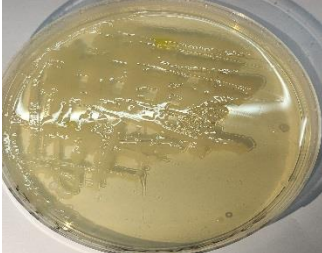
Milieu de culture	Couleur et aspects des colonies	La taille	La forme
Gélose nutritive : 	7 Colonies blanches	Petite	Circulaire plane
	3 Levures jaunes	Petite	Circulaire plane
	1 Colonies de champignons	Grand	Circulaire bombée
Sabouraud : 	4 Colonies blanches	Petite	Circulaire bombée
	2 Colonies orange	Petite	Circulaire plane
	1 Colonies de champignons	Grand	Circulaire bombée
PCA : 	20 Colonies blanches	Petite	Circulaire plane

Tableau 14 : Résultat de lecture macroscopique paillasse n° 2 :

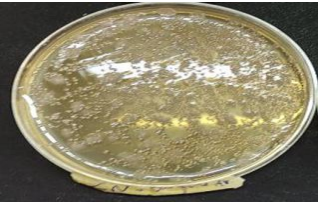


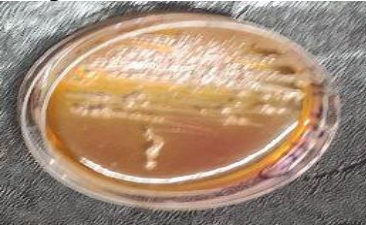

Milieu de culture	Couleur et aspects des colonies	La taille	La forme
Gélose nutritive : 	100 Colonies blanches	Petite	Circulaire plane
Sabouraud : 	Tapis colonies de champignons verts	Moyenne	Circulaire bombée
	3 Colonies de champignons noirs	Grande	Circulaire bombée
Mac Conkey 	Culture négative	Culture négative	Culture négative
Chapman 	40 colonies blanches lisses	Petites	Régulières bombé arrondies
Gélose SS 	33 colonies blanches	moyennes	Régulières bombé arrondies

Tableau 15 : Résultat de lecture macroscopique paillasse n°3 :

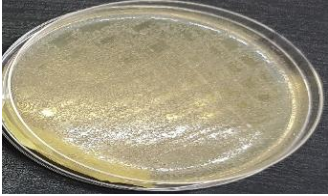



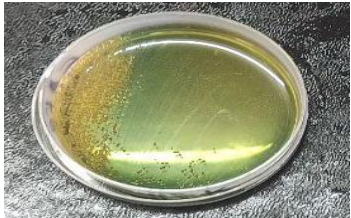
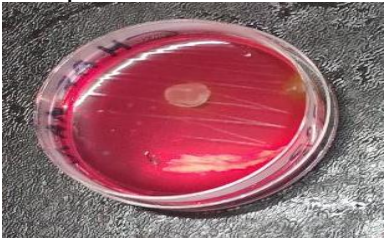
Milieu de culture	Couleur et aspects des colonies	La taille	La forme
Gélose nutritive : 	>300 Colonies blanches	Petite	Circulaire plane
Sabouraud : 	Colonies blanche	Petite	Circulaire plane
	1 Champignons blanc au centre noir	Grande	Circulaire bombée
MacConkey 	45 colonies blanche	Petites	Circulaire bombés arrondies
Gélose SS 	Culture négative	Culture négative	Culture négative
Gélose Hectoén 	70 Colonies jaune	petites	Circulaire bombé arrondies
Chapman 	Colonies jaune avec virage de couleur 1	petites	Régulières bombé arrondies
	1 colonies blanches lisses	moyennes	Régulières bombé arrondies

Tableau 16 : Résultat de lecture macroscopique poignée de robinet :







Milieu de culture	Couleur et aspects des colonies	La taille	La forme
Gélose nutritive : 	20 Colonies blanches	Moyenne	Circulaire plane
Sabouraud : 	100 Colonies blanches	Moyenne	Circulaire plane
MacConkey 	Culture négative	Culture négative	Culture négative
Chapman 	8 colonies blanches lisses	moyennes	Régulières bombé arrondies
Gélose SS 	60 colonies blanches	moyennes	Régulières bombé arrondies
Gélose Hectoén 	Culture négative	Culture négative	Culture négative

Tableau 17 : Résultat de lecture macroscopique étuve :

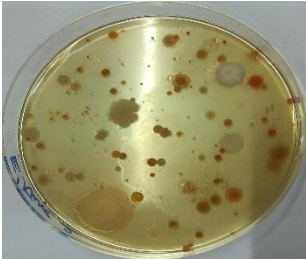
Milieu de culture	Couleur et aspects des colonies	La taille	La forme
Gélose nutritive : 	6 Levures jaunes	Petite moyenne	Circulaire plate
	43 Colonies oranges		
	3 Champignon blanc au centre noir	Grande	Circulaire bombée

Tableau 18 : Résultat de lecture macroscopique tasse :




Milieu de culture	Couleur et aspects des colonies	La taille	La forme
Gélose nutritive : 	32 Colonies blanches	Petite	Circulaire bombée
Sabouraud : 	12 Colonies blanches	Moyenne petite	Circulaire plate
PCA : 	4 Colonies blanches	Grande	Irrégulière plate

Tableau 19 : Résultats de l'air groupe 1 & 2 :

Groupe 1 :

Milieu de culture	Couleur et aspects des colonies	La taille	La forme
Gélose nutritive : 	32 Colonies oranges	Moyenne	Circulaire bombée
	11 Levures jaunes	Petite	Circulaire bombée
	3 Champignons blancs au centre noir	Moyenne	Circulaire bombée
PCA : 	29 Colonies oranges	Grande	Circulaire bombée
	5 Levures jaunes	Moyenne	Circulaire bombée
	16 Champignons blancs au centre noir	Petite et grande	Circulaire bombée

Groupe 2 :



Milieu de culture	Couleur et aspects des colonies	La taille	La forme
Gélose nutritive : 	10 Colonies oranges	Moyenne petite	Circulaire bombée
	8 Levures jaunes	Moyenne petite	Circulaire bombée
PCA : 	13 Colonies blanches	Moyenne petite	Circulaire bombée

Tableau 20 : Résultat de lecture macroscopique laboratoire de biochimie :




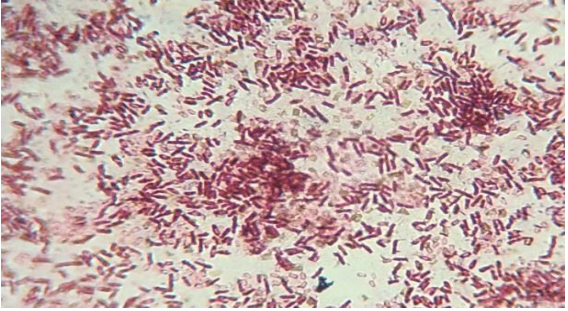
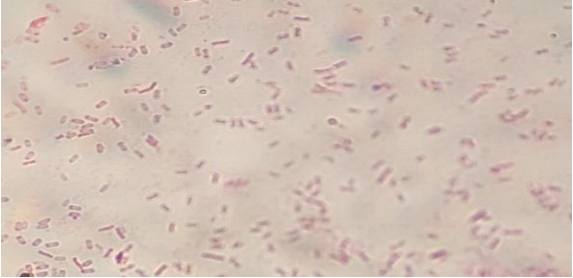
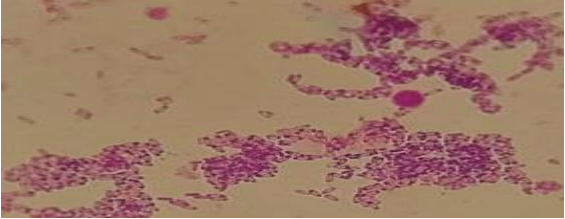
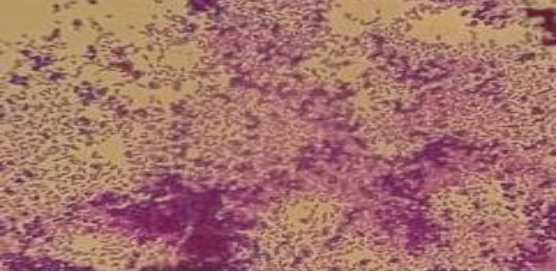
Milieu de culture	Couleur et aspects des colonies	La taille	La forme
Gélose nutritive : 	22 Colonies blanches	Petite	Circulaire bombée
PCA : 	21 Colonies blanches	Moyenne	Irrégulière plate
	12 Levures jaunes	Petite	Circulaire plate



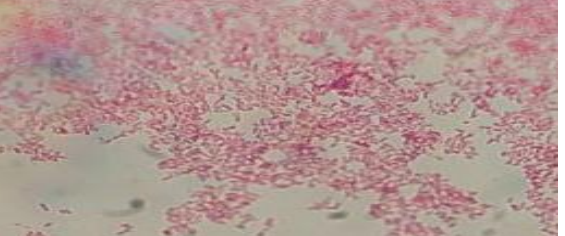
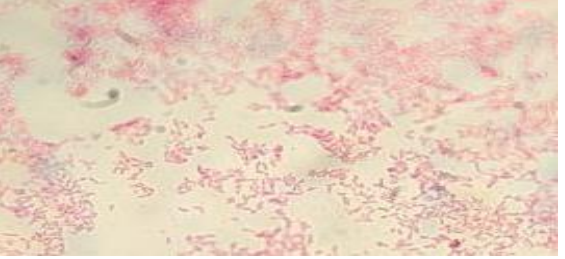
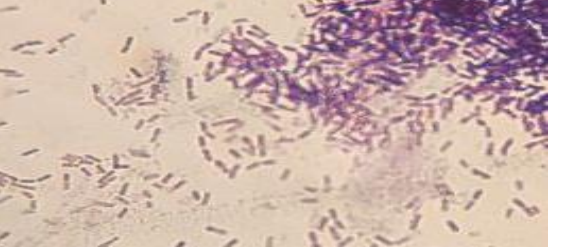
Tableau 21 : Résultat de lecture macroscopique laboratoire de BTV :

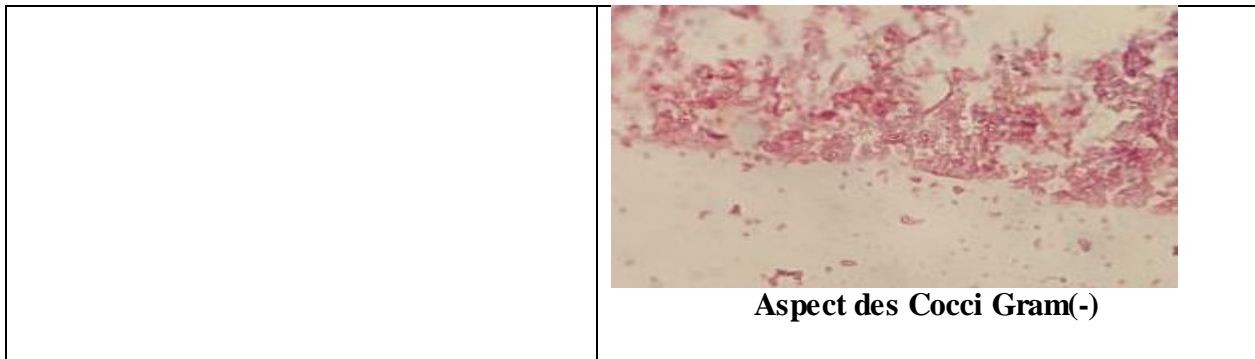
Milieu de culture	Couleur et aspects des colonies	La taille	La forme
Gélose nutritive : 	5 Colonies blanches	Petite	Circulaire plate
	16 Levures jaunes	Moyenne et petite	Circulaire bombée
	2 Champignons blancs	Moyenne	
PCA : 	4 Colonies blanches	Grande	Irrégulière plate

Examen microscopique :

Tableau 22 : Aspect microscopique des cellules bactériennes (objectif X100)

Culture	Observation microscopique des colonies
<p><b>Gélose nutritive</b></p>	<div style="text-align: center;">  <p><b>Aspect des Bacilles Gram(+)</b></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><b>Aspect des Bacilles Gram(-)</b></p> </div>
<p><b>PCA</b></p>	<div style="text-align: center;">  <p><b>Aspect des Coccobacilles Gram(+)</b></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><b>Aspect des Bacilles courte Gram(+)</b></p> </div>

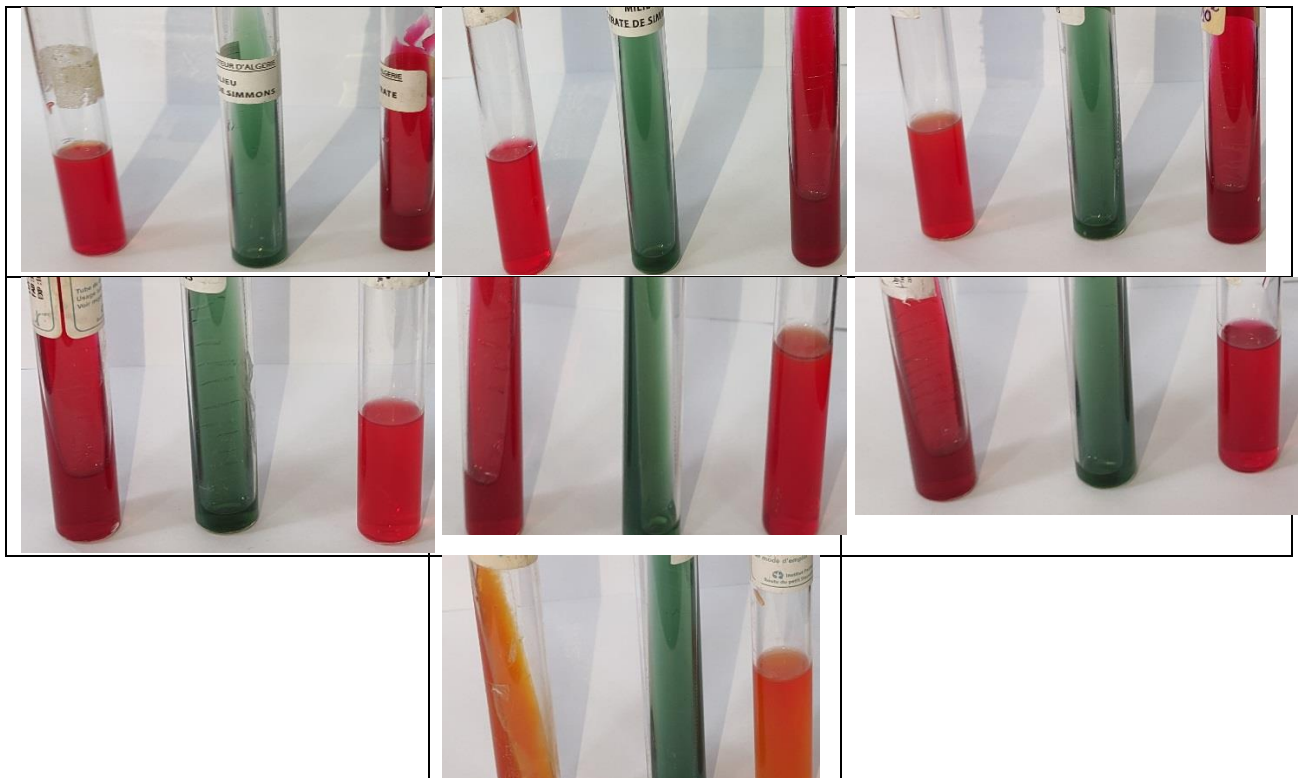
<p><b>Héctoèn</b></p>	 <p><b>Aspect des Diplobacilles Gram(-)</b></p>  <p><b>Aspect des Diplobacilles Gram(-)</b></p>
<p><b>Mac Conkey</b></p>	 <p><b>Aspect des Cocci Gram(-)</b></p>  <p><b>Aspect des Diplocoques Gram(-)</b></p>
<p><b>SS</b></p>	 <p><b>Aspect des Bacilles Gram(+)</b></p>



IV. Résultats du test catalase :



Résultat des tests de la galerie classique :



Du point de vue microscopique, l'examen cytologique nous a révélé que les Bâtonnets Gram (-) sont plus représentés par rapport aux cocci Gram (+). Les résultats de l'état frais et de la coloration de Gram et les tests catalase et oxydase sont résumés dans les tableaux ci-dessous :

**Tableau 23: Résultats des tests de catalase**

Code	Poste	Milieu	Coloration de Gram	Catalase
1	P 01	GN	Bacilles court Gram -	-
2	P 02	PCA	Bacille incurvée Gram+	+
3	P 03	Chapman	Cocci Gram + regroupés en grappe de raisin et en amas	+
4	P 04	Chapman	Cocci Gram + regroupés en grappe de raisin et en amas	+
5	P 05	Chapman	Bacilles Gram -, isolé et en amas	+
6	P 06	Chapman	Bacille Gram+, isolé	-
7	P 07	GN	Cocci Gram + regroupés en grappe de raisin et en amas	+
8	P 08	GN	Coccobacilles Gram -	-
9	P 10	GN	Coccobacilles Gram -	+
10	P 04	MacConkey	Cocci, monocoque Gram+	+
12	P 05	GN	Bacille Gram+, isolé et en amas	+
13	P 07	Chapman	Cocci Gram +	+

**Tableau 24 : Résultats des tests d'identification biochimique**

Poste	Milieu de purification	Espèces identifiées
P5	Hectoen	<i>E-coli</i>
P3	Hectoen	<i>Proteus mirabilis</i>

**V. Résultat de la Galeries API 20E :**

L'étude biochimique nous a permis d'identifier 1 espèce bactérienne appartenant à la famille des Enterobacteriaceae *Klebsiella oxytoca* Les résultats sont représentés dans le tableau :

**Tableau 25 : Résultat de la Galeries API 20E:**

Poste	Milieu de purification	Espèces identifiées
P1	Hectoen	<i>Klebsiella oxytoca</i>



**Figure 26 : Résultats des profils biochimiques des API 20E**

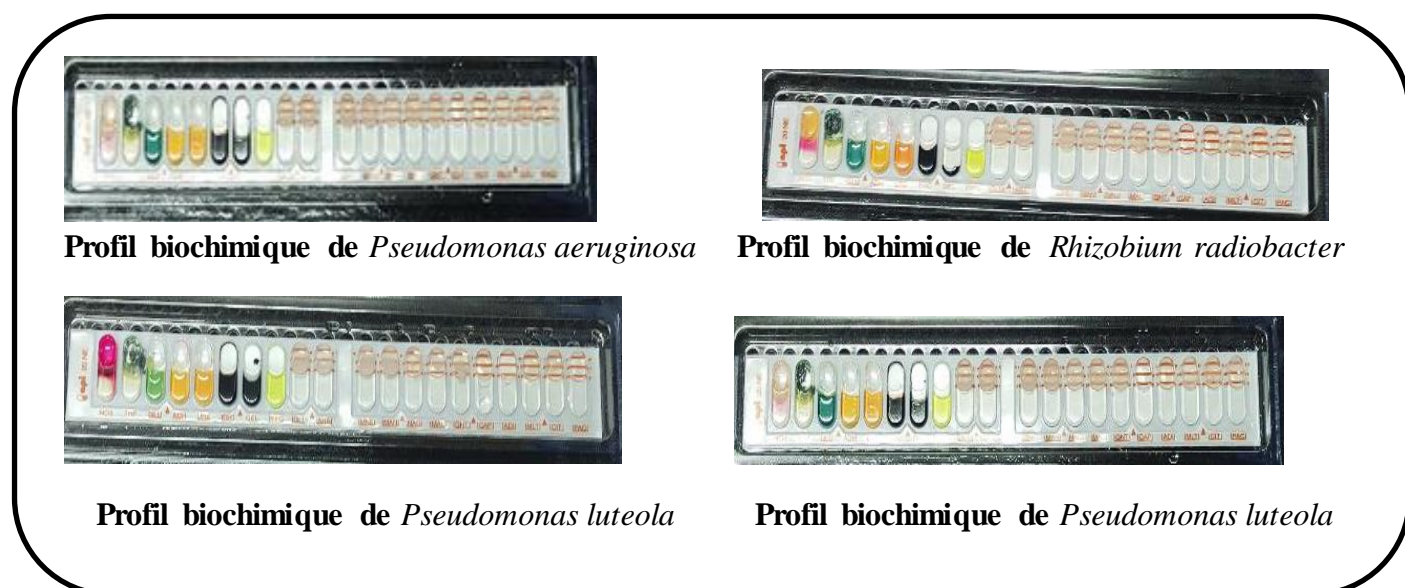
**Résultat de la Galeries API 20NE :**

L'étude biochimique nous a permis d'identifier 4 espèces bactériennes (des bacilles a Gram(+) et des cocci Gram(-) ainsi que des Cocci Gram (+)) .Les résultats sont représentés dans le tableau 18, ainsi que :

- Des coliformes (coliformes totaux).
- Des coliformes (thermo-tolérant).
- Des streptocoques fécaux. Représentés sur les tableaux 19-24 successivement.

**Tableau 26 : Résultat de la Galeries API 20NE :**

Poste	Milieu de purification	Espèces identifiées
P1	Hectoen	<i>Pseudomonas luteola</i>
P3	Mac conkey	<i>Rhizobium radiobacter</i>
P4	SS	<i>Pseudomonas luteola</i>
P5	SS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>



**Figure 28 : Résultats des profils biochimiques des API 20NE**

Les analyses bactériologiques effectuées sur les échantillons prélevés à partir de 12 postes de travail au niveau des laboratoires de biologie de l'université Larbi Ben M'hidi ont permis d'isoler et d'identifier espèces appartenant à 04 familles :

Les Enterobacteriaceae (02 espèces), les Streptococcaceae (02 espèces) *Pseudomonadaceae* (02 espèces), les Staphylococcaceae.(2 espèces)

Certaines espèces bactériennes identifiées ont un pouvoir pathogène spécifique tel. *Klebsiella oxytoca*

D'une manière générale, les champignons et les levures dominent les bilans des pailles et l'aire et les coliformes dominent dans l'eau distillée. Ils sont observés sur la plupart des postes de travail. A noter aussi, d'après nos analyses sur les pailles du laboratoire, nous pouvons constater que les champignons sont très abondants. Les espèces les plus représentées sont (*Aspergillus niger* et *Aspergillus fumigatus*)

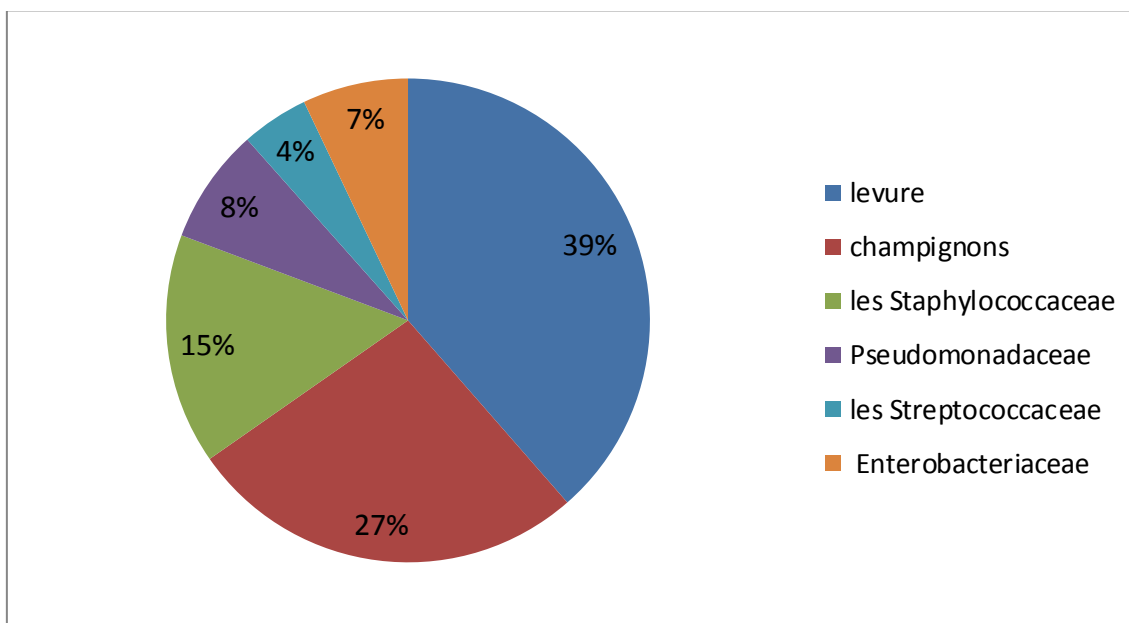


Figure 26 : Répartition des germes contaminants identifiés

**VI. Résultats de la recherche et du dénombrement des micro-organismes :**

Nous avons effectué pendant notre travail un dénombrement et une recherche systématique des germes indicateurs de contamination qui sont :

**a. Les coliformes totaux**

**Tableau 27 :** L'eau distillée de laboratoire microbiologie

	Prélèvement 1	Prélèvement 2	Prélèvement 3
Dénombrement	5 Coliformes par 100 ml	11 Coliformes par 100 ml	0.6 Coliformes par 100 ml
BCPL	+	+	+
Schubert	-	-	-

**Tableau 28 :** L'eau de robinet de laboratoire microbiologie

	Prélèvement 1	Prélèvement 2	Prélèvement 3
Dénombrement	2 Coliformes par 100 ml	0 Coliformes par 100 ml	0 Coliformes par 100 ml
BCPL	+	+	+
Schubert	-	-	-

**Tableau 29 : L'eau distillée de laboratoire BTV**

	Prélèvement 1	Prélèvement 2	Prélèvement 3
Dénombrement	5 Coliformes par 100 ml	2 Coliformes par 100 ml	4 Coliformes par 100ml
BCPL	+	+	+
Schubert	-	-	-

**b. Les streptocoques fécaux :**

Les streptocoques fécaux sont des excellents indicateurs de contaminations .Les résultats de dénombrement de ces derniers sont présentés dans les tableaux suivants :

**Tableau 30 : L'eau distillée de laboratoire de microbiologie : 3 germes/100ml**

	Prélèvement 1	Prélèvement 2	Prélèvement 3
ROTH	-	+	-
EVA	/	+	/

**Tableau 31 : L'eau de robinet de laboratoire microbiologie**

	Prélèvement 1	Prélèvement 2	Prélèvement 3
ROTH	-	-	-
EVA	/	/	/

**Tableau 32 : L'eau distillée de laboratoire BTV**

	Prélèvement 1	Prélèvement 2	Prélèvement 3
ROTH	+	-	-
EVA	+	/	/



Fig 27 : Résultats de dénombrement des coliformes

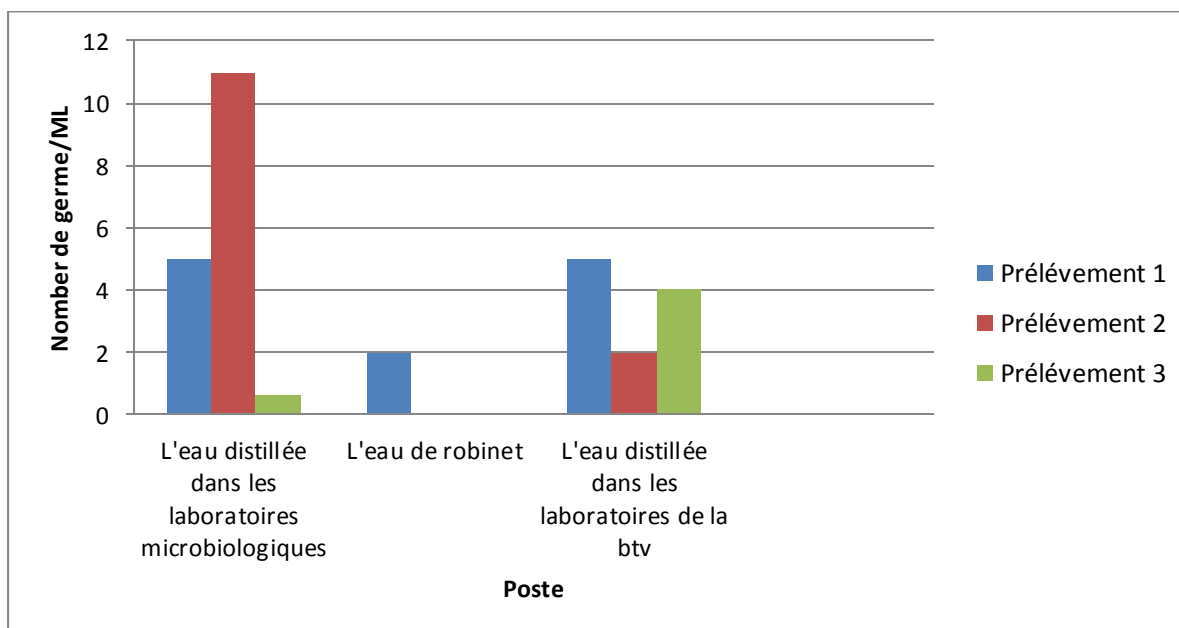


Fig 28: Nombre des coliformes en fonction des postes des prélèvements

La figure ci-dessus exprime un taux de contamination élevé des eaux distillées dans les laboratoires de biologie par des coliformes notamment celui de la microbiologie où l'effectif des manipulateurs est élevés et le conteneur est souvent ouvert exposé aux aérosols.

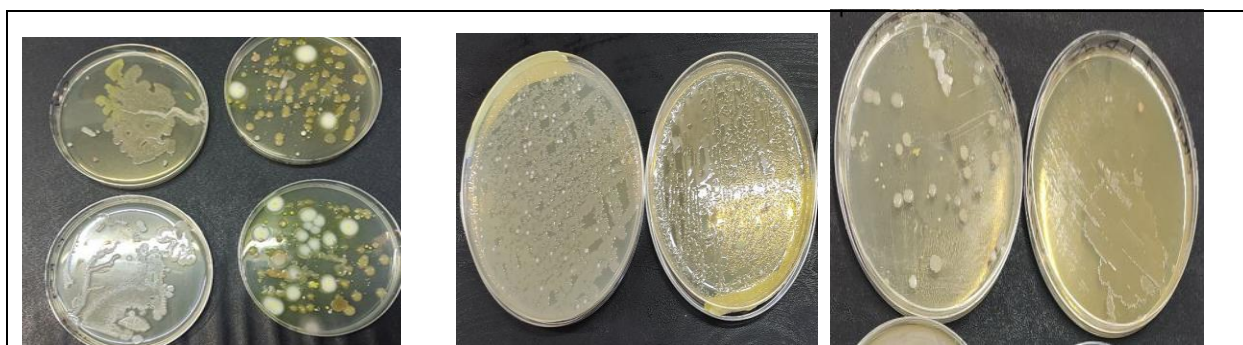
**c. Dénombrement sur milieu solide :**

La concentration de germes totaux fluctue considérablement au niveau des trois postes de prélèvement. Ces variations sont dues au fait que les sites sont exposés à diverses sources de

contamination qui diffèrent d'un endroit à un autre, Les résultats sont représentées dans le tableau 31

**Tableau 33 : Dénombrement sur milieu (TGEA) et (PCA)**

<b>Poste</b>	<b>TGEA (ET)</b>	<b>TGEA (IN)</b>	<b>PCA (ET)</b>	<b>PCA (IN)</b>
<b>Poste 4</b>	<b>7 U.F.C</b>	contamination	<b>2 U.F.C</b>	Contamination
<b>Poste 7</b>	<b>10 U.F.C</b>	<b>36 U.F.C</b>	<b>27 U.F.C</b>	<b>136 U.F.C</b>
<b>Poste 10</b>	<b>129 U.F.C</b>	<b>87 U.F.C</b>	<b>&gt;300 U.F.C</b>	<b>33 U.F.C</b>



**Figure 29 : Résultats de Dénombrement sur milieu (TGEA) et (PCA)**

## Discussion

Au cours de notre travail, nous avons constaté que la structure actuelle des laboratoires expose le personnel et les étudiants à des risques du fait de l'insuffisance des espaces par rapport au nombre d'occupants. Cette exigüité des locaux semble être due également à la disposition inadéquate du matériel. Dans ce contexte, le manipulateur est exposé aux risques biologiques au niveau de tous les postes de travail.

En raison des contraintes liées aux ressources limitées disponibles dans le magasin et le laboratoire de l'université Labi Ben Mhidi, nous avons dû nous restreindre à l'analyse de résultats très limités. Cela nous a permis de détecter la présence de quelques espèces bactériennes appartenant aux familles des Entérobactéries, des staphylocoques, des microcoques, des champignons et des levures, ainsi que d'identifier certaines espèces de levures et de champignons parasites qui pourraient avoir une importance médicale, comme ils pourraient être potentiellement pathogènes et compétitives ayant ainsi un effet contaminant.

Les Entérobactéries représentant 7% du bilan, est une famille très hétérogène pour ce qui est de leur pathogénie et de leur écologie. Les espèces qui composent cette famille sont en effet soit parasites (*Shigella*, *Yersinia pestis*), soit commensales (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella sp*), soit encore saprophytes (*Serratia sp*, *Enterobacter sp*) (Avril et al 1992).

La présence de ces espèces peut conduire à des contaminations, ce qui constitue un grand risque sur la bonne manipulation.

La plupart des espèces de *Clostridium* sont des bactéries telluriques, mais sont également isolées dans l'intestin et les selles de l'homme et des divers animaux. Ainsi la présence de *Clostridium* dans les eaux ou les aliments par exemple signe en général une contamination fécale (Avril et al. 1992). Nos résultats ont montrés l'absence totale des spores de ce germe sur les points de prélèvement, d'où nous pouvons exclure une contamination ancienne d'origine fécale.

Le genre *Staphylococcus* occupant le troisième rang de notre bilan d'analyse avec un taux de 15% appartiennent à la famille des *Staphylococcaceae*. (Hennekinne, 2009). Parmi les 27 espèces du genre actuellement répertoriées, les principales sont *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus* (Arnal, 2003). Nos bilans ont révélé la présence de la deuxième espèce sur plusieurs points de prélèvements. A l'origine, *Staphylococcus epidermidis* est une bactérie naturellement

présente sur la peau des hommes. Elle peut être responsable d'infections cutanées, nasales ou urinaires, et touche plus facilement les personnes dont le système immunitaire est compromis.

Des chercheurs australiens dans la revue *Nature Microbiology*, en utilisant la génomique, ont révélé que trois lignées de *Staphylococcus epidermidis* multirésistantes et adaptées à l'hôpital ont émergé au cours des dernières décennies et se sont répandues à l'échelle mondiale. Cela pourra bien expliquer sa prédominance de la plupart des bilans vu que plusieurs groupes y travaillent dessus au niveau de notre laboratoire.

Sur les points contrôlés (paillasse, verrerie, la hotte, tasse inox) spécialement la robinetterie analysés et qui sont considérés comme des vecteurs de contamination croisée, nous avons aussi isolés et identifiés des *Pseudomonas* représentés principalement par *P. aeruginosa* l'espèce la plus étudiée en termes de répartition géographique et d'habitats préférentiels. Sous forme libre, *P. aeruginosa* semble peu compétitif dans les sols mais montre un certain tropisme pour les milieux hydriques. En effet, les capacités de *P. aeruginosa* à survivre en milieu oligotrophe, à se développer dans les biofilms et à résister à de nombreuses substances actives dont des biocides lui confèrent un fort potentiel de colonisation des surfaces humides. Ainsi, *P. aeruginosa* est associé aux canalisations de nature variée constituant les réseaux d'eaux de distribution publique (EDP) et d'eaux usées, à la robinetterie et aux siphons, aux objets et linge de toilette des environnements hospitaliers ou non-hospitaliers, aux dispositifs médicaux contenant des liquides (e.g. humidificateurs des respirateurs artificiels). *P. aeruginosa* peut être présent dans des eaux résiduaires, des eaux de surface, des eaux destinées à la consommation humaine (eaux du réseau de distribution publique et eaux conditionnées), des eaux récréatives, des eaux insuffisamment traitées, ou des eaux distillées (Mena et Gerba, 2009). Cela rend la présence de ce germe moins risqué mais ça n'empêche que ça représente une contamination et nécessite une attention plus importante à la qualité des eaux alimentant nos laboratoires utilisées dans les dilutions, le rinçage de la verrerie et des échantillons et la préparation des solutions mères de certains échantillons purs, provoquant ainsi une contamination conduisant à une falsification des résultats attendus.

A partir de ces résultats, nous pouvons constater que les germes dominants dans ces lieux de travail sont les champignons et Levures avec la présence de ces espèces dominantes telle les Staphylocoques, qui représente un signe précurseur d'une désinfection insuffisante au niveau de ces lieux. Ceci confirme que les méthodes de nettoyage et de désinfection utilisées restent insuffisantes.

Par ailleurs, la variation de la microflore au niveau des différents points des laboratoires dont les manipulateurs sont plus ou moins en contact direct, montre que le niveau d'hygiène dans ces

endroits et particulièrement sur les paillasses et les verreries du laboratoire de microbiologie est très faible et ceci peut aussi poser différents problèmes de source des contaminations sur les résultats de recherche et la santé de l'utilisateur du laboratoire. Ce problème est commun, pour ne pas dire plus répandue au niveau des laboratoire de biochimie et de biotechnologie végétal où l'on a constaté une grande négligence des moindre consignes d'asepsie.

Cependant pour pallier à ce problème, la prévention, la sensibilisation et le respect des règles d'hygiènes restent les meilleurs moyens pour maîtriser la qualité microbiologique des lieux car ces endroits restent désormais les endroits les plus fréquentés par la classe intellectuelle du pays. Le nettoyage et la désinfection du laboratoire est essentielle afin de réduire le risque de contamination. Il s'agit de l'élimination rationnelle et aussi complète que possible des salissures sur les surfaces. Pour que cette procédure puisse être menée à bien, cela suppose, avant tout, que les locaux soient rangés et non encombrés.

Il est primordial de mettre à disposition du personnel un matériel de travail adapté, de préférence à usage unique.

Une contamination par voie aérienne peut être possible au sein des laboratoires. Pour éviter les contaminations par aérosol, l'exécution des manipulations à risque doit se faire sous enceintes protectrices telles que la hotte.

Afin de réduire voire de supprimer les risques identifiés, chaque fois que cela est possible. Des mesures de prévention des risques pourrait être conçues et mises en place. Elles comportent des stratégies qui de l'ordre organisationnels et techniques.

Parmi les dispositions les plus importantes est de fournir des équipements et des matériels adéquats adaptés de préférence à usage unique et en nombre suffisant ; car en raison de l'état actuel de l'économie des restrictions sont faite dans le budget attribué aux laboratoires. Egalement le renforcement du service d'hygiène et la formation spécifique du personnel concernés est un autre aspect de la gestion du risque qu'on doit tenir compte.

La disponibilité des collecteurs d'aiguilles usagées, de conteneurs pour les déchets coupants ou tranchants, des sacs noirs pour les DAOM, les sacs jaunes pour les DASRI, et la séparation des déchets à risque des autres, contribuent également à garder un seuil de risque biologique bas.

Cette étude réalisée sur une échelle spatiotemporelle très limitée, n'est représentative que des pratiques locales de notre établissement : elle n'a pas l'ambition de refléter la réalité dans tous les

laboratoires au niveau nationale. Dans cette optique, elle devrait être élargie à un plus grand nombre de départements et à d'autres établissements, afin de mettre le point sur plusieurs défaillances qui doivent être critiqués pour les améliorer.

# *Conclusion et perspectives*



## Conclusion

Les laboratoires, lieu de recherche du savoir, de connaissance, de détente et d'amélioration du niveau intellectuel de l'individu, peuvent exposer à tout moment leurs utilisateurs à des dangers sanitaires non contrôlables, étant donné que ces derniers viennent de différentes zones de la région et de différents profils.

Le nombre croissant des utilisateurs de ces salles dont souvent la conception n'est soumise à aucune règle d'hygiène ou de sécurité, favorise ainsi la création des nids de microorganismes favorisant leurs développements, d'où la contamination des personnes habituées à ces lieux.

Les maladies susceptibles d'être transmises dans cet environnement, sont notamment les gastroentérites, les maladies pulmonaires et les dermatites.

Les résultats obtenus lors de notre étude, montre que différentes espèces microbiennes prolifèrent au niveau de plusieurs points du laboratoire des SNV de l'université Larbi Ben M'hidi.

Toutefois, avec une prédominance des champignons et levures. Les différentes espèces du genre *Staphylococcus* tel *Staphylococcus epidermitis*, sont très abondants dans ces lieux. Par ailleurs, nous avons aussi isolés d'autres espèces bactériennes telles les *Pseudomonas* et *Rhizobium* ainsi que plusieurs indicateurs de contamination appartenant à la famille des Enterobacteries

L'importance de cette étude sur la contamination croisée des laboratoires est de nous permettre de décerner tous les problèmes ayant trait à la naissance, au développement, à la prolifération et à la transmission microbienne et de montrer les risques sanitaires que peuvent encourir les laborantins de ces lieux ainsi que l'impact de ceci sur la qualité des résultats de leurs travaux.

Sur la base des résultats, des mesures préventives ont été proposées pour réduire les contaminations. Cela comprenait une attention accrue aux pratiques d'hygiène, telles que le nettoyage régulier des surfaces, le remplacement fréquent des gants et l'adoption de bonnes techniques de manipulation des échantillons. De plus, une formation approfondie du personnel sur les protocoles de sécurité et les bonnes pratiques d'hygiène a été recommandée.

# *Références bibliographiques*



**-A-**

- AFNOR. (2006).** Chimie - Hygiène et sécurité - Tome 1, Laboratoires et salles propres.
- Assailly , J. (2010).** La psychologie du risque. *Coll. Sciences du risque et du danger. Lavoisier*, 326 p.
- Aspec . (2008).** La Biocontamination – salle propres, environnements maîtrisés et zones de confinement. 2008. 266 pages .
- AFS.(2005)** Maitrise et contrôles d'environnement en stérilisation. 2005, p. 48 pages. 48 pages.
- . AFSSPS . (2010)** Décision du 27 octobre 2010 définissant les règles de bonnes pratiques relatives à la préparation, à la conservation, au transport, à la distribution et à la cession des tissus, des cellules et des préparations de thérapie cellulaire. 2010. 50 pages.
- Anses.(2013)** Risques sanitaires liés aux piscines. Partie 2 : bains à remous. 2013. 202 pages.
- Ait Kaci ,S et Hamdi ,M.S&&(2008).** Contribution à l'étude des paramètres physico-chimiques et bactériologiques de l'embouchure de l'oued "Béni-Messous".**DEUA en science de la mer. (I.N.S.M.A.L)**
- Aouissi ,A et al.(2007).** Qualité bactériologique de l'eau d'Oued Seybouse.**Mémoire d'ingénieur. Université 8 mai 1945 Guelma. 57p**
- Avril , J & Fauchère , J.(2007).** Cours de bactériologie DCEM1, Faculté de médecine de Nantes, page : 36

**-B-**

- Picot ,A & Ducret ,J. (2013).** Sécurité et prévention des risques en laboratoire de chimie et de biologie, (3<sup>o</sup> Éd.) . Lavoisier, 1120 p.
- Cris ,M & Piero ,S . (2020).** Les risques biologiques, coronavirus et autres pandémies (guide de protection). *Culture & Racines; Illustrated édition*, 118p.
- (Shematek & Wood. (2012).**
- Boulanger , S & Deschamps F .(2007).** Les 100 principales maladies professionnelles et environnementales , *Ellipses Edition Marketing S.A*, Paris, page : 117.
- Bousseboua,H ,(2003).**Cours de microbiologie générale, ed université mentouri constantine,

page : 28.

**Boukrouma ,N (2008).**Contribution à l'étude de la qualité microbiologique de l'eau d'un écosystème aquatique artificiel: cas de la retenue collinaire d'Ain Fakroune (W. d'Oum El-Bouaghi). Mémoire de Magister. Université 8 mai 1945, Guelma. 64p.

**Boudraa , W & Aouissi ,A .(2011).** Contribution a l'étude de la qualité bacteriologique del'eau d'Oued seyhouse de la ville de Guelma, P 36-40.

**-C-**

**CNRS. (2017).** Centre national de la recherche scientifique. Risques biologiques. Les cahiers de prévention Santé • Sécurité • Environnement (4° Éd.), 88p.

1. **CTINI , S& Ministère de la santé.(2002).** Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé. Air, eaux et surface. 2002. 78 pages.
2. **CCLIN Sud-Ouest.(1998).** Contrôles microbiologiques en hygiène hospitalière. 1998. 30 pages.

**CCLIN Sud Est.(2015).** Les catégories d'eau dans les établissements de santé. Typologie - Traitements complémentaires - Référentiels. 2015. 17 pages.

**Chaouch , R.(2007).** Identification et quantification des déchets solides encombrant les plages d'Annaba: aspect physico-chimique et bactériologique des eaux. Mémoire de Magister. Université Badji-Mokhtar Annaba. 105p.

**-D-**

**Desroches ,A & Leroy A & Vallée F. (2015).** La gestion des risques. (3° Éd.), *Principes et pratiques, Lavoisier*, 312 p.

**Delarras C. 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou le contrôle sanitaire. Rue Lavoisier : Tec & Doc. 475p

**Gramond ,S.(2014).** La fonction sécurité, collection activité et sécurité, (3<sup>o</sup> Éd.) .

**(Guy Gautret, 2008):**

**Gautret , G. (2008).** Le risque chimique. *Concepts Méthodes Pratiques, Dunod, Paris, 376p.*

**Guillaume, P. (2004).** Les milieux de cultures

**INRS. (2021).** Institut national de recherche et de sécurité, Santé et sécurité au travail.Travail à la chaleur, 25p.

**INRS. (2021).** Institut national de recherche et de sécurité, Santé et sécurité au travail.Incendie sur le lieu de travail, 30p.

**-J-**

**Joseph , P.( 2003).** *Microbiologie alimentaire*, 3<sup>ème</sup> édition dunob, paris,p 678.

**-L**

**Landers ,TF et al .(2010).** Swab Type, Moistening, and Preenrichment for *Staphylococcus aureus* on Environmental Surfaces. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010, Vol. 48, pp. 2235-2236.

**Leleu G., (2011),** Procédure de contrôle du nettoyage et de la désinfection despaillasses et du matériel. Paris, *Tec. & Doc.* p 1- 8.

**M**

**Moran ,L & Masciangiol ,T. (2010).** La sécurité dans le laboratoire de chimie, Un Guide sur la gestion prudente des produits chimiques. *l'Académie nationale des sciences, États-Unis d'Amérique*, 302 p.

**Ministère de l'emploi et al .(2001).** Bonnes pratiques de pharmacie hospitalière. 2001. 63 pages.

**Ministère de la santé & de la jeunesse et des sports.(2007). agence française de sécurité sanitaire des produits de santé.** Bonnes pratiques de préparation. *BO n° 2007/7bis*. 81 pages.

**Ministère de la santé.(2005)** L'eau dans les établissements de santé. Guide technique. 2005. 115 pages.

**Ministère des affaires sociales et de la sante.(2015)** Les Bonnes Pratiques de Fabrication des substances actives et des médicaments à usage humain (BPF partie I). *BO N° 2015/12 bis*. 318 pages.

**Moore, G &Griffith, C.(2007).** Problems associated with traditional hygiene swabbing: the need for in-house standardization. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, Vol. 103, pp. 1090-1103.

**Meunier ,O et al (2008).** Evaluation des méthodes de prélèvement pour le contrôle microbiologique des textiles. *Annales de Biologie Clinique*. 2008, Vol. 66, pp. 183-188.

**Mouffouk ,F.(2001).** Guide technique d'analyses bactériologiques des eaux de mer, institut Pasteur d'alger.40p.

## N

**Nichan ,M.(2011).** Glossaire du risque chimique. *Dunod*, 256p.

## O

**OMS.(2009).** Organisation mondiale de la Santé, Système de Gestion de la Qualité au Laboratoire - *Outil de formation WHO/HSE/IHR/LYO*, 246p.

**Ougier-Diebolt ,M.(2013)** Les prélèvements microbiologiques des surfaces en milieu hospitalier : revue bibliographique, enquête de pratiques et étude de rendement. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, Bordeaux, 2013.

**Rouaiguia ,M.(2010).** *Qualité micrbiologique de l'eau de OuedMessida*. Mémoire de master 2. Université 8 mai 1945 Guelma. 78p.

*S*

**Shematek ,G & Wood ,W. (2012).** La sécurité au laboratoire: directives de la SCSLM. (7<sup>o</sup> Éd.)  
*Hamilton: Société canadienne de science de laboratoire médical. (Gramond, 2014).*

**SF2H.** Qualité de l'air au bloc opératoire et autres secteurs interventionnels. *Hygiènes.* 2015. 64 pages.

**SF2H, SFMM.(2011)** Risque infectieux fongique et travaux en établissement de santé. 2011. 56 pages.

*T*

**Tandia ,C. (2007).** Contrôle et suivi de la qualité des eaux usées. Protocole de détermination des paramètres physico-chimiques et bactériologiques.*CREPA.* (3). 1-52.

