

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de MASTER en Biologie

Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : MICROBIOLOGIE

*Présenté par*

**BOUKLIA-HASSANE Ouasila**

**Intitulé du Thème**

**Evaluation de la formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae* isolée de sondes urinaires. CHU de Tlemcen**

**Soutenu le : 18/06/2014**

**Devant le Jury composé de :**

**Dr. Rebiahi S.A.**

**Maître de conférences B**

**Président**

**Dr. Barket S.**

**Maître de conférences B**

**Examinateur**

**Pr. Hassaine H.**

**Professeur**

**Promoteur**

# Remerciements

*Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ;  
elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries.*

MARCEL PROUST

*En premier lieu je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au Professeur H.HASSAINE qui fut pour moi une Directrice de mémoire attentive et disponible malgré ses nombreuses charges et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront les moteurs de mon travail.*

*J'exprime tous mes remerciements à l'ensemble des membres du jury :*

*Docteur Rebiahi S.A                      Président du jury*

*Docteur Barket S                        Examineur*

*Je tiens aussi à adresser toute ma gratitude à Mlle Bellifa Samia (Doctorante) et Mlle Didi Wafaa (Doctorante) pour leur disponibilité et leur cordialité.*

*Qu'ils me soit permis de présenter tous mes remerciements à tout le personnel du service de réanimation du CHU de Tlemcen de m'avoir acceptée au sein de ce service et de m'avoir facilitée le travail .*

*Je ne saurai terminer sans remercier toutes ces personnes qui sont dans l'ombre et dont la contribution à mon travail est non négligeable notamment tout le personnel de laboratoire, de la bibliothèque, de l'administration.*

# Dédicaces

À mon cher époux Tawfiq et à mes enfants Rym et Abdelmadjid pour leurs multiples encouragements et leur patience. Qu'ils trouvent ici toute mon affection et tout mon amour.

À ma mère et à mon père pour leur soutien, leur aide, leur sacrifice et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer. Qu'ils trouvent ici toute ma reconnaissance, ma gratitude et tout mon amour.

À mes beaux parents pour leurs précieux encouragements.

À mes frères Fayçal, Yacine et Sofiane pour leur conseils.

À mes beaux frères et mes belles sœurs.

À mes neveux et mes nièces.

À toute ma famille et à toutes mes amis.

À toute la promotion « Microbiologie 2013-2014 » en particulier Tabti Sara et Cherif Rajaa.



## تلخيص:

الشريط الحيوي هو مجموعة من الكائنات الحية الدقيقة المختلفة ، التي تتمسك بالسطح .  
قد يتشكل هذا الشريط على الأنسجة الحية مثلما يتشكل أيضا على الأجهزة الطبية .  
من بين هذه الكائنات الدقيقة هي البكتريا " كليبسيلا الرئوية " التي تسبب الأمراض الالتهابية و تلعب دورا رئيسيا في التهابات المسالك البولية و الغرض من هذا العمل هو دراسة قدرة هذه البكتيريا المعزولة من القسطرة البولية من وحدة العناية المركزة في المستشفى الجامعي - تلمسان- على مقاومة المضادات الحيوية و تشكيل الشريط الحيوي .  
من 32 قسطرة بولية 4/1 منها تحتوي على الكليبسيلا الرئوية التي أظهرت مقاومة عالية جدا مع قيمة الحد الأقصى للمضادات الحيوية  $\beta$  لاكتامين .  
و قد أظهرت طريقة لوحة زراعة الأنسجة ، قدرة هذه السلالات لتشكيل الشريط الحيوي: 4 منها جيدة لتشكيل الشريط الحيوي و 3 منها لها تشكيل معتدل.  
يتم تشكيل الشريط الحيوي للكليبسيلا الرئوية في أقل من 24 سا و يتم التفريق في 96 سا .  
الكلمات المفتاحية : الكليبسيلا الرئوية - الشريط الحيوي - القسطرة البولية - التهابات المسالك البولية - المضادات الحيوية .

## Résumé :

Un biofilm est une communauté de micro-organismes hétérogène, qui a la capacité de se fixer sur une surface vivante ou inerte tels que les dispositifs médicaux (sondes urinaires par exemple). Parmi ces micro-organismes, la bactérie la plus incriminée est *Klebsiella pneumoniae* qui est pathogène, opportuniste et joue un rôle prépondérant dans les infections urinaires nosocomiales. Ceci représente un problème de santé publique.

Ce travail consiste à étudier la capacité de *Klebsiella pneumoniae* isolées à partir des sondes urinaires du service de réanimation du CHU de Tlemcen à résister aux antibiotiques et de former un biofilm.

Sur les 32 sondes urinaires prélevées, plus du  $\frac{1}{4}$  était colonisé, sont très résistantes, avec une valeur de résistance maximale pour les  $\beta$ -lactamines.

La méthode de plaque de culture de tissu (TCP) utilisée a montré la capacité de ces souches à former un biofilm. Sur les 8 souches isolées, 4 sont bonnes formatrices de biofilm, 4 le sont modérément. La formation de biofilm *in vitro* des *K. pneumoniae* débute dans les moins de 24 heures et se disperse qu'après les 92èmes heures.

**Mots clés :** *Klebsiella pneumoniae*, biofilm, sonde urinaire, infection urinaire nosocomiale, antibiotiques.

## Abstract:

A biofilm is a community of diverse microorganisms, which has the ability to bind to a living or inert such as medical devices (eg urinary catheters) surface. Among these microorganisms, the most offending bacterium *Klebsiella pneumoniae* is pathogenic, opportunistic, and plays a major role in nosocomial urinary tract infections. This is a public health problem.

This work is to study the ability of *Klebsiella pneumoniae* isolated from the urinary catheters ICU of the University Hospital of Tlemcen to resist antibiotics and form a biofilm.

On urinary 32 sondes removed,  $\frac{1}{4}$  souches *Klebsiella pneumoniae* were isolated and showed a very high resistance, with a value of maximum resistance to beta-lactam antibiotics.

The method of tissue culture plate (TCP) used has shown the ability of these strains to form a biofilm. Isolated on 8 souches, 4 are good biofilm-forming, 4 are moderately biofilm-forming.

Biofilm formation of *K. pneumoniae* *in vitro* begins within less than 24 hours and until the dispersed 96èmes hours.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, biofilm, urinary catheter, nosocomial urinary tract infection, antibiotics.



## *Introduction*

### *Synthèse bibliographique*

#### I. Les sondes urinaires

1. Définition	2
2. Rôle des sondes urinaires dans la dissémination des infections	4
3. Modes de contamination	4
4. Les facteurs de risque d'une IUN en présence de sonde urinaire	5

#### II. Etude des *Klebsiella pneumoniae*

1. Taxonomie du genre <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
2. Caractères biochimique	7
3. Structure de la surface de l'espèce <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
3.1. La capsule	7
3.2. Les fimbriae (pili)	8
3.2.1. Pili de type 1	8
3.2.2. Pili de type 3	9
3.3. Les adhésines	9
3.4. Sidérophores	10
3.5. Le lipopolysaccharide	10
4. Epidémiologie	11
5. Résistances aux antibiotiques	12
5.1. Résistance naturelle	12
5.2. Résistance acquise	13
5.2.1. Résistance aux $\beta$ -lactamase à spectre étendu	13
5.2.2. Résistance aux céphalosporines	13
5.2.3. Résistance à la pénicillinase	13
5.2.4. Résistance aux ticarpènes	13

#### III. Les biofilms bactériens

1. Historique	14
2. Définition	15
3. Les étapes de formation d'un biofilm	15

3.1. Adhésion réversible	15
3.2. Adhésion irréversible	15
3.3. Formation de micro colonie	15
3.4. Maturation du biofilm	15
3.5. Dispersion du biofilm	16
4. Les facteurs influençant la formation du biofilm	16
4.1. La surface	17
4.2. Les caractéristiques du milieu	17
4.3. Propriété des cellules	17
5. Biofilm dans le secteur médical	18
6. Formation du biofilm sur dispositifs médicaux	18
6.1. Le mécanisme de formation du biofilm sur une sonde urinaire	18

## ***Matériel et méthodes***

1. Lieu d'étude	21
2. Prélèvement et ensemencement	21
3. Isolement et purification	22
4. Identification	22
4.1. Caractères macroscopiques	22
4.2. Coloration de Gram	22
4.3. Identification par galerie Api20E	22
5. Antibiogramme	23
6. Evaluation de la formation du biofilm par la méthode de plaque de culture de tissus (TCP)	25
7. La cinétique de la formation du biofilm sur sonde urinaire	26

## ***Résultats et discussion***

1. Résultats des prélèvements	29
2. Identification des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	30
2.1. Aspect macroscopique	30
2.2. Aspect microscopique (Coloration de GRAM)	31
2.3. Caractères biochimiques (API 20 <sup>E</sup> (Biomérieux®, France)	31

3. Résistances aux antibiotiques	33
4. Evaluation de la formation de biofilm <i>in vitro</i>	35
5. Cinétique d'adhésion	36

***Conclusion***

***Références bibliographiques***

***Annexes***

**H<sub>2</sub>S**: Sodium thiosulfate.

**ADH**: Arginine Di-Hydrolase.

**BHIB** : Bouillon Cœur Cerveau.

**CASFM** : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

**CIT**: Citrate.

**DO** : Densité Optique.

**GEL**: Gélatine.

**IN**: Infection Nosocomiale.

**IUN** : Infection Urinaire Nosocomiale.

**IUS** : Infection Urinaire sur Sonde.

**Kp** : *Klebsiella pneumoniae*.

**LDC** : Lysine-Décarboxylase.

**LPS** : Le lipopolysaccharide.

**ODC** : Ornithine-Décarboxylase.

**PBS** : Tampon Phosphate Salin.

**pH** : Potentiel d'Hydrogène.

**T°** : Température.

**TCP** : Plaque de Culture de Tissus.

**URE**: Urée.

**VP** : Réaction de Voges-Proskauer (production d'acétoïne).

**Figure 1.** Sondes urinaires.

**Figure 2.** Représentation schématique des facteurs de pathogénicité *Klebsiella* (Podschun et Ullmann, 1998)

**Figure 3.** Cliché de microscope électronique à balayage de *Klebsiella pneumoniae* au sein d'un biofilm. Grossissement : x 20 000 (Balestrino, 2007).

**Figure 4.** Représentation schématique du développement d'un biofilm bactérien (Lebeaux et Ghigo, 2012).

**Figure 5.** Traitement aux ultrasons.

**Figure 6.** Dispositions des disques d'antibiotiques.

**Figure 7.** Technique de formation de biofilm sur microplaque de titration.

**Figure 8.** Remplissage des puits par l'éthanol.

**Figure 9.** Photographie de deux sondes différentes

**Figure 10.** Les deux morphotypes de *Klebsiella pneumoniae* sur le milieu Mac Conckey.

**Figure 11.** Examen microscopique après coloration de Gram.

**Figure 12.** Identification de *Klebsiella pneumoniae* (API 20<sup>E</sup> (Biomérieux®, France)).

**Figure 13.** Evaluation de la résistance des souches *Klebsiella pneumoniae* vis-à-vis des antibiotiques.

**Figure 14.** Antibiogramme réalisé chez des souches *Klebsiella pneumoniae* isolées de sondes urinaires

**Figure 15.** Photo personnel sur la formation de biofilm par la méthode de TCP

**Figure 16.** Evaluation de la production de biofilm par la méthode TCP.

**Figure 17.** Cinétique de la formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae* sur sonde urinaire *in vitro* (suivie de la densité optique en fonction du temps)

# ***INTRODUCTION***

---

Bon nombre de bactéries sont organisées en communautés structurées susceptibles de coloniser des surfaces solides. Cette structure représente le mode de vie normal d'une bactérie. C'est ce mode de comportement qui est prédominant des organismes unicellulaires et non le mode de flottaison libre de type dit planctonique.

Après attachement à un support, les bactéries vont mettre en place et développer une communauté organisée à laquelle **Costerton** a donné le nom de « **biofilm** » (**Filloux et Vallet, 2003**).

Le biofilm confère de nombreux avantages tels que l'adaptation aux stress de l'environnement ou encore une protection contre les agressions extérieures (**Balestrino, 2006**).

Dans le domaine médical, le biofilm a pris une importance toute particulière à cause de sa contribution à plusieurs complications qui touchent la santé, notamment au sein des hôpitaux, où il intervient dans la colonisation des implants médicaux comme les sondes urinaires.

Les infections urinaires nosocomiales sont les infections les plus fréquentes (**Tielen et al, 2011**) et surviennent très souvent chez des patients porteurs de sondes urinaires. Ces dernières sont le premier facteur responsable de développement d'une infection (**Coloby, 2007**).

Les Klebsielles sont les souches les plus fréquemment isolées dans les hôpitaux et surfaces des dispositifs médicaux. Parmi elles, *K. pneumoniae* naturellement présentes à faible concentration dans l'environnement, peut favoriser la formation de biofilm. Ce type de bactérie se diffuse dans l'environnement hospitalier via des objets souillés. Elles sont souvent classées pour agent à l'origine d'infection nosocomiale (**Balestrino, 2006**).

L'éradication des biofilms pose de réels problèmes dans le domaine médical. En effet, si les traitements antibiotiques classiques sont efficaces sur les bactéries planctoniques, ils révèlent le plus souvent une efficacité quasiment nulle sur les biofilms (**Silverstein et Donatucci, 2003**).

L'objectif de ce travail est :

- D'isoler et d'identifier des souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* sur des sondes urinaires retirées chez les patients hospitalisés au CHU de Tlemcen.
- D'étudier leur état de résistance vis-à-vis d'une série d'antibiotiques.
- Évaluer la capacité des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de sondes urinaires à la formation de biofilm *in vitro* par la méthode (TCP)
- Suivre la cinétique de la formation de biofilm de cette bactérie *in vitro*.



***SYNTHESE***

***BIBLIOGRAPHIQUE***

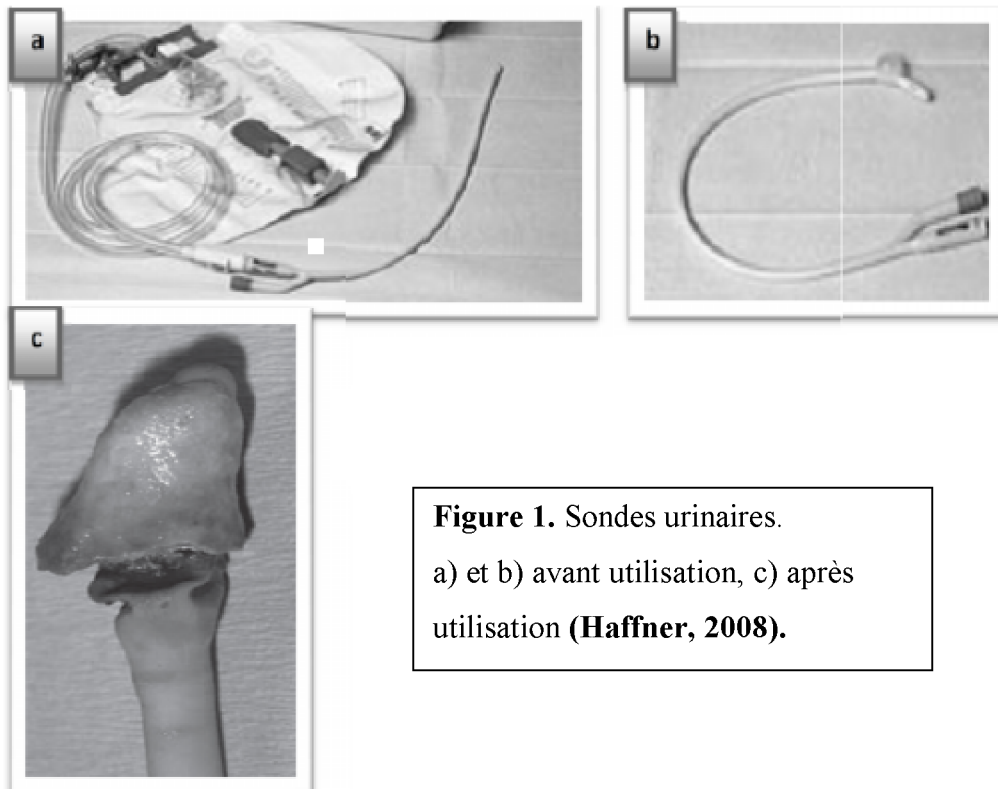
## Chapitre I. Les sondes urinaires

### 1. Définition

Les sondes urinaires sont des dispositifs médicaux standards utilisés à la fois dans les paramètres de maisons de soins infirmiers et à l'hôpital. Le sondage urinaire est un acte médical qui consiste à l'introduction d'une sonde par le méat urinaire jusqu'à la vessie en suivant le trajet de l'urètre de façon atraumatique et indolore, et en respectant des règles d'asepsie rigoureuses. Le sondage est utilisé pour permettre l'évacuation des urines en cas de rétention aigüe(en cas de rétention chronique), ou dans un but thérapeutique (lavage, instillation) en faisant communiquer la vessie avec l'extérieur **(Haffner, 2008)(Figure 1)**. Dans la pratique quotidienne de l'urologie, l'utilisation de sondes de drainage est omniprésente.

Les durées d'implantation de ces sondes sont très variables selon l'indication. Une sonde peut- être utilisée de façon très ponctuelle (sondage évacuateur) ou rester en place pour des périodes allant de quelques jours à plusieurs mois. Il est évident que, selon la durée d'implantation, les exigences ne seront pas les mêmes **(Pariente et Conort, 2005)**.

La nature de ces sondes est également très variable et dépend de leur structure : une sonde urétérale simple sera composée d'un matériau unique, alors qu'une sonde vésicale sera d'une composition plus complexe **(Pariente et Conort, 2005)**. Parfois des additifs tels les agents lubrifiant, colorants, radio-opacifiant) sont associés aux polymères organiques **[(Pariente et Conort, 2005) ;(Haffner, 2008)]**.



**Figure 1.** Sondes urinaires.  
a) et b) avant utilisation, c) après utilisation (**Haffner, 2008**).

Le matériau constitutif des sondes urinaires a progressivement évolué avec l'apparition des matières plastiques.

Les sondes sont aujourd'hui constituées pour leur quasi-totalité de polymères. Il s'agit de produits issus de la chimie organique, constitués de macromolécules à base essentiellement d'atomes de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote et caractérisés par la répétition d'un ou plusieurs types d'unités chimiques de base appelées monomères.

Nous décrivons ci-dessous les principaux matériaux :

- **Les polyéthylènes**, qui sont des polymères dérivés de l'éthylène appartenant à la famille des polyoléfines, se dégradent au contact de l'urine et deviennent cassants. Pour cette raison, ils ne sont plus utilisés.
- **Les polychlorures de vinyle**, sont des polymères obtenus à partir de l'acétylène, plastifiés en vue de cette application. Ils peuvent contenir jusqu'à 35% de plastifiant. Ils sont plus ou moins rigides et sensibles aux incrustations et de ce fait, ont été abandonnés également.
- **Le latex** : les sondes en latex ou contenant du latex doivent être éliminées. Leur toxicité est démontrée, même pour des utilisations courtes de moins de 48 heures.
- **Les polyuréthanes** : cette famille inclut des élastomères dont les propriétés peuvent varier en fonction des additifs et plastifiants utilisés. Ces polymères sont plus rigides que

les silicones et possèdent une excellente mémoire de forme. Dans cette famille, on trouve de très nombreuses sondes. Il peut s'agir de polyuréthanes purs ou modifiés.

- **Les silicones** : ces polymères associent en alternance des atomes de Silicium (Si) sur lesquels sont greffés des radicaux carbonés et des atomes d'oxygène. C'est cette liaison "silicium-oxygène" qui est à l'origine de l'appellation "silicone". Les silicones sont intéressants pour leur stabilité thermique, leur résistance au vieillissement, leur souplesse (**Stickler, 2008**), l'absence de phénomènes irritatifs et leur résistance aux incrustations liée à leur caractère hydrophobe (**Pariente et Conort, 2005**).

### 2. Rôle des Sondes urétrales dans la dissémination des infections

Le sondage urétral est un geste qui dépasse largement les limites de l'urologie. Qu'il s'agisse de sondes mises en place en réanimation ou au bloc opératoire pour évaluer la diurèse ou de sondes à demeure chez des patients âgés ou alités ayant perdu leur autonomie mictionnelle, la complication principale est le risque infectieux (**Stahl, 2002**).

De nombreuses publications et conférences ont rapporté le risque élevé d'infections urinaires chez les patients porteurs de sonde (**Stahl, 2002**).

### 3. Modes de contamination

#### ➤ Voie extraluminale précoce

La plupart des microorganismes responsables des infections urinaires proviennent soit de la propre flore périnéale ou urétrale du patient, soit par manu portage (par le personnel, le patient) lors de l'insertion de la sonde (**Cazenave, 2007**).

#### ➤ Voie extraluminale tardive

Les microorganismes d'origine digestive colonisent le méat et migrent progressivement vers l'urètre et la vessie par capillarité dans le fin film muqueux constitué à la surface de la sonde (**Stahl et al., 2002**). C'est la voie prédominante (66%).

Ce mode de contamination serait plus fréquent pour les cocci à Gram- (79%), et les levures (69%) que les bacilles à Gram- (54%). Cette voie serait plus fréquente chez la femme (**Cazenave, 2007**).

### ➤ Voie endoluminale

L'incidence journalière d'acquisition d'une IUN sur sonde a beaucoup diminué avec les systèmes clos **(Cazenave, 2007)**, variant selon les situations de 3 à 10 %, avec un risque cumulé de 100 % (ou presque) après 30 jours de sondage [**(Cazenave, 2007 ; Stahl, 2002)**].

### ➤ Voie lymphatique ou hématogène

Ce mode de contamination à partir d'une source endogène à distance a été constaté dans des études prospectives de suivi quotidien de la flore [**(Coloby, 2007) ; Maki et Tambyah, 2001)**]. L'importance de ce mode d'acquisition reste inconnue **(Cazenave, 2007)**.

## 4. Les facteurs de risque d'une IUN en présence de sonde urinaire

Les facteurs tiennent à l'hôte, à l'environnement, à la sonde et à la microbiologie.

### ➤ Les facteurs liés à l'hôte :

L'âge, une neutropénie, une chimiothérapie prolongée, le traitement immunosuppresseur, une infection à distance, une altération du revêtement cutané (brûlure), le sexe féminin, diabète **(Stahl, 2002)**.

### ➤ Les facteurs liés à l'environnement :

Il faut considérer la mauvaise pose et les conditions de pose, par exemple, la mauvaise application des mesures d'hygiène par le personnel soignant. Également le manu portage (par le personnel, le patient voir la famille) est un facteur certain de diffusion de bactéries nosocomiales **(Stahl, 2002)**.

### ➤ Les facteurs liés à la sonde:

- Altérations des moyens de défense vésicale :

La sonde peut endommager mécaniquement l'urothélium et la couche de glycoaminoglycane. La sonde urinaire et son ballonnet sont en effet une source constante d'irritation pour la muqueuse favorisant l'adhésion des bactéries [**(Pariante et Conort, 2005) ;(Coloby,2007) ;(Newman,2007) ;(Haffner,2008)**].

- Perturbations du transit urinaire :

La vessie sondée à demeure se transforme en un “dispositif de culture permanent”. En effet, le drainage est souvent imparfait laissant un résidu vésical comme un support du biofilm sur la sonde (**Pariente et Conort, 2005**).

➤ Les facteurs liés à la microbiologie

Les microorganismes les plus fréquemment à l'origine des infections urinaires sur sondes restent dans 60 % des cas les entérobactéries de la flore digestive du patient, native ou modifiée par l'exposition à une antibiothérapie, ou par transmission croisée, avec prédominance de *Klebsiella pneumoniae* (**Raisin,2006**).

La fréquence des souches résistantes aux antibiotiques tels que les *Klebsiella pneumoniae* est plus élevée que dans les infections urinaires communautaires, constituant un véritable réservoir intra-hospitalier. L'IUSV survenant après un sondage de courte durée est davantage mono microbienne contrairement au sondage de longue durée.

## Chapitre II. Etude des *Klebsiella pneumoniae*

### 1. Taxonomie du genre *Klebsiella*

Le genre *Klebsiella* appelée également bactérie de Friedländer fait partie de la famille des Enterobacteriaceae et sa taxonomie se caractérise par une nomenclature complexe. Sa nomenclature est aujourd'hui encore provisoire, car de nouvelles espèces ont été incluses dans ce genre, sur des arguments phénotypiques, mais sans réévaluation globale de sa position taxonomique au sein des entérobactéries, ni entre les différentes espèces.

A l'origine, l'importance médicale du genre *Klebsiella* le conduisit à être subdivisé en trois espèces correspondantes aux maladies engendrées : *K. pneumoniae*, *K. ozaenae*, et *K. rhinoscleromatis* (Balestrino, 2006).

### 2. Caractères biochimiques

Les espèces *Klebsiellae* sont généralement identifiées et différenciées en fonction de leurs réactions biochimiques. Le genre est défini comme contenant : non mobile, bactéries gram-négatives encapsulées généralement en forme de tige faisant partie de la famille des *Enterobacteriaceae*, (Edwards et Ewing, 1986).

*K. pneumoniae* possède les caractères suivants : oxydase négative catalase positive, fermentation du D-glucose, réduction des nitrates en nitrites. Les caractères biochimiques conduisant au diagnostic de l'espèce sont les suivants :  $\beta$ -galactosidase positive, uréase positive, VP positive ou négative (réaction de Voges-Proskauer : production d'acétoïne), lysine-décarboxylase (LDC) positive, ornithine-décarboxylase (ODC) négative, arginine di-hydrolase (ADH) négative, indole négative, gélatinase négative, absence de production d'H<sub>2</sub>S, fermentation de nombreux sucres dont le saccharose, le rhamnose et le mélibiose (Illiaquer, 2010).

### 3. Structure de la surface de l'espèce *Klebsiella pneumoniae*

#### 3.1. La capsule

*Klebsiella* développent habituellement des capsules composées de premier plan de polysaccharides acides complexes.

Les sous-unités capsulaires répétées, constituées de quatre à six sucres et, très souvent, les acides uroniques (en tant que composants chargés négativement).

Les capsules sont essentielles pour la virulence de *Klebsiella*, [(Domenico et Johanson, 1982) ;(Cryz *et al.*, 1984); (Highsmith et Jarvis 1985)].

Le matériau capsulaire forme d'épais faisceaux de structures fibrillous couvrant la surface de la bactérie dans les couches massives. (Amako *et al.*, 1988).Ceci protège la bactérie de la phagocytose par les granulocytes polymorphonucléaires, d'une part [(Simoons-Smit *et al.*, 1985) ; (Simoons-Smit *et al.*, 1986) ;(Podschun et Ullmann, 1992); (Podschun et Ullmann,1993)] et empêche la destruction des bactéries par des facteurs sériques bactéricides sur l'autre (Williams *et al.*,1983).

### 3.2. Les fimbriae(pili)

Dans une première étape dans le processus infectieux critique, les microorganismes doivent se rapprocher autant que possible des surfaces muqueuses et maintenir cette proximité en se fixant à la cellule hôte (d'adhérence).

Les propriétés adhésives des entérobactéries sont généralement médiées par différents types de pili.

Pili (autrement connu comme fimbriae) sont non flagellaires, filamenteux, projections sur la surface bactérienne.

Ces structures sont de 10 µm de long et ont un diamètre de 1 à 11 nm (Ofek et Doyle, 1994), ils sont constitués de sous-unités protéiques globulaires de polymères (piline) (Jones et Isaacson , 1983). Plusieurs sont impliqués dans la formation des biofilms.

Parmi les différents types de pili présents dans les entérobactéries, il existe deux types prédominants pour les *Klebsiella* [(Przondo-Hessek et Pulverer, 1983) ;(Old *et al.*,1985) ;(Podschum *et al.*,1987)].

#### ➤ Pili de type 1

Pili de type 1 sont les meilleurs enquêtes des adhésines bactériennes. Ils sont des fimbriae de structure rigide de 5 à 7 nm de diamètre et de longueur variable (0,2 à 2µm), disposés de façon péritriche à la surface des bactéries.

La base du pilus est ancrée dans la membrane externe de la bactérie, et se prolonge par une section hélicoïdale flexible, qui porte l'adhésine FimH à son extrémité [(Ofek *et al.* , 1977) ;(Giampapa *et al.*, 1988); (Wold *et al.*, 1990) ; (Tewari *et al.*, 1993); (Sokurenko *et al.*, 1994)]. Les structures de sucre se composent de courtes chaînes d'oligomannose liées par des liaisons N-glycosidiques à des glycoprotéines (Sharon et Ofek , 1986).



Les pili de type 1 sont également capables de se lier à des glycoprotéines solubles, contenant mannosyle-urinaires, telles que la protéine de Tamm-Horsfall (**Reinhardt, 1990**), ou dans la salive (**Babu et al., 1986**).

Les pili de type 1 sont essentiels à l'attachement initial stable de plusieurs souches de *Klebsiella pneumoniae* sur des surfaces inertes [(**Pratt et Kolter, 1998**) ; (**Schembri et Klemm, 2001a**) ; (**Schembri et al., 2005**)] que ce soit en milieu riche dans des conditions statiques [(**Pratt et Kolter, 1998**; **Ren et al., 2004a**)] ou en milieu minimum dans des conditions dynamiques (**Beloin et al., 2004**). Chez *K. pneumoniae*, ces fimbriae sont également impliqués dans la formation des biofilms (**Schembri et al., 2005**).

### ➤ Pili de type 3 :

Les pili de type 3 sont très largement répandus parmi les souches de *Klebsiella*, d'origine clinique ou environnementale.

Leur rôle a été mis en évidence dans l'adhésion des bactéries aux cellules endothéliales, aux cellules épithéliales de l'arbre respiratoire et aux cellules uroépithéliales [(**Wurker et al., 1990**) ; (**Hornick et al., 1992**) ; (**Tarkkanen et al., 1997**)].

Cette espèce n'est pas une cause commune des infections urinaires chez les personnes à court terme, cathétérisées ou non cathétérisées, mais a une prévalence beaucoup plus élevée dans l'urine des patients cathétérisés à long terme (**Darfeuille-Michaud, 1992**).

Les gènes codant les pili de type 3 sont regroupés en un opéron appelé *mrk* ; il comprend les gènes de structure et ceux codant les polypeptides nécessaires à l'assemblage de la structure pilée à la surface de la bactérie (**Allen et al., 1991**).

Les souches de *K. pneumoniae* peuvent posséder au sein de leur génome plusieurs copies, plasmidique ou chromosomique, des gènes *mrk*, chacune codant des pili avec des spécificités de liaison différentes [(**Schurtz et al., 1994**) ; (**Hornick et al., 1995**)].

### 3.3. Les adhésines

Deux adhésines impliquées spécifiquement dans l'adhésion à des cellules intestinales in vitro ont été décrites :

La protéine **CF29K** : est une adhésine non-fibrillaire présente à la surface de certaines souches de *K. pneumoniae*. Elle confère une adhésion de type diffus aux cellules Caco-2 et Int-407 (**Darfeuille-Michaud et al., 1992**).

Les gènes de structure codant CF29K sont situés sur un plasmide conjugatif de haut poids moléculaire (185 Kb), portant également les gènes de résistance à de nombreux antibiotiques, en particulier ceux codant la  $\beta$ -lactamase (**Darfeuille-Michaud et al., 1992**).

La protéine **KPF-28** : est une adhésine filamenteuse de 4 à 5 nm de diamètre et de 0,5 à 2  $\mu$ m de longueur, également impliquée dans les interactions de *K. pneumoniae* avec les cellules Caco-2 (**Di Martino et al., 1996**).

L'étude de prévalence de la protéine KPF-28 chez les souches de *K. pneumoniae* responsables d'infections nosocomiales a révélé que toutes les souches exprimant cette adhésine produisaient la  $\beta$ -lactamase, suggérant que les supports génétiques de ces deux éléments étaient localisés sur un même plasmide conjugatif (**Di Martino et al., 1996**).

### 3.4. Sidérophores

La croissance des bactéries dans un tissu hôte est limitée non seulement par des mécanismes de défense de l'hôte, mais également par son approvisionnement en fer disponible. Le fer est un élément essentiel pour la croissance bactérienne, qui fonctionne principalement comme un catalyseur d'oxydo-réduction dans les protéines qui participent aux processus de l'oxygène et de transport d'électrons (**Di Martino et al., 1996**)(figure 2).

### 3.5. Le lipopolysaccharide

Le lipopolysaccharide (LPS) est un complexe glycolipidique caractéristique de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif. C'est une molécule amphipatique composée de trois régions distinctes : le lipide A, le core et l'antigène O.

Le lipide A, domaine hydrophobe conservé, forme le feuillet externe de la membrane externe. Il est responsable des propriétés endotoxiques de la molécule. Le core oligosaccharide, attaché au lipide A (formant le *core-lipid A*), est généralement coiffé par une chaîne polysaccharidique de type O (antigène O) pour former la molécule de LPS dite « lisse » (S-LPS). Il existe également des molécules *core-lipid A* dépourvues d'antigène O, ou se terminant à des sites variables dans le core sans site de liaison pour les antigènes O. Ces deux dernières formes sont appelées LPS « rugueux » (R-LPS). De plus, dans une même souche bactérienne, le *corelipid A* peut servir d'accepteur pour différents types de polymères synthétisés.

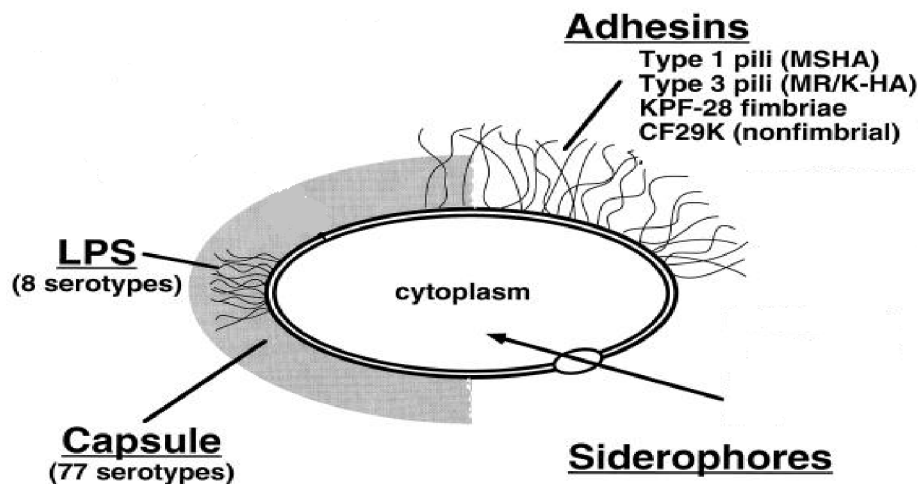
Les molécules de LPS extraites à partir de cultures bactériennes sont hétérogènes en taille car elles possèdent des chaînes O de longueurs variables, mais spécifiques d'une souche donnée, conduisant à des distributions dites « modales ». Elles s'étendent au-delà de la surface de la

bactérie pour s'organiser en une fine couche hydrophile, qui peut masquer les épitopes du core et les récepteurs des bactériophages.

La spécificité sérotypique d'un organisme résulte de la diversité des chaînes polysaccharidiques de son antigène O, qui peuvent comprendre un nombre et un type variable de monosaccharides, linéaires ou branchées, formant des homopolymères, ou, plus fréquemment, des hétéropolymères. Ainsi, ces structures présentent des épitopes qui définissent les sérotypes.

Chez *K. pneumoniae*, le sérotypage est rendu difficile par la présence de polysaccharides capsulaires masquant le LPS. C'est la raison pour laquelle seulement 8 antigènes O ont été décrits chez *K. pneumoniae*, alors qu'environ 170 ont été identifiés chez *E. coli* (Whitfield *et al.*, 1997).

Parmi les différents sérotypes décrits, O1 est le plus fréquemment retrouvé dans les isolats cliniques de *K. pneumoniae* (Alberti *et al.*, 1993; Trautmann *et al.*, 1994).



**Figure 2.** Représentation schématique des facteurs de pathogénicité *Klebsiella* (Podschun et Ullmann, 1998)

#### 4. Épidémiologie

Les bactéries du genre *Klebsiella* sont ubiquistes dans la nature et ont vraisemblablement deux habitats communs. Elles sont isolées d'une part de l'environnement, à partir d'échantillons de sol, d'eaux de surface, d'eaux usées, et de végétaux (Podschun et Ullmann, 1998), et d'autre part, à la surface des muqueuses de mammifères.

Chez l'Homme, *Klebsiella pneumoniae* est saprophyte du tube digestif et du nasopharynx. Les taux de colonisation varient selon les études : de 5 à 38 % dans les selles et de 1 à 6 % au niveau du nasopharynx et de 42 % sur les mains.

Elle est rarement isolée sur la peau, son portage à ce niveau étant transitoire **(Podschun et Ullmann, 1998)**.

En milieu hospitalier, les taux de colonisation sont considérablement plus élevés, chez les patients comme chez le personnel ; ils augmentent proportionnellement à la durée du séjour à l'hôpital.

La prise d'antibiotiques à large spectre ou de multiples antibiotiques constituent des facteurs favorisant cette colonisation **(Kumarasamy et al., 2010)**.

*K. pneumoniae* peut être isolée lors de pathologies communautaires ou nosocomiales.

Au cours des infections liées aux soins, les principaux réservoirs de transmission sont le tube digestif des patients ainsi que les mains du personnel soignant. *K pneumoniae* est alors capable de se diffuser rapidement ce qui lui permet d'être à l'origine d'épidémies nosocomiales **(Kumarasamy et al., 2010)**.

### 5. Résistances aux antibiotiques

l'exposition d'une bactérie à un antibiotique tôt ou tard conduit à l'apparition d'un mécanisme de résistance **(Alaoui et al., 1999)**.

Le phénomène de résistance bactérienne correspond à une élévation de la concentration minimale inhibitrice d'un antibiotique (la concentration la plus faible d'un antibiotique capable d'inhiber toute croissance bactérienne) vis-à-vis de la population sauvage de la même espèce bactérienne. Une souche est considérée résistante quand elle n'est plus affectée par une concentration d'antibiotique habituellement efficace **(Grenier et al., 2007)**.

*K. pneumoniae* est apparue comme un agent pathogène important au cours des dernières années et a de graves conséquences en raison des choix limités aux antibiotiques car elle devient de plus en plus résistante aux antibiotiques **(Saleem et al., 2009)**.

#### 5.1. Résistance naturelle

*K. pneumoniae* est naturellement résistante aux pénicillines (amoxicilline, ticarcilline) par production d'une beta-lactamase de classe A d'espèce (chromosomique) appelée K2, inhibée par l'acide clavulanique (exemple : *Klebsiella pneumoniae* 1189) **(Yala et al., 2001)**.

### 5.2. Résistance acquise

#### 5.2.1. Résistance aux $\beta$ -lactamases à spectre étendu

Chez *Klebsiella pneumoniae*, environ 10% des souches isolées à l'hôpital produisent une  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (**Cavallo et al., 2004**).

Dans les années 1980 a été décrite la production de  $\beta$ -lactamase (BLSE) à spectre étendu par les *Klebsiella pneumoniae*, qui est maintenant reconnue dans le monde entier (**Hyle et al., 2005**).

Il est bien établi que l'augmentation de la résistance aux antimicrobiens, y compris les  $\beta$ -lactamines, peut être attribuée à la pression de sélection exercée par l'utilisation d'antibiotiques. Le retrait d'une telle pression est fréquemment utilisé comme un moyen efficace pour l'inversion de la résistance [(**Jarvis, 1996**) ;(**Duncan ,1997**)].

#### 5.2.2. Résistance aux céphalosporines

*Klebsiella pneumoniae* acquiert une résistance aux céphalosporines de troisième génération en raison de la production de médiation plasmidique à spectre élargie  $\beta$ -lactamases (BLSE) (**Gangoue Pieboji, 2007**). De nombreuses BLSE ont été identifiées et caractérisées. Elles sont dénommées selon leur substrat préférentiel : soit le céfotaxime (CTX), soit la céftazidime (CAZ) [(**Sirot et al.,1987**) ;( **Sirot et al., 1989**)]. La première enzyme décrite chez *K. pneumoniae* a été appelée CTX-1 car elle présentait une forte activité vis-à-vis du céfotaxime.

#### 5.2.3. Résistance à la pénicillinase

Il existe une très grande variété de pénicillinase : TM, SHV, PSE.

Tous les dérivés de TM et SHV sont sensibles aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases dont fait partie l'acide clavulanique (**Sirot, 1995**), ce qui permet, par association aux  $\beta$ -lactamines, de récupérer partiellement l'activité de cet antibiotique.

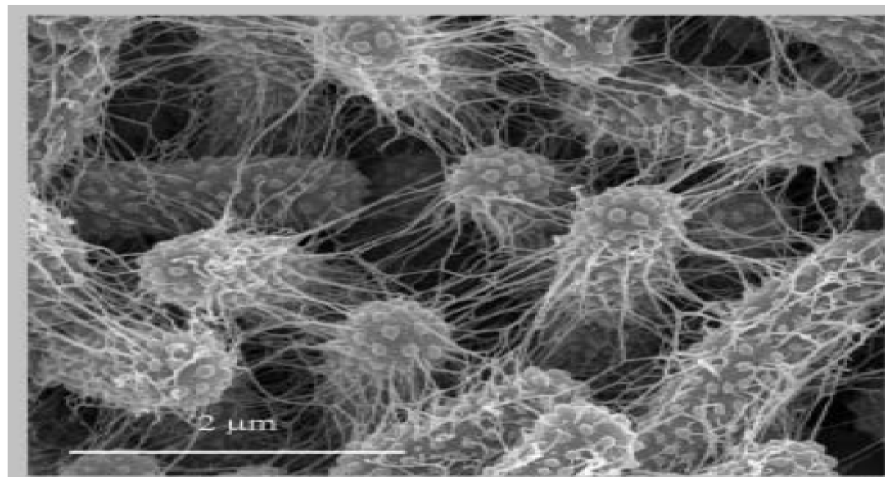
#### 5.2.4. Résistance aux ticarpènes

Néanmoins, en 1995, une  $\beta$ -lactamase induisant une résistance de haut niveau à l'association amoxicilline/acide clavulanique (AMC) a été caractérisée chez *K. pneumoniae* (**Lemozy et al., 1995**).

En raison du risque élevé de développer une résistance au cours du traitement, toutes les infections graves devraient être soigneusement surveillées pendant le traitement.

### Chapitre III. Les biofilms bactériens

Dans certaines situations (température, humidité), *Klebsiella pneumoniae* peut constituer des agrégats de biofilms notamment sur des surfaces inertes (sondes ou cathéters) (**Figure 3**).



**Figure 3.** Cliché de microscope électronique à balayage de *Klebsiella pneumoniae* au sein d'un biofilm. Grossissement : x 20 000  
(Balestrino, 2007).

#### 1. Historique

La découverte des biofilms est attribuée à l'inventeur du microscope Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723), qui observa vers 1683 avec cet appareil des communautés de micro organismes au niveau de ses dents (**Donlan, 2002**).

En 1932; **Henerici** observa des communautés bactériennes fixées sur des lames lors d'une expérience visant à observer la croissance des algues sur des lames de verre placées dans un aquarium. Il émit alors une hypothèse que la plupart des bactéries vivant dans des milieux aqueux ne sont pas sous forme planctonique, mais plutôt organisée sous forme de communauté sessile fixes a une surface [(**Henerici ,1932**) ;(**Trautner et al., 2009**)].

Le terme "*Biofilm*" a été proposé pour la première fois par (**Costerton, 1978**) et son équipe, en suggérant que ce serait le mode de vie naturel adopté par la plupart des microorganismes.

Depuis un nombre croissant d'études ont été consacrées au biofilms, aussi bien dans le domaine industriel et environnemental que dans le domaine médical. Le nombre de publications scientifiques annuelles consacrées aux biofilms est passé d'une dizaine 1996 à plus de 1200 en 2002 (**Donlan, 2008**).

### 2. Définition

Les biofilms sont des communautés hétérogènes, qui peuvent se composer d'une seule espèce de bactérie, de champignons, ou plus fréquemment peuvent être poly-microbiens (**Philips *et al.*, 2011**), qui sont englobées dans une matrice extracellulaire, fixées sur des surfaces naturelles ou artificielles (**Filloux et vallet , 2003**).

Ils se composent ainsi de deux éléments principaux : les bactéries et la matrice extracellulaire qui compose la communauté.

L'organisation, la forme, et la densité de ces assemblages ne sont pas liées au hasard, cette construction est une réponse à la variation de conditions écologiques (**Melchior *et al.*, 2006**).

### 3. Les étapes de formation d'un biofilm

#### ➤ Adhésion réversible appelée aussi étape initiale

C'est le contact entre la bactérie et le substratum mettant en jeu les forces attractives de Van Der Walls, et les forces électrostatiques répulsives (**Chmielawski et Frank, 2003**).

#### ➤ Adhésion irréversible « engagement »

Grâce à la sécrétion d'exo polymérase par les bactéries favorisant leur fixation à un support et conduisant à des fortes interactions avec des liaisons covalentes entre les bactéries et la surface, dues à la présence de flagelles, des pilis et des andésines (**Vallet *et al.*, 2001**).

#### ➤ Formation de micro colonie appelée aussi « maturation précoce »

Une fois l'attachement des bactéries irréversible, les bactéries commencent à se diviser et à former des micro- colonies (**Chmielewski et Frank, 2003**) qui vont recouvrir toute une partie de la surface (**Stanley *et al.*, 2003**).

#### ➤ Maturation du biofilm :

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

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



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

➤ **Dispersion du biofilm :**

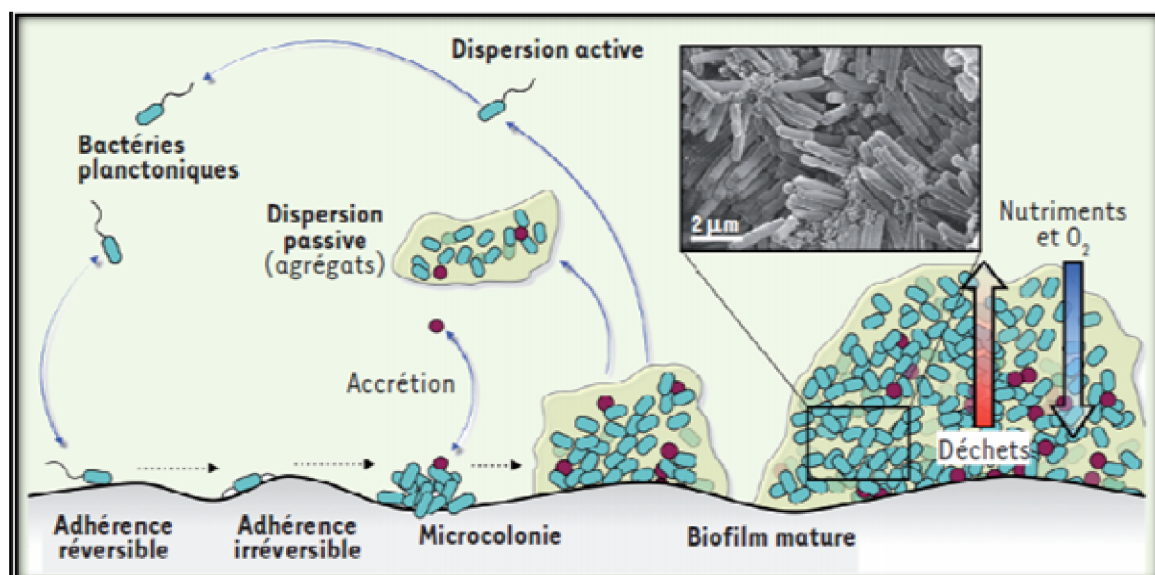
Le détachement des bactéries se fait selon trois étapes (Kaplan, 2010) :

Détachement des cellules de la colonie du biofilm.

Translocation des cellules vers un nouvel emplacement.

Fixation des cellules a un substrat dans le nouvel emplacement.

Le schéma suivant explique les différents stades formés un biofilm (Figure 4).



**Figure 4.** Représentation schématique du développement d'un biofilm bactérien (Lebeaux et Ghigo, 2012)

#### 4. Les facteurs influençant la formation du biofilm

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs : caractéristiques du substrat sur lequel les bactéries vont se fixer, forces s'exerçant dans le milieu aqueux (hydrodynamique du fluide), caractéristiques du milieu et propriétés de la surface des cellules (Donlan, 2002).



### 4.1. La surface

La rugosité et les propriétés chimiques d'une surface peuvent influencer l'attachement des bactéries et la formation d'un biofilm. La colonisation microbienne semble augmenter avec la rugosité de la surface **(Martinez, 2007)**.

En effet les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'aspérités **(Donlan, 2002)**.

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le téflon ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux. Les cellules sont capables d'outrepasser les forces répulsives que peuvent exercer sur elles le substrat, via l'action de liaisons hydrophobes **(Bendinger, 1993)**.

### 4.2. Les caractéristiques du milieu

La formation d'un biofilm nécessite des facteurs environnementaux clefs. Ces facteurs sont les suivants **[(Fletcher, 1988) ;(O'Toole, 2000) ;(Donlan, 2002); (Martinez, 2007) ;(Goller, 2008)]** : La température, pH : conditions optimales de formation de biofilms en situation de neutralité **(Martinez, 2007)**, concentration en oxygène, concentration en fer, osmolarité, présence d'ions spécifiques, sources de carbone disponibles : ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation **(Martinez, 2007)**.

La concentrations en nutriments : dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm ; ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique **(Spormann, 2008)**, concentrations en certains cations.

Les saisons: il existerait un effet saisonnier sur la formation de biofilms **(Donlan, 1994)**.

### 4.3. Propriétés des cellules

L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de fimbriae et de flagelles, et la production d'exopolysaccharides influencent l'attachement des bactéries sur une surface.

L'hydrophobicité d'une surface est importante dans l'adhésion des micro-organismes à cette dernière. Moins les matériaux sont polarisés, plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes. La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Plusieurs éléments structuraux des bactéries interviennent dans leur attachement à une surface : flagelles, fimbriae, polysaccharides...

Il peut y voir des compétitions ou des coopérations entre cellules lorsque plusieurs espèces de bactéries sont concernées. Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les fimbriae, certaines protéines semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes.

Les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles (**Donlan, 2002**).

### **5. Biofilm dans le secteur médical**

Parallèlement à la colonisation des muqueuses, l'implantation de bactéries sur des surfaces inertes représente également une source de contamination majeure pour les patients en milieu hospitalier. Ces bactéries, dites sessiles peuvent alors former des tapis microbiens désignés sous le terme de biofilms (**Costerton et al ., 1978**).

La compréhension des mécanismes de formation des biofilms présente donc un intérêt inéluctable, dans la mesure où elle permettrait de développer des stratégies curatives ou préventives afin de prévenir la multiplication et la persistance de ces pathogènes potentiels. (**Balestrino, 2006**).

### **6. Formation du biofilms sur dispositifs médicaux**

Les matériaux d'implantation sont de plus en plus utilisés dans de nombreux domaines de la médecine moderne, à des fins diagnostiques et/ou thérapeutiques (**Archibald et Gaynes, 1997**). Des biofilms peuvent se former à la surface ou à l'intérieur de dispositifs médicaux implantés dans l'organisme : lentilles de contact, cathéter veineux central, sonde endotrachéale, dispositifs intra-utérins, valves cardiaques artificielles, cathéters de dialyse péritonéale, sondes urinaires. Ainsi 82% des infections nosocomiales sont dues à la présence d'implants médicaux contaminés (**Archibald et Gaynes, 1997**).

En effet, tout matériel étranger introduit dans l'organisme est un point d'appel pour les bactéries qui adhèrent à sa surface.

#### **6.1. Le mécanisme de formation du biofilm sur une sonde urinaire**

Une fois la sonde posée, un film protéique va se déposer à sa surface et favoriser la fixation de micro organismes, et par conséquent entraîner la formation d'un biofilm.

Une fois que les bactéries ont colonisé la sonde et l'uro-épithélium, elles doivent s'adapter à l'environnement formé par le tractus urinaire et se procurer des nutriments.

La production bactérienne de toxines et d'enzymes dans l'environnement entraîne une dégradation des tissus avoisinants et une libération de nutriments (**Jacobsen *et al.*, 2008**).

Ce biofilm peut se transformer à l'intérieur de la sonde et/ou à la surface externe (**Stickler, 2008**).

La pose d'une sonde urinaire est le premier facteur responsable du développement d'une infection urinaire (**Hatt et Rather, 2008**).

En effet 10 à 50% des patients porteurs d'une sonde urinaire pendant une courte durée (7 jours) ont une infection urinaire due au développement de biofilms sur la sonde, et 100% des patients sont infectés lorsqu'ils gardent la sonde pendant une durée supérieure à 28 jours (**Stickler, 2008**).

***MATERIEL ET***  
***METHODES***

## 1. Lieu d'étude

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie Appliquée Alimentaire. Au biomédical et à l'Environnement (LAMAABE).

## 2. Prélèvements et ensemencement

Des sondes urinaires ont été prélevées chez les patients hospitalisés au niveau du service de réanimation du **CHU Tidjani DAMERDJI** de Tlemcen sur une période allant du 30/03/2014 au 20/04/2014.

Ces sondes urinaires, coupées à l'extrémité distale (3 à 5cm de longueur environ) à l'aide d'un bistouri stérile, sont ensuite mises directement dans un tube stérile et transportées au laboratoire pour être analysés.

Une fois au laboratoire, le décrochage de cellules est réalisé après un passage de tous les tubes dans un bain à ultrasons à 35°C pendant 3 min. (figure 5) ce qui permet de détacher en douceur les bactéries attachées à la surface (**Achermann et al., 2010**), sans que les structures cellulaires ne soient altérées (**Djeribi et al., 2012**). Après sonication une agitation mécanique par le vortex est nécessaire pour homogénéiser le contenu du tube.

Les microorganismes recueillis dans le liquide de sonication sont ensuite mis en culture sur un milieu de Mac Conkey pour l'isolement des *Klebsiella pneumoniae*, et ceci grâce à l'action de deux inhibiteurs, le cristal violet pour l'inhibition de la flore gram (+) et les sels biliaires pour la sélection des entérobactéries. Ce milieu ensemencé est incubé à 37°C pendant 18 à 24 heures.



**Figure 5.**Traitement aux ultrasons (photo LAMAABE)

### 3. Isolement et purification

Après incubation des milieux ensemencés, on procède à la purification des colonies bactériennes par ré-isolement sur le même milieu afin d'obtenir des souches pures à identifier.

### 4. Identification

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

L'étude des caractères macroscopiques.

L'étude des caractères microscopiques (coloration de GRAM).

L'étude des caractères biochimiques (API 20<sup>E</sup> (Biomérieux®, France).

#### 4.1 Caractères macroscopiques

L'étude des caractères visibles à l'œil nu sont : formes, taille, couleur et aspect.

#### 4.2 Caractères microscopiques (Coloration de GRAM)

La morphologie, l'arrangement des cellules, les types pariétaux des isolats sont déterminés sur des cultures jeunes par la technique de coloration de Gram (1884) après observation par microscope optique.

#### 4.3 Identification par galerie API20E

- **Principe**

La galerie (API 20<sup>E</sup> (Biomérieux®, France) est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à gram négatif, utilisant 20 tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données spécifiques. Ce système comporte 20 cupules tests qui contiennent un milieu réactionnel déshydraté

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

- **Technique**

#### Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.
- Incrire la référence de la souche sur la languette latérale de la galerie.

### **Préparation de l'inoculum**

Une colonie est prélevée sur un milieu gélosé et ensuite mise dans un tube de 5ml d'eau distillée stérile, afin d'obtenir une suspension bactérienne.

### **Inoculation de la galerie**

- Homogénéiser la suspension bactérienne.
- Pour les tests CIT, VP, GEL, remplir tubes et cupules.
- Pour les autres tests, remplir uniquement les tubes.
- Recouvrir les tests ODC, ADH, LDC, H2S, URE, avec 2 gouttes d'huile de paraffine.
- Mettre le couvercle de la galerie.
- Incuber à 35-37°C pendant 18 à 24 heures.

### **Lecture et interprétation**

L'interprétation de la galerie s'effectue après incubation, en se référant au tableau de lecture.

## **5. Antibiogramme**

### **• Principe**

L'antibiogramme permet de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne *in vitro* et de catégoriser une souche bactérienne en classes semi-quantitatives (sensible, intermédiaire, ou résistante). Il est basé sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration obtenu par la méthode de diffusion à partir de disques dans un milieu gélosé selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM, 2013).

### **• Technique**

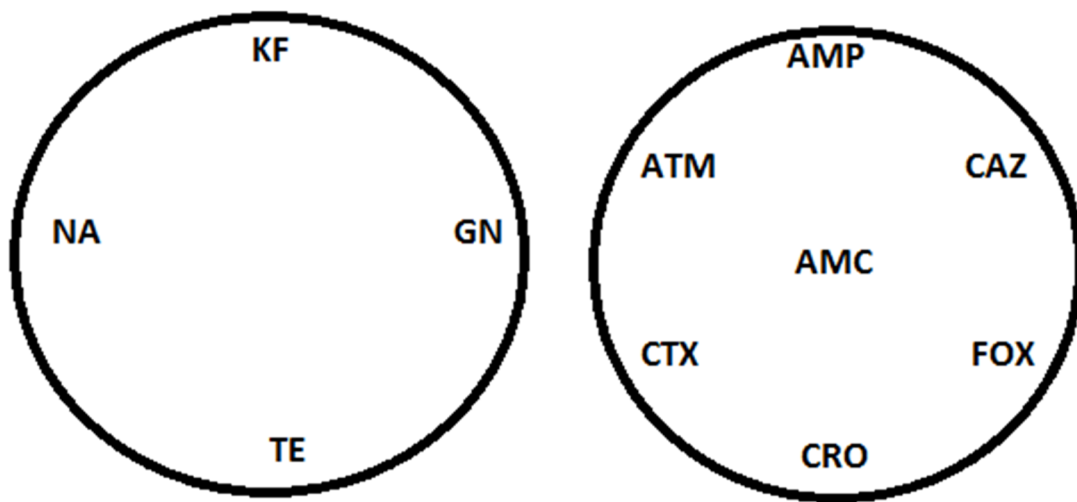
#### **Préparation de l'inoculum**

- Repiquer une colonie à partir d'une culture pure dans 5mL de bouillon BHIB
- Incuber à 37°C pendant 3 à 5 h sous agitations
- Mesurer la DO de la culture obtenue qui doit être de  $10^8$  UFC/mL soit de densité optique 0.08-0.1 à une longueur d'onde de 625nm.
- Tremper un écouvillon dans cette culture, puis le presser contre la paroi du tube pour enlever le liquide excédentaire.

- Ensemencer par écouvillonnage en respectant les mesures de sécurité nécessaires, les boîtes de pétri préalablement coulées par 20mL de Mueller Hinton ;
- Appliquer les disques d'antibiotiques sur les boîtes de Pétri dès que possible à moins de 15 minutes après l'ensemencement à l'aide d'une pince stérile (**figure 6**).
- Incuber les boîtes à 35°C pendant 24 heures.

Les antibiotiques utilisés sont les suivants :

Tétracycline (TE), Amoxicilline /Acide Clavulanique (AMC), Céfalotine (KF), Céfotaxime (CAZ), Gentamycine (GN), Acide nalidixique (NA), Ampecilline (AMP), Aztreonam (ATM), Ofloxacine (OFX), Cefotaxine (CTX) et Ceftriaxone (CRO).



**Figure 6.** Dispositions des disques d'antibiotiques

- **Lecture**

Après 24 heures d'incubation, les diamètres d'inhibition sont mesurés et on se réfère aux valeurs critiques (**Annexe 1**) qui permettent de définir si la souche est sensible (S), résistante (R), ou intermédiaire (I).

- 1- Les souches catégorisées **S** sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutiques est forte.
- 2- Les souches catégorisées **R** sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique.
- 3- Les souches catégorisées **I** sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible.

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (**CASFM, 2013**).



## 6. Evaluation de la formation du biofilm par la méthode de plaque de culture de tissus (TCP)

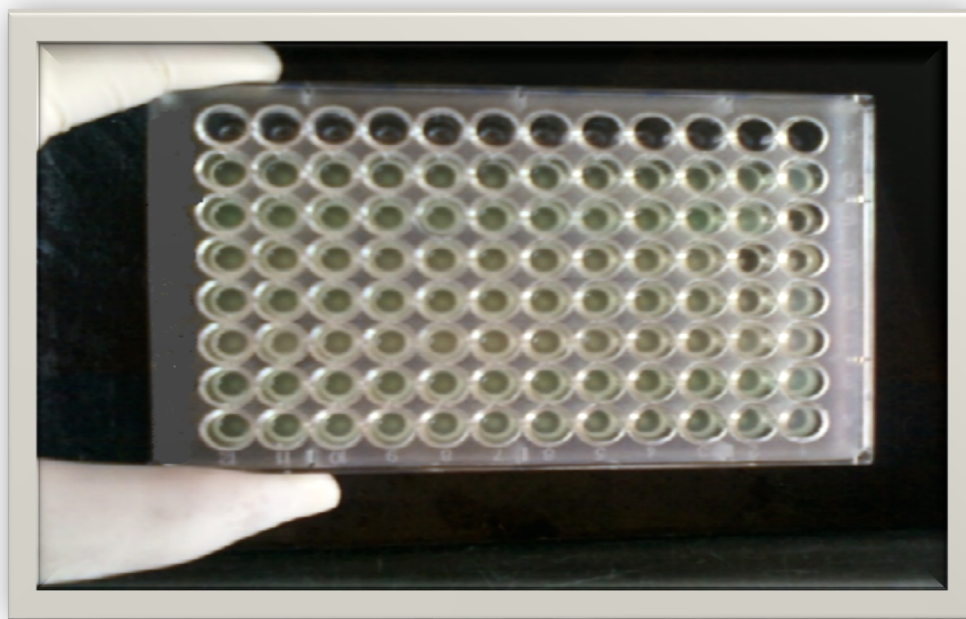
Le test TCP décrit par **Christensen *et al.*,(1985)** permet une évaluation semi quantitative de la formation du biofilm.

- **Technique (technique modifié)**

A partir d'une boîte de culture de 24h, une colonie estensemencée dans 10mL de bouillon BHIB puis incubée à 37°C pendant 18h.

On effectue une dilution au 1/100 avec du milieu frais (BHIB) et on remplit les puits d'une plaque de 96 puits avec 0.2mL de cette dilution ainsi que de 0.2 mL de bouillon de culture (BHIB) qui servira de témoin stérile.

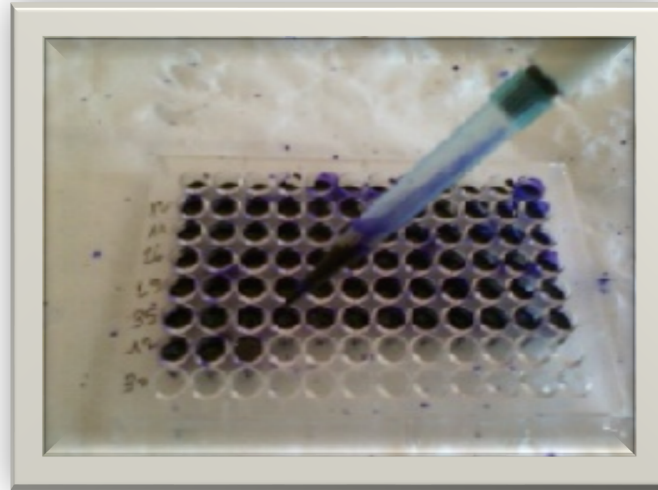
Les microplaques sont ensuite incubées pendant 18 heures à 37 ° C. Une fois que le contenu de chaque puits soit enlevé délicatement en tapotant la plaque, les puits sont lavés quatre fois avec 0,2 mL de tampon phosphate salin (PBS pH 7,2) afin d'éliminer les bactéries libres flottant (planctoniques). Les biofilms formés par l'adhérence des organismes sessiles dans la plaque sont colorés avec du cristal violet (0,1% p / v) pendant 20min. L'excès de colorant est ensuite rincé par un lavage en profondeur avec de l'eau distillée et les plaques sont laissées pour le séchage afin d'évaluer l'importance de la coloration du biofilm (**Stepanovic *et al.*, 2000**).(Figure 7)



**Figure 7.** Technique de formation de biofilm sur microplaque de titration ( photo personnelle).

- **Lecture**

Les puits sont remplis d'éthanol et le passage par le lecteur ELISA est nécessaire pour donner directement la DO de chaque puits par rapport au témoin. **(Figure 8).**



**Figure 8.** Remplissage des puits par l'éthanol **(photo personnelle)**

La formation de biofilm est considérée comme positive lorsqu'il y a formation d'un film le fond du tube. La lecture de la capacité des souches testées à former le biofilm sur microplaque se fait par comparaison de la DO de témoin avec celles des souches **(Hola et Ruzicka, 2011).**

Les souches sont classées dans les catégories suivantes **(Stepanovic et al. 2000).**

$DO_i \leq 2DO_t$  non-formatrice du biofilm

$2DO_t \leq DO_i \leq 4DO_t$  modérément formatrice du biofilm

$DO_i \geq 4DO_t$  fortement formatrice du biofilm **(Christensen et al., 1985).**

(DO : densité optique,  $DO_i$  : densité optique initiale,  $DO_t$  : densité optique témoin).

## **7. La cinétique de la formation du biofilm sur sonde urinaire**

Le protocole utilisé est celui décrit par **Abraham et al. (2012)**, les bactéries ont été cultivées en milieu BHIB et incubées pendant 24h à 37°C.

Chaque culture a été ajustée à une DO de 0,1 à 620 nm

Une sonde urinaire stérile de type Foley a été découpé en 8 disques de 1 cm d'épaisseur.

Un disque a été introduit dans chaque tube et incubé à 37°C pendant différentes durées (de 18h à 7 jours).

Après incubation, les tubes sont retirés, puis lavés 2 fois avec de l'eau physiologique. Un ajout de 2ml est opéré dans chaque tube du cristal violet. Un passage dans un bain à ultrasons à 35°C pendant 3 min est effectué.

La lecture de la DO sera ensuite suivie à 18h et toutes les 24h sur une période de 7jours.

***RESULTATS***  
***ET DISCUSSION***

## 1. Résultats des prélèvements

32 sondes urinaires ont été prélevées chez 32 patients hospitalisés plus de 48h au service de réanimation du CHU de Tlemcen (**Figure 9**). Un total de 8 souches de *Klebsiella pneumoniae*, ont été collectés par isolement sur milieu Mac Conkey.



**Figure 9:** photographie de deux sondes différentes (**photo personnelle**)

**A** : présence de pus sur la sonde urinaire

**B** : présence de croute sur la sonde urinaire

La relation entre dispositifs médicaux (DM) et infection nosocomiale n'est pas nouvelle, mais s'est totalement imposée ces dernières années. Le sondage des voies urinaires est un facteur majeur, qui prédispose l'hôte à des infections associées à la sonde urinaire (**Djeribi et al., 2012**). En effet tous les patients étudiés étaient hospitalisés plus de 48h et sondés plus de 7 jours, ce qui favoriserait l'IUN chez tous ces patients.

Les infections des voies urinaires représentent les infections nosocomiales les plus fréquentes (**Tambyah, 2004 ; Tielen et al., 2011**). Elles constituent un problème de santé grave touchant des millions de personnes chaque année (**Mittal et al., 2009**). Ces infections représentent 40% des infections nosocomiales selon **Mittal et al., 2009**.

L'étude faite par **Hassaine** en **2008** a été la première étude effectuée au niveau du CHU de Tlemcen. Cette dernière a démontré que les infections urinaires représentent 42.37% de l'ensemble des infections nosocomiales dans le CHU de Tlemcen, dont 61.11% sont dues à la présence d'une sonde urinaire.

De même, l'étude d'**Amazian et al** en **2010** a montré que les infections urinaires nosocomiales sont très fréquentes dans le bassin méditerranéen.

## **1. Identification des souches de *Klebsiella pneumoniae***

Les méthodes d'identification de *Klebsiella pneumoniae* sont la croissance sur milieu gélosé de Mac Conkey, la coloration de Gram, et l'identification biochimique par galerie API20E.

### **2.1. Aspect macroscopique**

*K. pneumoniae* présente tous les caractères généraux des entérobactéries. C'est une bactérie aéro-anaérobie facultative, qui cultive sur milieux usuels non-enrichis.

Après 18-24 heures à 37°C, elle forme des colonies arrondies, muqueuses, généralement bombées et brillantes sur gélose Mac Conkey. Deux morphotypes ont été observé (**Figure 10**)

**Morphotype 1** : grosses colonies muqueuses, lactose positif, ayant un aspect de goutte de miel, avec une tendance à la confluence, dis "en goutte de miel".

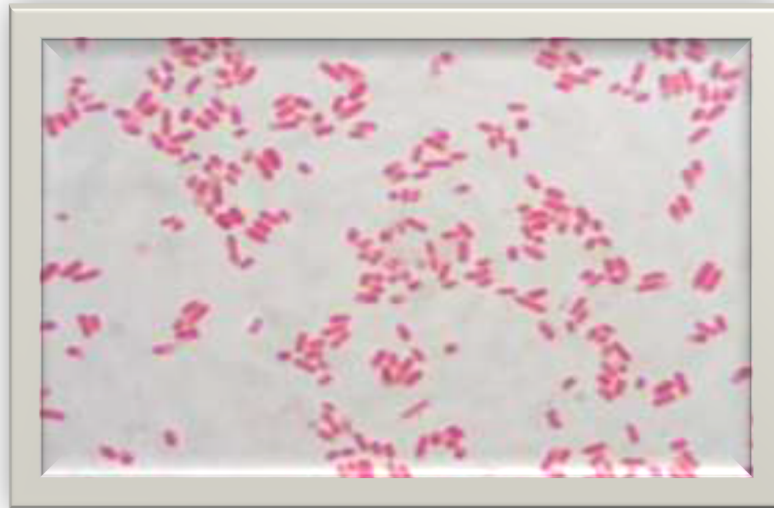
**Morphotype 2** : colonies muqueuses, lactose positif, épaisses, opaques, bombées, de consistance visqueuse et confluyente.



**Figure 10:** Les deux morphotypes de *Klebsiella pneumoniae* sur le milieu Mac Conkey (photo personnelle).

### 1.2.Aspect microscopique

Toutes les souches isolées sont des bacilles à Gram négatif (**Figure 11**), toujours immobile, donnant un aspect muqueux, assez typique qui apparaissent sous forme de bâtonnets rose au microscope.



**Figure 11:** Examen microscopique après coloration de Gram (**photo personnelle**).

### 2.3. Caractères biochimiques

- **Identification par galerie Api 20 E**

L'identification bactérienne a été réalisée par la galerie Api 20 E permettant de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques des souches *Klebsiella pneumoniae*.

Et nous a permis de caractériser quatre profils numériques différents: 1215773, 5214773 (VP -), 1214773 (VP-LDC -), 5215773 (**Figure 12**).





**Figure 12:** Identification de *Klebsiella pneumoniae* (galerie API20 E)  
(Photo personnelle)

La colonisation par *K. pneumoniae* semble élevée dans la plupart des pays en développement témoignant d'une forte contamination de l'environnement hospitalier par cette bactérie et de la carence des mesures permettant de limiter sa transmission (**Ben Jaballah et al., 2006**). D'après une étude effectuée par **Kumarasamy et al., (2010)**, le taux de portage augmente de 11 à 42% en 7 jours d'hospitalisation.

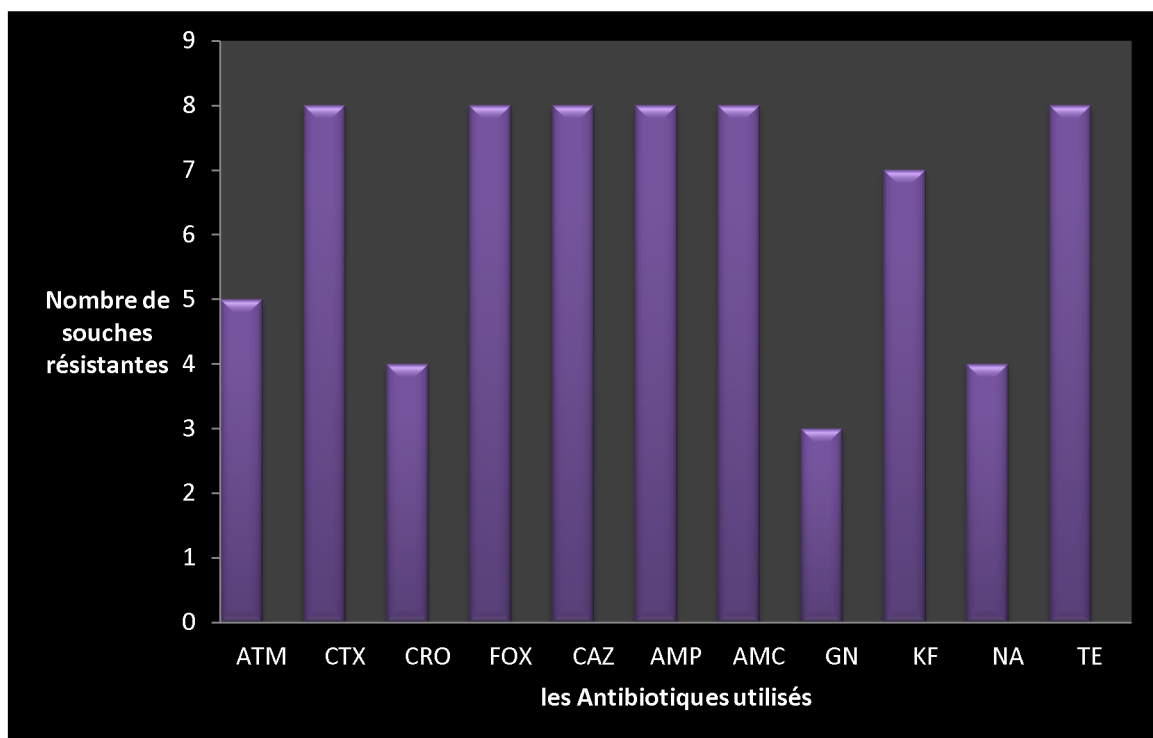


En Europe comme aux Etats Unis, environ 8% des infections nosocomiales sur dispositifs médicaux sont dues à cette espèce. En France, le rapport de l'ONERBA (Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques) de 2008 indique que *K. pneumoniae* est responsable respectivement de 4,8% et 4,5% des bactériémies communautaires et nosocomiales.

### 3. Résistance aux antibiotiques

L'évaluation de la sensibilité des antibiotiques à l'hôpital est une phase primordiale, elle oriente le choix des traitements. *Klebsiella pneumoniae* est naturellement résistante aux pénicillines (Amoxicilline, Ticarcilline) par production d'une  $\beta$ -lactamase (Sougakoff et Trystram, 2003).

Un antibiogramme a été réalisé sur la totalité des souches. Leurs phénotypes de résistance vis-à-vis chaque antibiotique sont et représentées dans la figure ci dessous.



**Figure 13** : Evaluation de la résistance des souches *Klebsiella pneumoniae* vis-à-vis des antibiotiques (Photo personnelle).

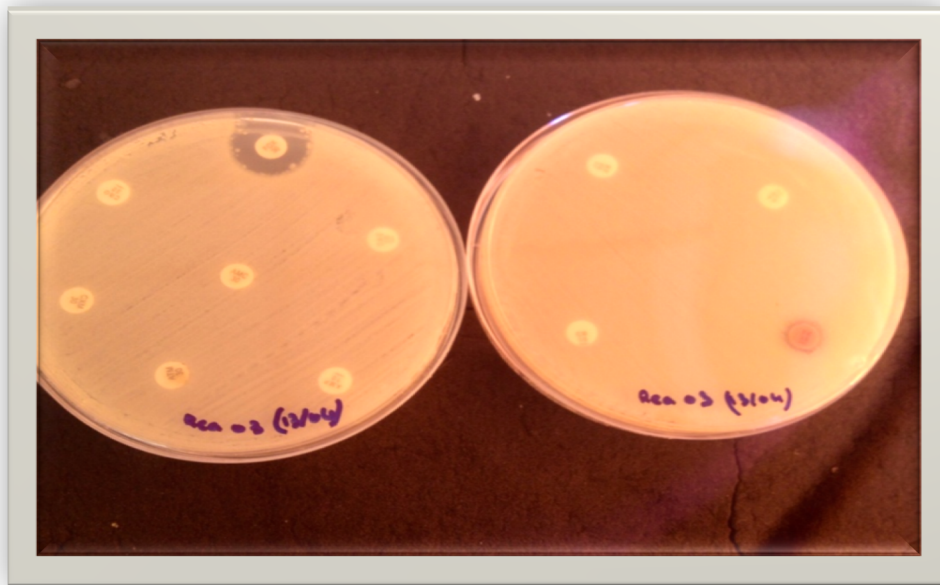
Les 8 souches révèlent des taux de résistance très élevés pour l'ampicilline.

Pour la famille des monobactames ces souches représentés une résistance très variée.

7 souches résistaient à la cefotaxime, la ceftazidime, la céfalotine sauf 4 souches qui sont résistantes à l'aztréoname, ceftriaxone.

3 souches on représenté une résistance aux aminosides.

Les 8 souches de *K.pneumoniae* étaient également résistante à l'ofloxacine, sauf 4 d'entre elles étaient résistantes à l'acide nalidixique (**figure 14**).



**Figure 14:** Image montrant l'effet des disques d'antibiotiques sur suspension de *Klebsiella pneumoniae* (Photo personnelle).

Toutes les souches résistantes sont isolées de service de réanimation, ceci est lié à la grande fréquence de prescription d'antibiotiques pour traiter des infections hospitalières motivant le transfert en réanimation (**Brun-Buisson, 2005**).

#### 4. Evaluation de la formation du biofilm

Les 08 souches cliniques *Klebsiella pneumoniae* isolées durant notre étude ont été testées pour leurs capacités à former des biofilms par la méthode de Plaque de Culture de Tissus (TCP) (figure 15).



Figure 15 : Résultat de la formation de biofilm par la méthode de TCP (photo personnelle).

Cette technique a montré que 4 souches sont fortement formatrices de biofilm 4 dont la DO est 4fois plus élevée que celle de la DO témoin, 4 sont modérément formatrice de biofilm  $2DO_i \leq DO \leq 4DO_i$  (figure 16).

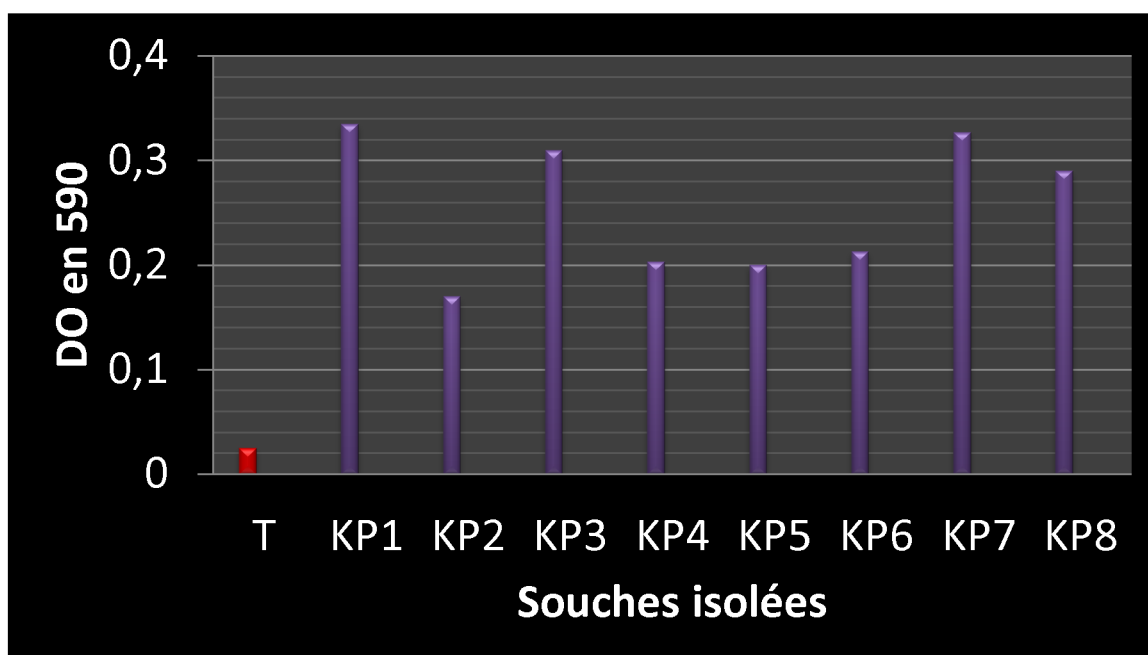
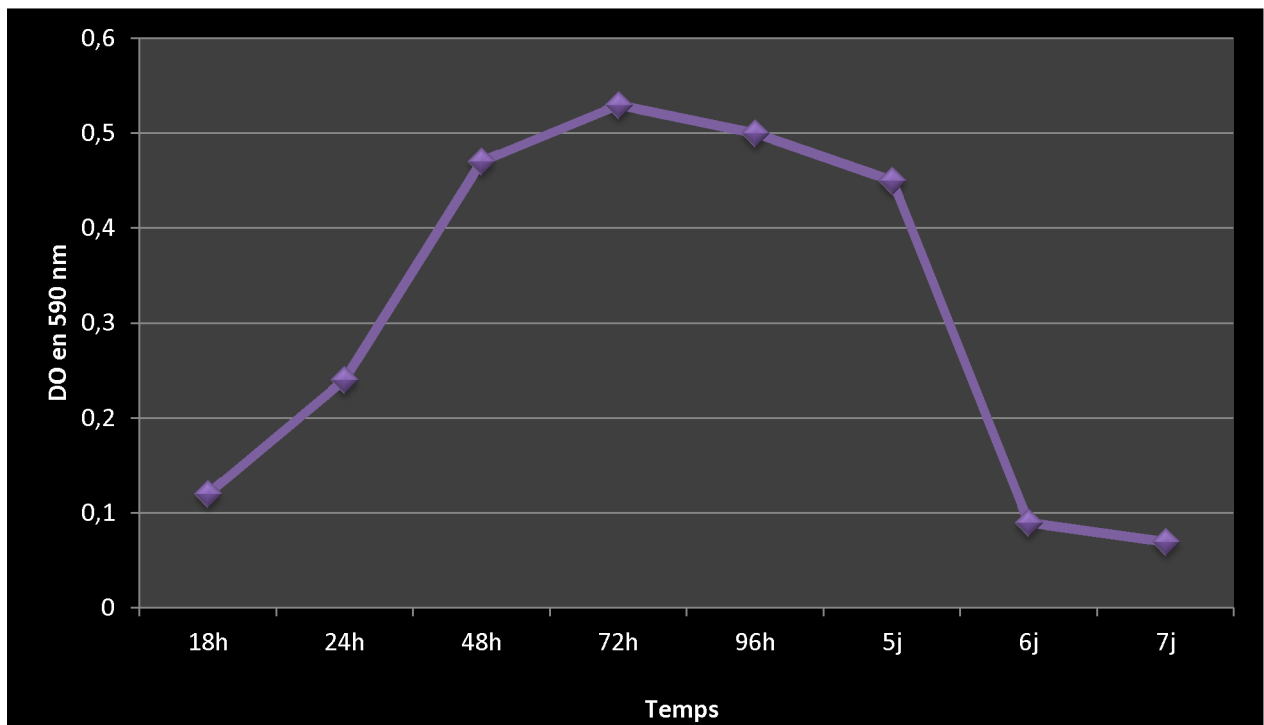


Figure 16 : Evaluation de la formation de biofilm par la méthode de TCP (Photo personnelle).

Nos résultats concordent avec l'étude de **Bellifa *et al.*, 2013** où plus que la moitié des souches de *klebsiella pneumoniae* isolées des sondes urinaires ont été des bonnes formatrices de biofilm.

## 5. Cinétique d'adhésion

La cinétique d'adhésion a été réalisée pour la souche Kp3 très bonne formatrice de biofilm. Les différentes étapes de formation de biofilm *in vitro* de cette souche de *K.pneumoniae* choisie sur une sonde urinaire stérile sont représentées dans la **figure 17**.



**Figure 17** : Cinétique de la formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae* sur sonde urinaire *in vitro* (suivie de la densité optique en fonction du temps) (**Photo personnelle**).

L'étude de cette cinétique d'adhésion montre clairement les différentes étapes de la formation de biofilm.

*Klebsiella pneumoniae* a la capacité d'adhérer à une surface inerte telle que la sonde urinaire et de former un biofilm dans moins de 24H.

La **figure17**, présente les valeurs de la DO et résume les étapes de la formation de biofilm de la souche de *K.pneumoniae* choisie.

Dans les premières heures (18h), l'adhésion était lente ce qui peut correspondre à l'adhésion initiale de la souche avec une entrée en contact avec la surface (DO=0.12).

Le nombre des bactéries associées à la surface augmente et l'adhésion devient irréversible **(Roux et Chigo, 2006)**.

Dans notre cas, la DO augmente et atteint une  $DO=0,53$ . Le pic d'adhésion se situe vers la 72<sup>ème</sup> heure d'incubation. Cette étape correspond à la maturation du biofilm.

La seconde période (à partir de la 96h) correspond à la dispersion du biofilm.

# ***CONCLUSION***

---

Notre travail a permis de montrer que *K. pneumoniae*, souche clinique, isolée des sondes urinaires du service de réanimation du C.H.U de Tlemcen est responsable de la contamination chez le ¼ des patients étudiés hospitalisés plus de 48h et sondés pendant une période de 7jours. Toutes ces souches on présenté des résistances importantes vis-à-vis de plusieurs antibiotiques, très souvent utilisés dans ce service. Toutes les souches isolées ont une capacité à produire le slime (biofilm) qui est la cause la plus fréquente des infections urinaires nosocomiales chez les patients sondés. Nos résultats confirment que la formation du biofilm sur sonde urinaire se forme dès la 24ème heure et que sa dispersion se fait au bout de la 72ème heure, et donc peut être responsable d'INS. D'où la nécessité d'établir des programmes de surveillance rigoureux qui devraient être proposés à tous les établissements de soins, avec des instructions précises et standardisées pour le recueil des cas d'infections et du nombre de jours d'exposition, la formation de biofilm sur sonde étant liée à la durée de présence de cet implant dans l'organisme. De même la pose de l'implant doit se faire dans des conditions d'hygiène strictes afin d'éviter au maximum toute contamination bactérienne. La connaissance et la mesure des facteurs intervenant dans la propagation de ces infections et leur incidence sont indispensables et peuvent permettre de mettre en place stratégies curatives ou préventives.

La connaissance et la mesure des facteurs intervenant dans la propagation de ces infections et leur incidence sont indispensables et peuvent permettre de mettre en place de mesures préventives telles qu'un renouvellement régulier des sondes urinaires, l'application stricte des règles d'asepsie et d'hygiène et le bon choix des biomatériaux.

***REFERENCES***

***BIBLIOGRAPHIQUES***



## Références bibliographiques

---

1. **Abraham N.M., et Jefferson K.K. (2012).**Staphylococcus aureus facteur d'agglutination B médie la formation de biofilm en l'absence de calcium.*Microbiology* , 158 (Pt 6), 1504-1512.
2. **Achermann Y., Vogt M., Leunig M. (2010).**Improved Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection by Multiplex PCR of Sonication Fluid from Removed Implants, *Journal Of Clinical Microbiology*, 48 (4) : 1208–1214.
3. **Alaoui A.S., Zouhdi M.,Benouda A.,Bourjouane M., Alaoui M.A. (1999).** Infections nosocomiale (à propos d'une enquête bactériologique effectuée en milieu hospitalier privé).*Biologie infectiologie*. Tome V : N°1.
4. **Alberti S., Hernandez-Alles S., Gil J., Reina J., Martinez-Beltran J., Camprubi S.,Tomas J.M., Benedi V.J. (1993).** Development of an enzyme-linked immunosorbent assay method for typing and quantitation of *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide: application to serotype J *Clin Microbiol.* 31:1379-81.
5. **Albertí S., Marqués G., Camprubi S., Merino S., Tomás J.M., Vivanco F., Benedí V.J.C. (1993).**1q binding and activation of the complement classical pathway by *Klebsiella pneumoniae* outer membrane proteins. *Infect Immun.*;61:852–860.
6. **Amako K., Meno Y., Takade A. (1988).** Fine structures of the capsules of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* K1. *J Bacteriol.*; 170:4960–4962.
7. **Amazian K., Rossello J., Castella A. (2010).** Prévalence des infections nosocomiales dans 27 hôpitaux de la région méditerranéenne, *Eastern Mediterranean Health Journal*, 16 (10): 1070-1078.
8. **Archibald L.K., Gaynes R.P. (1997).** Hospital acquired infections in the United States: The importance of interhospital comparisons. *Nosocomial Inf.* 11: 245-255.
9. **Babu J.P., Abraham S.N., Dabbous M.K., Beachey E.H. (1986).** Interaction of a 60-Kilodalton d-mannose-containing salivary glycoprotein with type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Infect Immun.*54:104–108.

## Références bibliographiques

---

10. **Balestrino D. (2006).** formation de biofilm par *Klebsiella Pneumoniae* : facteur impliqués et rôle du quorum-sensing. *thèse de doctorat : université d'auvergne* 5P.
11. **Bellifa S., Hassaine H., Balestrino D., Charbonnel N., M'hamedi I., Terki I. K., Forestier C. (2013).** Evaluation of biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical devices at the University Hospital of Tlemcen, Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, 7(49), 5558-5564.
12. **Beloin C., Valle J., Latour-Lambert P., Faure P., Kzreminski M., Balestrino D., Haagensen J.A., Molin S., Prensier G., Arbeille B., Ghigo J.M. (2004).** Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol Microbiol.* 51:659-74.
13. **Ben Jaballah N., Bouziri A., Kchaou W., Hamdi A., Mnif K., Belhadj S., et Kazdaghli K. (2006).** Epidémiologie des infections bactériennes nosocomiales dans une unité de réanimation néonatale et pédiatrique tunisienne. *Médecine et maladies infectieuses*, 36(7), 379-385.
14. **Bendinger B., Rijnaarts H.H., Altendorf K., Zehnder A.J. (1993).** Physicochemical Cell Surface and Adhesive Properties of Coryneform Bacteria Related to the Presence and Chain Length of Mycolic Acids. *Appl Environ Microbiol.* 59:3973-3977.
15. **Brun-Buisson C., Fartoukh M., Lechapt E., Honoré S., Zahar J.R., Cerf C., Maitre B. (2005).** Contribution of blinded, protected quantitative specimens to the diagnostic and therapeutic management of ventilator-associated pneumonia. *CHEST Journal*, 128(2), 533-544.
16. **CASFM. (2013).** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. <http://www.sfm.asso.fr/>.
17. **Cavallo J.D., Fabre R., Jehl F., Garrabé E. (2004).** Betalactamines. *EMC-Maladies infectieuses.* 1 :129-202.
18. **Cazenave A. (2007).** Infection urinaire et prothèse articulaire. *Cour de l'institut Calot.France* :1-10.
19. **Chmielewski R.A.N et Frank J.F. (2003).** Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(1), 22-32.

## Références bibliographiques

---

20. **Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.A., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M. (1985).** Adherence of coagulase negative Staphylococci to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 22:996–1006.
21. **Clutterbuck A.L., Woods E.J. (2007).** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol.*, Mar 31; **121** (1-2): 1-17.
22. **Coloby P. (2007).** Différents types de sondes urinaires et risques infectieux. Forum du Comité d'Infectiologie de l'AFU. 101ème congrès d'urologie de l'association française d'urologie. 5-7. [www.urofrance.net](http://www.urofrance.net)
23. **Costerton J.W. (1999).** Introduction to Biofilm. *International Jjournal of Antimicrobiol Agents.* 11:217-721.
24. **Costerton J.W., et Stewart P.S. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, **284**: 1318-1322.
25. **Costerton J.W., Geesey G.G., Cheng K.J. (1978).** How bacteria stick. *Sci Am.* 238:86-95.
26. **Cryz S.J., Fürer E., Germanier R. (1984).** Experimental *Klebsiella pneumoniae* burn wound sepsis: role of capsular polysaccharide. *Infect Immun.* 1984;43:440–441
27. **Darfeuille-Michaud A., Jallat C., Aubel D., Sirot D., Rich C., Sirot J., Joly B. (1992).** R-plasmid-encoded adhesive factor in *Klebsiella pneumoniae* strains responsible for human nosocomial infections. *Infect Immun.* 60:44-55.
28. **Davey M.E et O'toole G. (2000).** Microbial biofilm from ecology to molecular Genetics. *Microbial MolBiol* 59:1181-6.
29. **Di Martino P., Livrelli V., Sirot D., Joly B., Darfeuille-Michaud A. (1996).** A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect Immun.* 64:2266-73.
30. **Djeribi R., Bouchloukh W., Jouenne T., Mena B. (2012).** Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters, *American Journal of Infection Control*, **40**, 854-859.

## Références bibliographiques

---

31. **Domenico P., Johanson W.G., Straus D.C. (1982).** Lobar *pneumonia* in rats produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.* 37:327–335.
32. **Donlan R.M., Pipes W.O., Yohe T.L. (1994).** Biofilm formation on castiron substrata in water distribution systems. *Water. Res.*, 28: 1497-1503.
33. **Donlan R.M. (2002).** Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8 (9), 881-890.
34. **Donlan R.M. (2008).** Biofilms on central venous catheters: is eradication possible *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322: 133-161.
35. **Duncan R.A. (1997).** Contrôle de l'utilisation des agents antimicrobiens *Infecter contrôle Hosp Epidemiol*, 18 pp 260-266.
36. **Edwards P.R., Ewing W.H. (1986).** Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae. *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae*, (Edition 4).
37. **Filloux A., Vallet I. (2003).** Biofilm mise en place et organisation d'une communauté bactérienne, *Medecine/Sciences* 19. 77-83.
38. **Fletcher M. (1988).** Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium- substratum separation distance. *J. Bacteriol.*, 170: 2027-2030.
39. **Freney J., Renaud F. (2000).** Précis de bactériologie médicale. *Alexandre Lacassagne.* 2000.
40. **Gangoue Pieboji J. (2007).** Caractérisation des beta-lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales. *Thèse doctorat : université de liège centre d'ingénierie des protéines.* 127p.
41. **Giampapa C.S., Abraham S.N., Chiang T.M., Beachey E.H. (1988).** Isolation and characterization of a receptor for type 1 fimbriae of *Escherichia coli* from guinea pig erythrocytes. *J Biol Chem.* 263:5362-7.
42. **Goller C.C., Romeo T. (2008).** Environmental influences on biofilm development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322: 37- 66.

## Références bibliographiques

---

43. **Gower P.E., Taylor P.W., Koutsaimanis K.G., Roberts A.P. (1972).** Serum bactericidal activity in patients with upper and lower urinary tract infections. *Clin Sci.* 43:13–22.
44. **Grenier D., Bidault P., Chandad F. (2007).** Risques de résistance bactérienne liée à l'antibiothérapie systémique en parodontie. *Pratique cliniques.* Vol : 73, N°8.
45. **Haffner F. (2008).** Les infections urinaires récidivantes. Article publié dans *la Lettre du Spina Bifida.* No. 109 : 1-8.
46. **Hassaine H. (2008).** Ecologie et lutte contre l'infection hospitalière : thèse Doctorat d'état en Biologie Moléculaire et Cellulaire option Microbiologie. *Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, 160p.*
47. **Hatt J.K., Rather P.N. (2008).** Role of bacterial biofilms in urinary tract infections. *Curr Top Microbiol Immunol*, **322**: 163- 192.
48. **Henrici A.T. (1932).** Studies of freshwater bacteria: I.A direct microscopic technique. *Journal of bacteriology*, 25(3), 277.
49. **Highsmith A.K., Jarvis W.R. (1985).** *Klebsiella pneumoniae*: selected virulence factors that contribute to pathogenicity. *Infect Control*;6:75–77.
50. **Hola V., et Ruzicka F. (2011).** The Formation of Poly-Microbial Biofilm on Urinary Catheters, *Urinary Tract Infections*, 153- 172.
51. **Hornick D.B., Thommandru J., Smits W., Clegg S. (1995).** Adherence properties of an mrkD-negative mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.* 63:2026-32.
52. **Hyle E.P., Lipworth A.D., Zaoutis T.E., Nachamkin I., Fishman N.O., Filou W.B. (2005).** Les facteurs de risque pour augmenter la multirésistance parmi spectre étendu des bêta-lactamases produisant *Escherichia coli* et *Klebsiella* espèces *Clin Infect Dis*, 40 pp 1317-1324.
53. **Illiaquer M. (2010).** Epidémiologie et caractérisation moléculaire de souche cliniques de *klebsiella pneumonia* résistantes aux céphalosporines de 3ème génération, hors BLSE, isolé entre 2007 et 2009, C.H.U. de Nantes.

## Références bibliographiques

---

54. **Jacobsen S.M., Stickler D.J., Mobley H.L.T. (2008).** Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin. Microbiol. Rev.*, (21) 1:26-59.
55. **Jarvis W.R. (1996).** Prévenir l'apparition de micro-organismes multirésistants par l'utilisation d'antimicrobiens contrôlé: *la complexité du problème Infecter contrôle Hosp Epidemiol*, 17 pp 490-495
56. **Jones G.W., Isaacson R.E. (1983).** Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. *Crit Rev Microbiol.* 1983; 10:229–260.
57. **Kaplan J.B. (2010).** Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses, *Journal of Dental Research*, 89 (3): 205-215.
58. **Kumarasamy K.K., Toleman M.A., Walsh T.R., Bagaria J., Butt F., Balakrishnan R., Chaudhary U., Doumith M., Giske C.G., Irfan S., Krishnan P., Kumar A.V., Maharjan S., Mushtaq S., Noorie T., Paterson D.L., Pearson A., Perry C., Pike R., Rao B., Ray U., Sarma J. B., Sharma M., Sheridan E., Thirunarayan M.A., Turton J., Upadhyay S., Warner M., Welfare W., Livermore D.M., Woodford N.(2010).** Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 10(9), 597-602.
59. **Lebeaux D., Chigo J.M.(2012).** Infections associées aux biofilm Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale, *médecine/sciences*, 28 : 727-739.
60. **Lemozy J., Sirot D., Chanal C., Huc C., Labia R., Dabernat H., Sirot J. (1995).** First characterization of inhibitor-resistant TEM (IRT) beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 39:2580-2.
61. **Maki D.G et Tambyah P.A.(2001).** Engineering out the Risk of Infection with Urinary Catheters. *Emerging Infectious Disease.* Vol.7, No.2: 1-6.
62. **Martinez L.R., Casadevall A. (2007).** *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. *Applied and Environmental Microbiology*, 4592- 4601.

## Références bibliographiques

---

63. **Melchiour M.B., Vaarkams H., Fink-Gremmels J. (2006).** Biofilmd :Arol in recurent mastis infection,*The veterinary journal*, 171, 398-407.
64. **Mittal R., Aggarwal S., Sharma S. (2009).** Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*,*Journal of Infection and Public Health*, 2: 101—111.
65. **Newman D. K. (2007).** The Indwelling Urinary Catheter: Principles for Best Practice. *J Wound Ostomy Continence Nurs*, 34(6):655-661. Published by Lippincott Williams et Wilkins.
66. **Ofek I., Mirelman D., et Sharon N. (1977).** Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature*. 265:623-5.
67. **Ofek I., et Doyle R. J. (1994).** *Bacterial adhesion to cells and tissues* (pp. 1-578). New York: Chapman et Hall.
68. **Old D.C., Tavendale A., Senior B.W. (1985).** A comparative study of the type-3 fimbriae of *Klebsiella* species. *J Med Microbiol*. 20:203–214.
69. **Pariente J.L., Conort P. (2005).** Biomatériaux utilisés au contact de la voie excrétrice pour le drainage des urines : sondes et endoprothèse urétérales, Biomatériaux et Génie tissulaire en urologie, Partie B, *Chapitre II. Rapport du 99ème congrès français d’urologie, Progrès en Urologie*. 15 : 897-906.
70. **Philips P.L., Wolcott R.D., Fletcher J., Schultz G.S. (2011).** Biofilms made easy, *wound international*, 1(3).
71. **Podschun R., Heineken P., Sonntag H.G. (1987).** Hemagglutinins and adherence properties to HeLa and Intestine 407 cells of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolates. *Zentbl Bacteriol Mikrobiol Hyg Ser A*.263:585–593.
72. **Podschun R., Ullmann U. (1992).** *Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum. *J Med Microbiol*;36:250–254
73. **Podschun R., Ullmann U. (1993).** Bacteriocin typing of environmental *Klebsiella* isolates. *Zentbl Hyg Umweltmed*; 195:22–26.

## Références bibliographiques

---

74. **Podschun R., et U. Ullmann U. (1998).** *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 11:589-603.
75. **Pratt L.A., et Kolter R. (1998).** Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol.* 30:285-93.1.
76. **Przondo-Hessek A., Pulverer G. (1983).** Hemagglutinins of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. *Zentbl Bakteriol Mikrobiol Hyg Ser A.* 255:472–478.
77. **Rediske AM, Rapoport N., Pitt GT (1999).** Réduire la résistance des bactéries aux antibiotiques avec des ultrasons. *Lettres en microbiologie appliquée*, 28 (1), 81-84.
78. **Reinhardt H.H., Obedeanu N., Sobel J.D. (1990).** Quantitation of Tamm-Horsfall protein binding to uropathogenic *Escherichia coli* and lectins. *J Infect Dis.* 162:1335–1340.
79. **Ren D., Bedzyk L.A., Thomas S.M., Ye R.W., Wood T.K. (2004a).** Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64:515-24.
80. **Réseau d'Alerte d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN).** Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales 2001 – Résultats. *Editions InVS*, 2003, 84 p.
81. **Roux A., Chigo J.M. (2006).** Les biofilms bactériens, *Bull. Acad. Vét*, 261-268.
82. **Saleem A.F., Ahmed I., Mir F., Ali S.A., Zaidi A.K. (2009).** Infection à *Acinetobacter* pan-résistantes dans les nouveau-nés à Karachi, au Pakistan *J Infect Dev Ctries*, 4 pp 30-37.
83. **Schembri M.A., et Klemm p. (2001a).** Biofilm formation in a hydrodynamic environment by novel fimh variants and ramifications for virulence. *Infect Immun.* 69:1322-8.
84. **Schembri M.A., Blom J., Krogfelt K.A., Klemm p. (2005).** Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.* 73:4626-33.



## Références bibliographiques

---

85. **Schurtz T.A., Hornick D.B., Korhonen T.K., Clegg S. (1994).** The type 3 fimbrial adhesin gene (mrkD) of *Klebsiella* species is not conserved among all fimbriate strains. *Infect Immun.* 62:4186-91.
86. **Sharon N., Ofek I. (1986).** Mannose lectines spécifiques de la surface bactérienne. Dans: Mirelman D, éditeur. des lectines et agglutinines microbiennes. *New York, NY: John Wiley & Sons, Inc.*, pp 55-81.
87. **Silverstein A., Donatucci C.F. (2003).** Les biofilms bactériens et prothèses implantables. *Journal international de recherche de l'impuissance.* 15.
88. **Simoons-Smit A.M., Verweij-van Vught A.M.J.J., Kanis I.Y.R., MacLaren D.M. (1985).** Chemiluminescence of human leucocytes stimulated by clinical isolates of *Klebsiella*. *J Med Microbiol.* 1985;19:333-338.
89. **Simoons-Smit A.M., Verweij-van Vught A.M.J.J., MacLaren D.M. (1986).** The role of K antigens as virulence factors in *Klebsiella*. *J Med Microbiol.*;21:133-137.
90. **Sirot D., Sirot J., Labia R., Morand A., Courvalin P., Darfeuille-Michaud A., Perroux R., Cluzel R. (1987).** Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 20:323-34.
91. **Sirot D., Chanal C., Labia R., Meyran M., Sirot J., Cluzel R. (1989).** Comparative study of five plasmid-mediated ceftazidimases isolated in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 24:509-21.
92. **Sirot D. (1995).** Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 36 Suppl A:19-34.
93. **Sokurenko E.V., Courtney H.S., Ohman D.E., Klemm P., Hasty D.L. (1994).** FimH family of type 1 fimbrial adhesins: functional heterogeneity due to minor sequence variations among fimH genes. *J Bacteriol.* 176:748-55.
94. **Sougakoff W., et Trystram D. (2003).** Résistances aux  $\beta$ -lactamines.
95. **Spormann A.M. (2008).** Physiology of microbes in biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 322: 17- 36.

## Références bibliographiques

---

96. **Stahl J.P. (2002).** Infections urinaires nosocomiales. *Conférence de consensus co-organisée par la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) et l'Association Française d'Urologie (AFU)*. 12 pages.
97. **Stepanovic S., Dragana Vukovic D., Dakic I. (2000).** A modified microtiter plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation, *Journal of Microbiological Methods*, **40** : 175–179
98. **Stickler D.J. (2008).** Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Nature Clinical Practice Urology. Review. Vol. 5, No.11*: 598-608.
99. **Tambyah P.A. (2004).** Catheter-associated urinary tract infections: diagnosis and prophylaxis, *International Journal of Antimicrobial Agents*, (**24**):44–48
100. **Tarkkanen A.M., Virkola R., Clegg S., Korhonen T.K. (1997).** Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. *Infect Immun.* 65:1546-9.
101. **Tewari R., MacGregor J.I., Ikeda T., Little J.R., Hultgren S.J., Abraham S.N. (1993).** Neutrophil activation by nascent FimH subunits of type 1 fimbriae purified from the periplasm of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 268:3009-15.
102. **Tielen P., Narten M., Rosin N. (2011).** Genotypic and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urinary tract infections, *International Journal of Medical Microbiology*, **301**: 282–292.
103. **Trautmann M., Vogt K., Hammack C., Cross A.S. (1994).** A murine monoclonal antibody defines a unique epitope shared by *Klebsiella* lipopolysaccharides. *Infect Immun.* 62:1282-8.
104. **Trautner B.W., Darouiche R.O. (2009).** Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection, *Am J Infect Control*, 32 (3), 177–183.
105. **Vallet, I., Olson, J.W., Lory, S., Lazdunski, A., Filloux A. (2001).** The chaperone usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial

## Références bibliographiques

---

- gen clusters (cup) and their involvement in biofilm formation, *Processing of the National Academy of Science of USA*, 98 (12), 6911–6916.
106. **Whitfield C., Amor P.A., Koplín R. (1997).** Modulation of the surface architecture of gram negative bacteria by the action of surface polymer: lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. *Mol Microbiol.* 23:629-38.
107. **Williams P., Lambert P.A., Brown M.R.W., Jones R.J. (1983).** The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. *J Gen Microbiol.*; 129:2181–2191.
108. **Wold A.E., Mestecky J., Tomana M., Kobata A., Ohbayashi, H., Endo T., Eden C.S. (1990).** Secretory immunoglobulin A carries oligosaccharide receptors for Escherichia coli type 1 fimbrial lectin. *Infect Immun.* 58:3073-7.
109. **Wurker M., Beuth J., Ko H.L., Przondo-Mordarska A., Pulverer G. (1990).**Type of fimbriation determines adherence of *Klebsiella* bacteria to human epithelial cells. *Zentralbl Bakteriol.* 274:239-45.
110. **Yala D., Merad A.S., Mohammedi, D., Ouakorich, M.N. (2001).** Resistance bactérienne aux antibiotiques. *Médecine du Maghreb.* N°91.

# ***ANNEXES***

---

## Préparation des milieux

### Préparation des Géloses

#### Gélose Mac Conkey :

Peptone de caséine .....	(17g/l)
Peptone de viande .....	(3g/l)
<b>Sels biliaires</b> .....	(1,5g/l)
<b>Cristalviolet</b> .....	(0,001g/l)
Lactose .....	(10g/l)
Rouge neuter.....	(0,03g/l)
NaCl .....	(5g/l)
Agar .....	(13,5g/l)

pH final = 7,1

Pour la préparation de 1L on prend 52g de Mac Conkey en poudre.

#### Gélose Nutritive :

Extrait de viande .....	(1g)
Extrait de levure .....	(2g)
Peptone tryptique .....	(5g)
NaCl (ou KCl) .....	(5g)
Agar-agar .....	(15à20g)
Eau .....	(1 dm <sup>3</sup> )

pH 7.4

Pour la préparation de 1L on prend 23g de Gélose Nutritive en poudre.

#### Mueller Hinton :

Infusion de viande de bœuf .....	(300,0mL)
Peptone de caséine .....	(17,5 g)
Amidon de maïs .....	(1,5 g)
Agar .....	(17,0 g)

pH = 7,4

Pour la préparation de 1L on prend 38g de Mueller Hinton en poudre.

Une fois les Gélases préparées, elles sont versées dans des flacons puis stérilisées à 121°C pendant 15min, avant d'être coulées dans les boîtes de pétries.

### **Milieu de culture liquide**

#### **Bouillon Cœur-Cerveille :**

Protéose-peptone .....	(10,0 g)
Infusion de cervelle de veau .....	(12,5 g)
Infusion de cœur de bœuf .....	(5,0 g)
Glucose .....	(2,0 g)
Chlorure de sodium .....	(5,0 g)
Hydrogénophosphate de sodium .....	(2,5 g)

pH = 7,4

**Diamètres critiques de lecture interprétative**

<b>Antibiotiques</b>	<b>Diamètres Critiques (mm)</b>	
	<b>S</b>	<b>R</b>
<b>Ampécilline (AMP)</b>	$\geq 19$	$< 16$
<b>Amoxicilline/Acide clavulanique (AMC)</b>	$\geq 21$	$< 16$
<b>Céfalotine (KF)</b>	$\geq 18$	$< 12$
<b>Céfotaxime(CTX)</b>	$\geq 26$	$< 23$
<b>Ceftriaxone (FOX)</b>	$\geq 26$	$< 23$
<b>Ceftazidime (CAZ)</b>	$\geq 26$	$< 21$
<b>Gentamycine (GN)</b>	$\geq 18$	$< 16$
<b>Tétracycline (TE)</b>	$\geq 19$	$< 17$
<b>Acide Nalidixique (NA)</b>	$\geq 20$	$< 15$
<b>Ofloxacine (FOX)</b>	$\geq 25$	$< 22$
<b>Aztréonam (ATM)</b>	$\geq 27$	$< 19$