

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



**UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN**

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE DE LA TERRE ET DE  
L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

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

## **THESE**

Présentée par

**Melle BELLIFA Samia**

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Biologie cellulaire et biochimie

Option : maîtrise du développement microbien

### **Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen**

Soutenue le 21/06/2014

Devant le jury

<b>Président</b>	Moussa Boudjemaa B.	Professeur	U. de Tlemcen
<b>Examinatrice</b>	Bendali F.	MCA	U. de Bejaia
<b>Examineur</b>	Djeribi R.	Professeur	U. de Annaba
<b>Examinatrice</b>	Boucherit-Otmani Z.	Professeur	U. de Tlemcen
<b>Examinatrice</b>	Forestier C.	Professeur	U. d'Auvergne
<b>Directrice de thèse</b>	Hassaine H.	Professeur	U. de Tlemcen

**Année Universitaire : 2013-2014**

## ***Remerciements***

A l'issue de la rédaction de cette recherche, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de « *l'apprenti-chercheur* ».

Cette thèse a été effectuée dans le laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédical et l'Environnement (LAMAABE), université AbouBekr Belkaid- Tlemcen, sous la direction du Monsieur le Professeur Moussa Boudjemaa Boumediene à la faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers, Université AbouBekr Belkaid- Tlemcen.

En premier lieu, Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à ma directrice de thèse Professeur Hassaine Hafida, à la faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers, Université AbouBekr Belkaid- Tlemcen, pour son humanité et son enthousiasme de chaque instant. Après d'elle et grâce à son encadrement consciencieux et à sa rigueur scientifique que j'ai pu progresser et apprendre ce qu'est le métier de chercheur. Je tiens aussi à la remercier pour ses multiples conseils et toutes les heures qu'elle a consacré à diriger cette recherche. Merci de m'avoir aussi confié des responsabilités plus collectives, me laisser conduire ce travail librement et surtout de votre indulgence lorsque je n'étais clairement pas au niveau... Merci de m'avoir appris à structurer mes idées, à mieux valoriser mon travail même si j'ai encore largement du travail dans ce domaine tout comme celui des délais à respecter. J'aimerais également vous dire à quel point j'ai apprécié votre grande disponibilité et votre respect sans faille des délais serrés de relecture cette thèse. Enfin bref, madame vous l'as compris, je vous admire ; je pense que vous êtes un des plus beaux exemples prouvant que les femmes devraient être plus souvent mises à l'honneur tout en haut de la direction.

Je tiens tout particulièrement à exprimer ma sincère reconnaissance à Monsieur Moussa Boudjemaa Boumediene, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, me permettant ainsi d'effectuer ce travail de recherche dans les meilleures conditions, pour le rôle fondamental qu'il a joué dans ma formation, sa rigueur scientifique. Je le remercie également pour l'honneur qu'il me fait pour présider le jury de cette thèse.

Je remercie chaleureusement professeur Christiane Forestier, directrice du Laboratoire Microorganismes : Génome Environnement (LMGE) Université D'Auvergne, Clermont-Ferrand, France de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de la bienveillance qu'elle m'a témoignée, ainsi que Damien Balestrino et Nicolas Charbonnel pour leurs critiques et remarques et surtout leurs connaissances scientifiques.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à Madame le Professeur Boucherit-Otmani Zahia, à la faculté des sciences de la nature et de la vie sciences de la terre et de l'univers, Université AbouBekr Belkaid- Tlemcen pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail en acceptant d'en être l'un des rapporteur de cette thèse. J'aimerais également la remercier pour les heures qu'elle a consacré pour la relecture de ce travail. J'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral.

Monsieur Djeribi Ryad, Professeur à l'université d'Annaba vous avez accepté de rapporter et de juger mon travail. Soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Mademoiselle Farida Bendali. Vice Doyen chargé de la Post-Graduation, de la Recherche Scientifique et des Relations Extérieures, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Université A. Mira de Béjaia, qui m'a fait l'honneur d'examiner cette thèse de doctorat.

Mes remerciements les plus forts à ma mère pour son inconditionnel soutien, son encouragement et aussi son soutien moral afin d'écartier les doutes et partager les joies, pour sa confiance. Que dieu te protège...Je t'aime Mama. Je tiens à remercier mes frères et ma sœur pour leurs soutiens tout au long de cette thèse.

Enfin, une pensée émue pour tous les membres du LAMMABE avec qui j'ai partagé une salle, un café, un repas ou une console d'ordinateur pendant ces années Nassima, Wafae, Meriem, Imene, Ibtissem, Asma , Nabila, Zahira, Téma π, Téma, Nadia, Chafika, Brahim, Monaime, Fethi, Imene Mesli , Tsouria, Khadidja, Meriem.

*Encore un grand merci à tous pour m'avoir conduit à ce jour mémorable*

*La théorie, c'est  
quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que  
personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne fonctionne... et  
personne ne sait pourquoi !*

*Albert Einstein*

Je dédie cette thèse

*A ma famille*

*A mes amis*

*A mon fiancé*

# Tables des matières

## Liste des abréviations

## Liste des figures

## Liste des tableaux

<b>Introduction</b> .....	01
<b>Première partie : Synthèse bibliographique</b> .....	03
<b>Chapitre 1 : Généralités sur <i>Klebsiella pneumoniae</i></b> .....	03
1. Taxonomie et phylogénie.....	03
2. Epidémiologie.....	03
3. Caractères bactériologiques.....	04
3.1 Caractères culturels.....	04
3.2 Caractères biochimiques.....	05
4. Facteurs de pathogénicité.....	05
4.1 La capsule.....	05
4.2 Les adhésines.....	06
4.3 Les endotoxines.....	08
4.4 Les sidérophores.....	09
5. Résistance aux antibiotiques.....	09
<b>Chapitre2 : biofilm dans le secteur médical</b> .....	11
1. Les Biofilms bactériens.....	11
1.1 Introduction.....	11
1. 2 Structure et organisation.....	13
1.3 Physiologie du biofilm.....	14
1.4 Formation des biofilms.....	14
1. 5 Facteurs favorisant la formation d'un biofilm.....	17
1 .5 .1 Caractéristiques de la surface.....	17
1.5. 2 Caractéristiques du milieu.....	18
1.5.3 Propriétés des cellules.....	19
1.5.4 Les interactions physicochimiques.....	19
2. Biofilms et implants médicaux.....	20
2.1 Biofilms et infections du tractus urinaire (biofilm et sondes urinaires).....	20
2.2 Biofilms et cathéters veineux centraux.....	22
3. Le biofilm face aux antibiotiques.....	22

4. Régulation de la formation des biofilms : Le quorum sensing.....	24
4.1 Le quorum sensing. Définition et mécanismes.....	24
4.2 Les molécules du quorum sensing.....	25
4.3 Le quorum-sensing des bactéries à Gram-négatif.....	25
<b>Deuxième partie : Matériel et méthodes</b> .....	26
1. Lieu d'étude .....	26
2. Prélèvements.....	26
3. Ensemencement et isolement.....	26
4. Identification.....	26
5. Détection de la capsule.....	27
6. Sensibilité aux antibiotiques.....	27
7. Détection des BLSE.....	27
7.1 Technique.....	27
7.2 Lecture.....	27
8. Evaluation de la formation de biofilm invitro.....	28
8.1 Méthode de plaque de culture de tissu(TCP).....	28
8.1.1 Technique.....	28
8.1.2 Lecture.....	28
8.2 La méthode tube (TM) .....	28
8.2.1 Technique.....	28
8.2.2. Lecture .....	29
8.3 La méthode du Rouge Congo Agar .....	29
8.3.1 Technique.....	29
8.3.2 Lecture.....	29
9. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales inhibitrices des biofilms(CMIB) vis-à-vis trois agents antimicrobiens.....	30
9.1 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	30
9.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrices des biofilms (CMIB).....	30
10. Caractérisation de propriétés physico-chimiques de la surface de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	31
10.1 Préparation de la suspension bactérienne.....	31
10.2 Etude de l'hydrophobicité de la paroi de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	31
11. Étude du biofilm de <i>Klebsiella pneumoniae</i> par deux modèles expérimentales.....	33

11.1 Formation de biofilm en microplaque de PVC.....	33
11.2 Biofilm en microfermenteur.....	34
11.2.1 Principe.....	34
11. 2.2 Mode opératoire.....	34
11.2.3 Quantification du biofilm.....	35
12. Détection des pili de type 3 de quelques souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> PCR (Polymerase Chain Reaction).....	36
12.1 Extraction de l'ADN bactérien : méthode rapide par ébullition.....	36
12.2 Préparation du mélange réactionnel.....	36
12.3 La PCR.....	37
12.4 Electrophorèse et révélation.....	37
<b>Troisième partie : Résultats et discussion</b> .....	38
1. prélèvement.....	38
2. Caractères bactériologiques des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	40
2.1 Aspect macroscopique.....	40
2.2 Aspect microscopique.....	41
2.3 Caractères biochimiques.....	42
2.4 Détection de la présence de la capsule des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	43
3. Répartition des souches selon le service.....	44
4. Répartition des souches selon le site d'isolement et la durée d'implantation.....	44
5. Etude de la sensibilité de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux antibiotiques.....	47
6. Détection des BLSE des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	49
7. Evaluation de la formation du biofilm <i>in vitro</i> par trois techniques.....	53
8. Etude de l'effet de quelques agents antimicrobiens sur la forme planctonique et biofilm des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	58
9. Résultats d'hydrophobicité de quelques souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	61
10. Formation de biofilm sur les microplaques en PVC et le microfermenteur.....	63
10.1 Analyse de la formation de biofilm sur les microplaques en PVC.....	63
10.2 Analyse de la formation du biofilm par le microfermenteur.....	65
11. Etude des facteurs influençant sur la formation du biofilm de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	69
<b>Conclusion générale</b> .....	73
<b>Références bibliographique</b> .....	76

## Liste des abréviations

<b>AK :</b>	Amikacine
<b>AMC :</b>	amoxicilline- acide clavulanique
<b>AMX :</b>	amoxicilline
<b>AN :</b>	acide nalidixique
<b>BATH:</b>	Bacterial Adhesion to Hydrocarbon
<b>C :</b>	colistine
<b>CAZ :</b>	ceftazidime
<b>CF :</b>	céfalotine
<b>CIP :</b>	Ciprofloxacine
<b>CMI :</b>	Concentration(s) Minimale(s) Inhibitrice(s)
<b>CMIB</b>	Concentration(s) Minimale(s) Inhibitrice(s) Biofilm
<b>CTX :</b>	Cefotaxime
<b>DO :</b>	Densité optique
<b>EDS :</b>	Eau distillée stérile
<b>EDTA :</b>	acide éthylène diamine tétraacétique
<b>EPS :</b>	Exopolysaccharides
<b>GN :</b>	Gentamycine
<b>IMP :</b>	Imipenème
<b>IUN :</b>	Infections urinaires nosocomiales
<b><i>K. pneumoniae:</i></b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>LB :</b>	Luria Bertani
<b>LPS :</b>	Lipopolysaccharides
<b>MATS :</b>	Adhésion microbienne aux solvants « <i>Microbial Adhesion To Solvents</i> »
<b>OFX</b>	ofloxacine
<b>PBS :</b>	Phosphate buffered saline
<b>PCR :</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PIA :</b>	Polysaccharide Intercellular Adhesion
<b>TB :</b>	tobramycine
<b>TBE :</b>	TRIS Acide borique EDTA
<b>TET :</b>	tétracycline
<b>UFC :</b>	Unité(s) formant colonie(s)

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de <i>Klebsiella</i> sp. .....	5
<b>Figure 2</b> : Structure fibrillaire couvrant la surface bactérienne .....	6
<b>Figure 3</b> : Pili d' <i>E. coli</i> . (A) Clichés de microscopie électronique à transmission après coloration négative d' <i>E. coli</i> exprimant des pili de type-1. (B) Microscopie électronique à haute résolution de l'extrémité du pilus ; la flèche indique l'adhésine FimH .....	7
<b>Figure 4</b> : Microscopie électronique à balayage de l'adhésion agrégative de <i>K. pneumoniae</i> sur les cellules intestinales .....	11
<b>Figure 5</b> : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle d'un biofilm bactérien.....	13
<b>Figure 6</b> : Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm.....	15
<b>Figure 7</b> : A : mécanisme de la formation du biofilm sur sonde urinaire, B: une sonde urinaire contaminée.....	21
<b>Figure 8</b> : Récapitulation des principaux mécanismes de résistance aux agents antimicrobiens des biofilms. D'après le "Center for biofilm engineering" - Montana State University.....	24
<b>Figure 9</b> : Préparation de la suspension bactérienne.....	32
<b>Figure 10</b> : Formation de biofilm en microplaque PVC.....	33
<b>Figure 11</b> : Photo du microfermenteur.....	34
<b>Figure 12</b> : Principe du microfermenteur.....	35
<b>Figure 13</b> : Aspect de <i>Klebsiella pneumoniae</i> sur le milieu Mac Conckey.....	41
<b>Figure 14</b> : Examen microscopique après coloration de Gram.....	41
<b>Figure 15</b> : Identification de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . A l'aide de la galerie API20 E.....	42
<b>Figure 16</b> : Détection de la capsule par l'encre de chine.....	43
<b>Figure 17</b> : Répartition des souches de <i>K. pneumoniae</i> isolées des dispositifs médicaux dans différents services du CHU Tlemcen.....	44
<b>Figure 18</b> : Répartition des souches selon la durée d'implantation des dispositifs	

médicaux.....	46
<b>Figure 19:</b> Fréquence de résistance aux antibiotiques des souches <i>K. pneumoniae</i> isolées au CHU Tlemcen.....	48
<b>Figure 20:</b> Résultats d'antibiogramme d'une souche de <i>K. pneumoniae</i> isolée du service de réanimation.....	49
<b>Figure 21:</b> Test de synergie permettant la détection de BLSE observé chez une souche de <i>K. pneumoniae</i> .....	50
<b>Figure 22 :</b> nombre de souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> BLSE+.....	50
<b>Figure 23 :</b> Evaluation de la production de biofilm par la méthode TCP.....	54
<b>Figure 24 :</b> Evaluation de la production de biofilm par la méthode TM.....	55
<b>Figure 25 :</b> Phénotype de production de slime chez <i>K. pneumoniae</i> sur milieu RCA.....	55
<b>Figure 26 :</b> Affinité pour l'hexane des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolées des dispositifs médicaux.....	62
<b>Figure 27 :</b> Formation du biofilm sur microplaque BD Falcon en PVC. La formation du biofilm a été quantifiée par le cristal violet.....	64
<b>Figure 28:</b> Quantification des biofilms formés par des souches de <i>K. pneumoniae</i> en microplaque pendant 8 heures dans M36B1 glucose + 0, 4% en mesurant la DO à 570 nm.....	64
<b>Figure 29:</b> Quantification des biofilms formés par des souches de <i>K. pneumoniae</i> en microfermenteur dans M36B1 glucose + 0, 4% en mesurant la DO à 570 nm.....	65
<b>Figure 30 :</b> Des exemples d'adhésion des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> sur les lames de microfermenteur.....	66
<b>Figure 31 :</b> Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification du gène <i>mrkD</i> dans les souches.....	69

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Les pathologies rencontrées chez les différents patients.....	38
<b>Tableau 2:</b> Diagnostic de l'infection sur les dispositifs médicaux recueillis chez les patients hospitalisés.....	40
<b>Tableau 3 :</b> Détection des BLSE chez les patients hospitalisés au cours de leur séjour....	51
<b>Tableau 4:</b> Résultats de la formation du biofilm par les deux techniques TM, TCP, RCA.....	56
<b>Tableau 5:</b> Effet des trois antibiotiques sur la forme planctonique et la forme biofilm....	59
<b>Tableau 6:</b> La relation entre la formation du biofilm (PVC, microfermenteur) et l'hydrophobicité.....	67

Pendant longtemps les bactéries ont été étudiées sous forme planctonique en culture liquide en tant que cellules libres, alors que paradoxalement dans la nature la majorité d'entre elles se trouvent sous forme du biofilm. Dans cette structure particulière, les microorganismes se développent en micro colonies adhérentes les unes aux autres à une interface ou sur une surface solide. Les biofilms colonisent des surfaces très variées et sont particulièrement connus pour leurs effets néfastes dans le domaine de la santé publique et de l'industrie. Parmi leurs impacts négatifs les plus connus : les infections nosocomiales et les contaminations des produits alimentaires.

La médecine actuelle doit faire face à la prise en compte des infections impliquant des biofilms qui se forment sur des dispositifs médicaux tel que les sondes urinaires, les cathéters et les implants, puisqu'on estime que 60 % des infections associées aux soins auraient pour origine un dispositif invasif [(Balaban *et al.*, 2003) ; (Espinasse *et al.*, 2010) ].

La présence des biofilms lors d'une infection n'est pas diagnostiquée par les méthodes usuelles de microbiologie et de ce fait toutes les infections sont traitées de la même manière. Cependant toutes les études et les preuves s'accumulent pour reconnaître que le biofilm est un véritable bouclier à l'action des antimicrobiens, d'autant plus que la propagation des souches multirésistantes ces dernières années.

Outre ces résistances, l'organisation spatiale des biofilms, le quorum sensing, la présence de curli, l'adhésion aux différents supports, peuvent être à l'origine de la tolérance aux antibiotiques et à la chronicité d'infections nosocomiales.

Des études impliquant la microscopie à balayage ont montré que presque tous les dispositifs sont colonisés par des microorganismes habituellement intégrés dans le biofilm.

*Klebsiella pneumoniae* est une souche placée au premier rang des pathogènes opportunistes qui profitent de l'affaiblissement des défenses de l'organisme pour induire très souvent des infections nosocomiales. Dans certaines situations elle peut constituer des biofilms notamment sur des surfaces inertes (sondes ou cathéters), à partir de ce réservoir de bactéries ainsi constitué à proximité immédiate du patient, la bactérie peut contaminer celui-ci via des dispositifs médicaux souillés.

En Algérie il ya peu de publications dans ce domaine, c'est à cette problématique que nous nous sommes attachées dans le cadre de ce travail de thèse qui porte sur l'évaluation de la capacité de *Klebsiella pneumoniae* à former un biofilm sur dispositifs médicaux et l'étude de quelques paramètres et facteurs conduisant à la formation de ces agrégats sur surface abiotique.

La compréhension de l'installation de tels biofilms permettra de mettre en place des moyens de lutte spécifiques et efficaces vis-à-vis de ces bactéries pathogènes.

L'objectif de ce travail est d'étudier les caractéristiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées des dispositifs médicaux et leurs interactions avec des surfaces abiotiques.

La thèse est présentée au travers de trois parties. La première est une synthèse bibliographique qui présente en premier lieu la bactérie *Klebsiella pneumoniae*, ensuite une revue bibliographique est faite sur les propriétés du biofilm. La deuxième partie détaille les matériels et méthodes ; elle décrit les conditions expérimentales utilisées. Dans la dernière partie nous exposons les résultats obtenus en les discutant.

Enfin une conclusion générale permet de résumer les résultats obtenus et de discuter les perspectives et applications potentielles d'un tel travail.

### Chapitre 1 : Généralités sur *Klebsiella pneumoniae*

#### 1. Taxonomie et phylogénie

L'espèce *Klebsiella pneumoniae* appartient au règne des *Procaryotae*, au domaine des *Bacteria*, au phylum des *Proteobacteria*, à la classe des *Gamma proteobacteria*, à l'ordre des *Enterobacteriales*, à la famille des *Enterobacteriaceae* et au genre *Klebsiella*. Le genre *Klebsiella* a été créé en 1885 en l'honneur du microbiologiste allemand Edwin Klebs (1834-1913), inventeur de la technique de fixation des prélèvements dans la paraffine et co-découvreur de *Corynebacterium diphtheriae* (Martínez *et al.*, 2004). La taxonomie du genre *Klebsiella* a été révisée à de nombreuses reprises, notamment grâce au développement des méthodes d'identification et de typage. Parmi les différentes classifications, la plus communément admise jusqu'à la fin du vingtième siècle est celle proposée par Orskov en 1984. *K. pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis* et *K. ozaenae* sont regroupées pour former une seule espèce *K. pneumoniae*, elle-même divisée en trois sous espèces : *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*.

Le genre comprend cinq espèces : *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. terrigena* et *K. ornithinolytica*. En 1999, *Calymmatobacterium granulomatis* (agent de la Donovanose) est transféré dans le genre *Klebsiella* et renommé *K. granulomatis* (Carter *et al.*, 1999).

En 2001, un nouveau nom de genre *Raoultella*, est donné aux espèces jusque là dénommées *K. ornithinolytica*, *K. planticola* et *K. terrigena*.

La justification de cette nouvelle dénomination a été apportée par l'étude combinée des gènes codant pour l'ARN16S et du gène *rpoB* codant pour la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase (Carter *et al.*, 1999). Dans les années 2000, de nouvelles espèces ont été ajoutées à la nomenclature : *K. variicola* et *K. singaporensis* (Rosenblueth *et al.*, 2004).

#### 2. Epidémiologie

*K. pneumoniae* est une espèce ubiquitaire. Elle peut être isolée de l'environnement (sols, eaux de surface, eaux usées, végétaux) ainsi que des flores commensales de l'homme et des animaux (Bagley *et al.*, 1978). Elle colonise jusqu'à 30% des individus au niveau des muqueuses digestive et nasopharyngée. La colonisation augmente de façon très importante chez les patients hospitalisés (Haverkorn et Michel, 1979). Elle est aujourd'hui reconnue comme responsable d'infections nosocomiales (infections urinaires, intra-abdominales, infections de site opératoire, septicémies, pneumonies).

*K. ornithinolytica* a été mise en évidence dans des prélèvements alimentaires dans la flore commensale du tube digestif ainsi que dans des prélèvements urinaires, bronchopulmonaires et des plaies diverses.

*K. terrigena*, dont son rôle pathogène n'est pas démontré est une espèce isolée d'eaux de surface, d'eaux usées et du sol [(Gavini *et al.*, 1977); (Izard *et al.*, 1981)].

*K. planticola* a été isolée essentiellement à partir d'échantillons d'eaux de surface et de plantes, mais quelques souches ont été retrouvées associées à des mastites bovines, et à des cas cliniques chez l'homme (Freney *et al.*, 1986). Quant à *K. oxytoca*, elle présente une épidémiologie proche de *K. pneumoniae*. Chez l'homme, les deux sous-espèces *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* et *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* ont été isolées uniquement en situation pathogène, alors que *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* peut être présente à l'état de saprophyte au niveau du nasopharynx et du tractus intestinal. Elle est retrouvée dans les selles chez 5 à 38% des individus, alors que le taux de portage au niveau du nasopharynx varie de 1 à 6%. Ces estimations chiffrées diffèrent d'une étude à l'autre et changent radicalement au sein de l'environnement hospitalier, où elles augmentent proportionnellement avec la durée du séjour des individus. Selon l'étude de Podschun et Ullmann (1998) il ressort que 77% des patients hospitalisés sont porteurs de *K. pneumoniae* dans la flore intestinale, 19% au niveau du pharynx et 42% sur les mains. Le personnel hospitalier héberge lui-même des taux élevés de *K. pneumoniae*.

### 3. Caractères bactériologiques

#### 3.1 Caractères culturaux

*K. pneumoniae* présente tous les caractères généraux des entérobactéries. C'est une bactérie aéro-anaérobie facultative, qui se cultive sur milieux usuels non-enrichis (gélose trypticase-soja (TS), gélose Mac Conckey, gélose lactosée au pourpre de bromocrésol (BCP) et gélose de Drigalski). Après 18-24 heures à 37°C, elle forme des colonies arrondies, muqueuses, généralement bombées et brillantes. Sur les milieux contenant du lactose et un indicateur de pH, les colonies de *K. pneumoniae* apparaissent lactose-positives avec virage de l'indicateur coloré (Illiaquer, 2010).

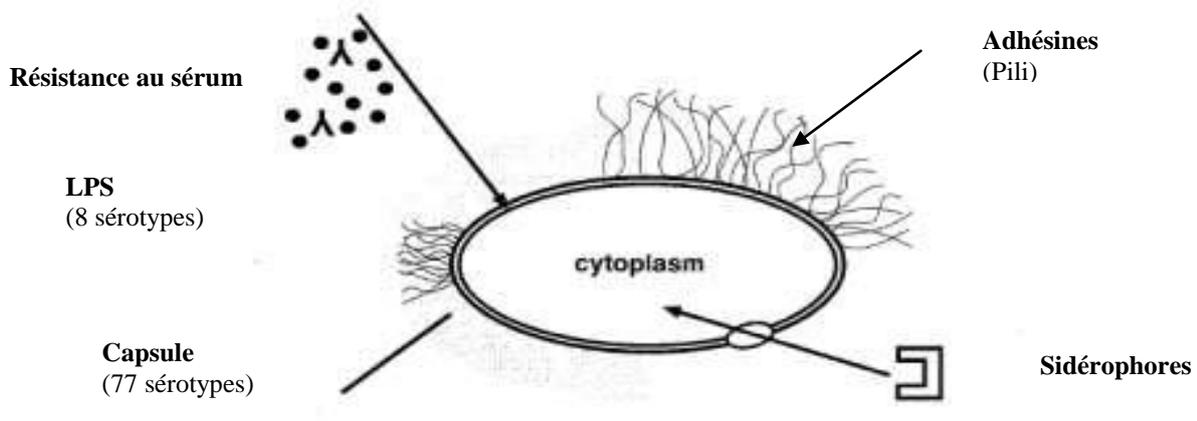
## 3.2 Caractères biochimiques

*K. pneumoniae* possède les caractères suivants : oxydase négative, catalase positive, fermentation du D-glucose et réduction des nitrates en nitrites

Les caractères biochimiques conduisant au diagnostic de l'espèce sont les suivants :  $\beta$ -galactosidase positive, uréase positive, VP positive (réaction de Voges-Proskauer : production d'acétoïne), lysine-décarboxylase (LDC) positive, ornithine-décarboxylase (ODC) négative, arginine di-hydrolase (ADH) négative, indole négative, gélatinase négative, une absence de production d'H<sub>2</sub>S et fermentation de nombreux sucres dont le saccharose, le rhamnose et le mélibiose.

## 4. Facteurs de pathogénicité

*K. pneumoniae* est un pathogène opportuniste fréquent, isolée le plus souvent d'infections urinaires, respiratoires ou lors de septicémies. Habituellement saprophyte, chez l'homme, elle profite d'une défaillance du système immunitaire de l'hôte pour provoquer une infection (Illiaquer, 2010). Les facteurs de pathogénicité sont résumés sur la figure 1.



**Figure 1** : Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de *Klebsiella* sp. (Podschn et Ullmann, 1998).

### 4.1 La capsule

La plupart des souches de *Klebsiella pneumoniae* produisent une capsule polysaccharidique, de structure fibrillaire, recouvrant la totalité de la paroi bactérienne et apparaissant à la coloration de Gram sous la forme d'un halo clair. Les sous-unités de cette capsule sont composées par quatre ou six sucres, avec une prédominance d'acide glucuronique conférant une charge négative à la capsule. Les antigènes capsulaires

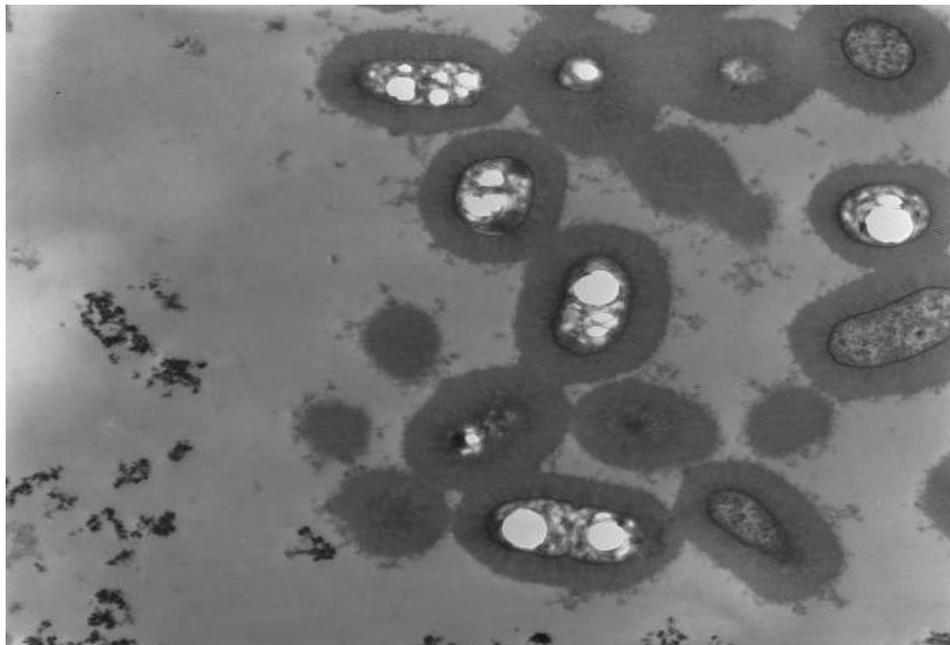
K déterminent 77 sérotypes (Orskov, 1984). Les études de létalité chez la souris ont montré que les sérotypes K1 et K2 pouvaient être considérés comme les plus virulents (Mizuta *et al.*, 1983).

### 4.2 Les adhésines

Différentes adhésines ont été mises en évidence chez *K. pneumoniae*. Le terme d'adhésines est utilisé pour la dénomination de molécules variées impliquées dans l'adhésion des bactéries aux cellules de l'hôte. Ces molécules jouent un rôle essentiel dans la première étape du processus infectieux. Les propriétés d'adhésion des *Enterobacteriaceae* sont généralement médiées par différents types de pili ou fimbriae. Ce sont des structures protéiques non flagellaires et filamenteuses formant des appendices à la surface des bactéries. Bien que les deux termes pili et fimbriae soient habituellement considérés comme synonymes, ils devraient être différenciés : fimbriae pour l'adhésion aux cellules et pili pour les appendices formés lors de la conjugaison. Ils sont formés de différentes sous-unités. Les deux types de fimbriae les plus rencontrés chez *K. pneumoniae* sont le type 1 et le type 3. Ils sont formés de différentes sous-unités.

#### Pili de type I (ou commun)

Les fimbriae de type 1 sont les mieux connus et sont présents chez la majorité des entérobactéries (figure 2).

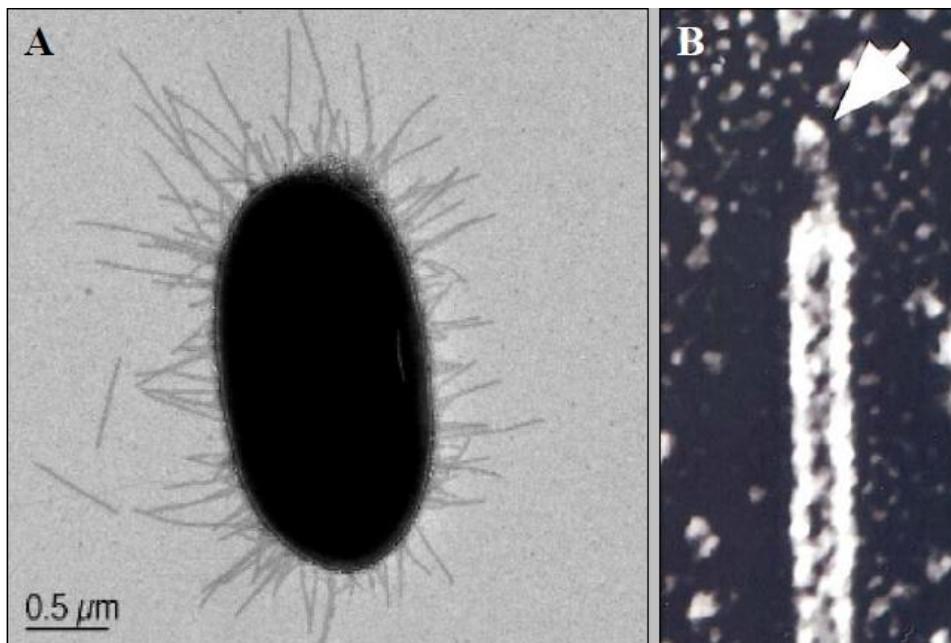


**Figure 2:** Structure fibrillaire couvrant la surface bactérienne (Podschn et Ullmann, 1998).

Les pili de type 1 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 (figure 3).

Ils sont impliqués dans l'adhérence aux cellules épithéliales et aux muqueuses des tractus urogénital, respiratoire et intestinal (Ofek et Beachey, 1978). Leur rôle dans la physiopathologie des infections urinaires à *K. pneumoniae* a été clairement démontré à l'aide de modèles animaux (Fader et Davis, 1980). Leur implication lors de pyélonéphrites s'explique par leur capacité à adhérer aux cellules tubulaires proximales (Fader et Davis, 1982).

Les gènes gouvernant la biosynthèse des pili de type 1 sont regroupés au sein de l'opéron *fim* porté par le chromosome. L'expression de ces facteurs d'adhésion n'est pas constitutive et comme pour *E. coli*, les pili de type 1 de *K. pneumoniae* sont soumis à une variation de phase, les bactéries alternant entre un état d'expression (phase piliée) et un état de non-expression (phase non piliée). Cette régulation permet à la bactérie une meilleure adaptabilité aux différentes niches écologiques rencontrées, mais aussi une meilleure protection contre le système immunitaire de l'hôte, ces structures étant fortement immunogènes (Balestrino, 2006).



**Figure 3** : Pili d'*E. coli*. (A) Clichés de microscopie électronique à transmission après coloration négative d'*E. coli* exprimant des pili de type-1. (B) Microscopie électronique à haute résolution de l'extrémité du pilus ; la flèche indique l'adhésine FimH

(Schilling *et al.*, 2001)

Il existe un phénomène de « variation de phase » contrôlé par des facteurs génétiques et environnementaux. Lorsque la bactérie a colonisé les tissus situés sous les muqueuses, elle n'exprime plus les pili de type I, ceux-ci deviennent alors inutiles et favoriseraient la phagocytose par liaison à des récepteurs spécifiques sur les leucocytes (Ofek et Sharon, 1988).

- **Pili de type III**

Ils sont capables d'adhérer aux cellules endothéliales et aux cellules épithéliales des tractus urogénital et respiratoire (Würker *et al.*, 1990). Au niveau des reins, ils sont impliqués dans l'adhérence aux membranes tubulaires à la capsule de Bowman et aux vaisseaux sanguins (Tarkkanen *et al.*, 1997).

D'autres adhésines ont été décrites :

- **CF29K**

Dont le gène est codé par un plasmide, permet l'adhérence aux cellules intestinales (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1992) : son homologue CS31A chez *Escherichia coli* est impliqué lors de diarrhées ; CF29K appartient à la famille des adhésines K88 (adhésines de type non *fimbriae*) (Di Martino *et al.*, 1995).

- Une adhésine dont la composition se rapproche de celle de la capsule (adhésine de type non *fimbriae*) (Favre-Bonte *et al.*, 1995).

- **KPF-28**

impliquée dans l'adhérence aux cellules de l'intestin (adhésine de type *fimbriae*) (Di Martino *et al.*, 1996).

### 4.3 Les endotoxines

Comme tous les bacilles à Gram négatif, *K. pneumoniae* possède une endotoxine encore appelée lipopolysaccharide (LPS), composée de trois parties : le lipide A, le core polysaccharidique et la chaîne latérale O. Le LPS provoque une activation du système immunitaire induisant des effets physiopathologiques chez l'hôte, via la sécrétion de différentes cytokines pro-inflammatoires (leucopénie, réaction fébrile, voire choc anaphylactique et collapsus) (Gaytán-Martínez *et al.*, 2000).

### 4.4 Les sidérophores

La concentration en fer libre dans les tissus hôtes est insuffisante pour assurer la croissance bactérienne. La plupart des bactéries sécrètent des chélateurs de fer de faible poids moléculaire, les sidérophores, capables de rentrer en compétition avec les protéines de l'hôte, pour capter le fer.

Deux groupes de sidérophores ont été décrits :

- Les sidérophores de type phénolate, tel que l'entérobactine ;
- Les sidérophores de type hydroxymate, comme l'aérobactine.

Le rôle de l'entérobactine, comme facteur de virulence, n'a pas été démontré. A l'inverse, celui de l'aérobactine, grâce à des modèles animaux, a été prouvé (De Lorenzo et Martinez, 1988). En revanche, il ne semble pas jouer un rôle essentiel chez *Klebsiella* sp., par rapport à d'autres entérobactéries (Podschun *et al.*, 1993).

## 5. Résistance aux antibiotiques

La nature des bactéries impliquées dans les infections nosocomiales dépend du site de l'infection mais également de la pression de sélection qu'exerce l'antibiothérapie. Dans les années 1940, dès le début de l'utilisation de la pénicilline, des phénomènes de résistance à cet antibiotique par production de  $\beta$ -lactamases sont apparus et la survenue d'épidémies hospitalières à des souches résistantes constitue depuis un problème majeur. La découverte de  $\beta$ -lactamines résistantes aux pénicillinases a initialement réduit l'incidence des infections dues à des bactéries à Gram-négatif, entre 1960 et 1980. Mais, d'autres enzymes à spectre plus large sont ensuite apparues, réduisant l'efficacité de ces molécules. Le rôle prépondérant de l'usage intensif des antibiotiques dans l'émergence de souches nosocomiales multirésistantes est parfaitement illustré avec *K. pneumoniae* puisque c'est au sein de cette espèce qu'ont été initialement décrites les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) (Balestrino, 2006).

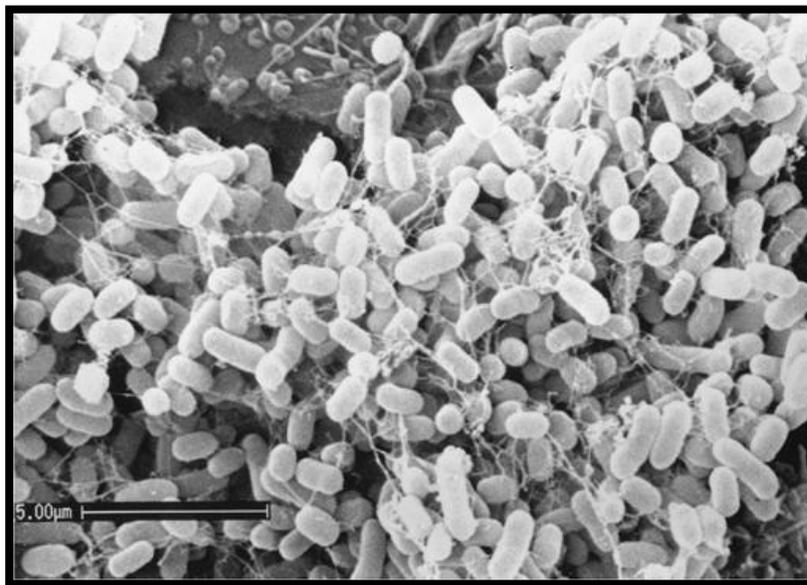
*K. pneumoniae* est naturellement résistante aux pénicillines (amoxicilline, ticarcilline) par production constitutive d'une  $\beta$ -lactamase de classe A (pénicillinase) chromosomique, appelée SHV-1. A partir des années 1970, sont apparues des souches produisant outre SHV-1, des  $\beta$ -lactamases de type TEM, actives non seulement sur les pénicillines mais également sur les céphalosporines de première génération. Ces pénicillinases à large spectre sont produites par des souches de *K. pneumoniae* après acquisition de plasmides conjugatifs portant les gènes codant pour ces enzymes (Jackson *et al.*, 1978).

En 1985, sont apparues des souches de *K. pneumoniae* qui en plus des résistances aux antibiotiques précédemment citées, résistaient aux céphalosporines de seconde et troisième générations. Ces  $\beta$ -lactamases à spectre étendu sont également à déterminisme plasmidique (Sirot *et al.*, 1987) et sont apparues après mutations ponctuelles successives dans les gènes codant des pénicillinases (de type TEM-1 ou SHV-1), mutations qui altèrent la structure du site actif de l'enzyme permettant l'hydrolyse des antibiotiques. La première enzyme décrite chez *K. pneumoniae* a été appelée CTX-1 car elle présentait une forte activité vis-à-vis du céfotaxime. Depuis de nombreuses BLSE ont été identifiées et caractérisées, notamment par leur point isoélectrique. Elles sont dénommées selon leur substrat préférentiel : soit le céfotaxime (CTX), soit la céftazidime (CAZ) [(Sirot *et al.*, 1987); (Sirot *et al.*, 1989)]. Tous les dérivés de TEM 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. Néanmoins, en 1995, une  $\beta$ -lactamase induisant une résistance de haut niveau à l'association amoxicilline/acide clavulanique a été caractérisée chez *K. pneumoniae* (Lemozy *et al.*, 1995). En 1997, pour la première fois, une souche de *K. pneumoniae* productrice de BLSE a montré une résistance additionnelle à l'imipenem (Bradford *et al.*, 1997). D'autres résistances sont également apparues au sein de cette espèce bactérienne et permettent d'inactiver l'action d'antibiotiques appartenant à diverses familles, notamment aminoglycosides et fluoroquinolones (Paterson *et al.*, 2000). L'apparition de multi-résistances au sein de ces souches pathogènes constitue une limite importante en terme thérapeutique. La diffusion épidémique des  $\beta$ -lactamases au sein de souches nosocomiales est liée au fait que les gènes codant ces enzymes sont généralement situés sur des éléments d'ADN mobiles, tels que des plasmides conjugatifs [(Arlet *et al.*, 1990); (Garrouste-Orgeas *et al.*, 1996)]. Ces plasmides étant facilement transmissibles, on observe alors une accumulation de gènes de résistance contribuant ainsi à l'apparition de bactéries multi-résistantes. Selon les études de Marty et Jarlier en 1998, parmi les bactéries multi-résistantes, la proportion globale des souches de *K. pneumoniae* était de 24,8% en 1993. Elle a significativement diminué et atteint 10% en 1996. Néanmoins, parmi les entérobactéries productrices de BLSE, *K. pneumoniae* constitue toujours l'espèce la plus représentée (45%). Bien qu'essentielle, la résistance aux antibiotiques n'est certainement pas suffisante pour expliquer la persistance de ces souches dans l'environnement hospitalier au sens large du terme. La colonisation des muqueuses de l'homme, ainsi que celle des surfaces inertes contribuent pleinement à leur diffusion et leur persistance dans l'environnement.

### Chapitre2 : biofilm dans le secteur médical

La bactérie *Klebsiella pneumoniae* est placée au premier plan des pathogènes opportunistes qui profitent de l'affaiblissement des défenses de l'organisme pour induire des pathologies infectieuses, sous la forme d'infections urinaires et respiratoires, de bactériémies et de surinfections de plaies opératoires.

*Klebsiella pneumoniae* est naturellement présente à faibles concentrations dans l'environnement, mais également dans le tube digestif et les cavités naturelles de l'homme. Dans certaines situations (température, humidité), elle peut constituer des agrégats dénommés biofilms notamment sur des surfaces inertes (sondes urinaires, tubes endotrachéales, cathéters et autres) (Balestrino, 2006) (figure 4).



**Figure 4** : Microscopie électronique à balayage de l'adhésion agrégative de *K. pneumoniae* sur les cellules intestinales (Favre-Bonté *et al.*, 1995).

## 1. Le biofilm bactérien

### 1.1 Introduction

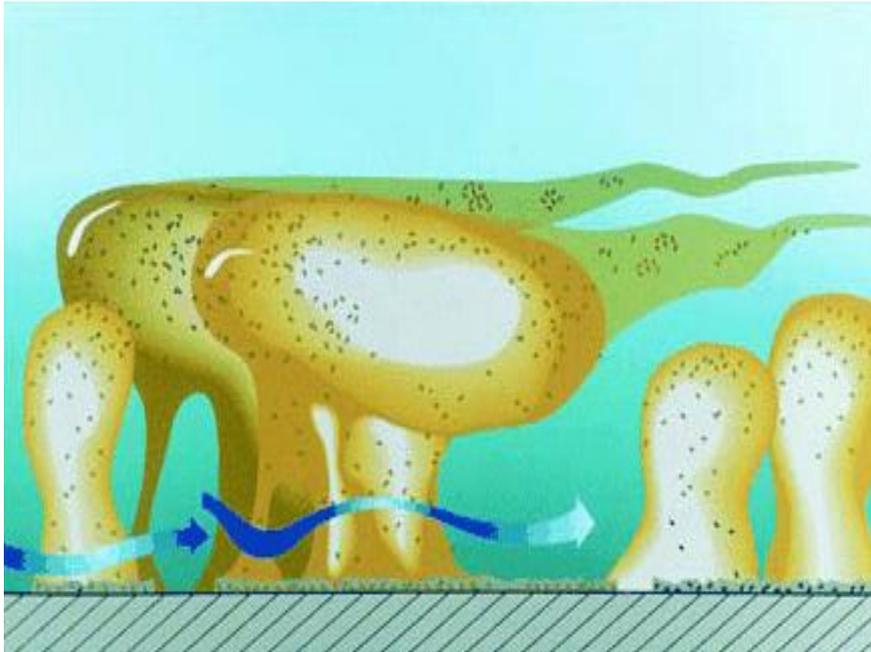
L'idée que les bactéries croissent préférentiellement sur des surfaces a été avancée à intervalles réguliers au cours des 150 dernières années (Costerton, 1999). Parallèlement, certains microbiologistes ont constaté au microscope optique que les bactéries planctoniques poussaient différemment après avoir adhéré à une surface et initié la formation d'un biofilm. Les termes de bactéries sessiles et planctoniques décrivent des micro-organismes respectivement adhérents à une surface et libres dans une suspension. La surface d'adhésion

des organismes sessiles peut être abiotique (les matériaux inertes) ou biotique (les tissus ou les cellules vivantes) (Dune, 2002). Toute surface naturelle ou artificielle peut être le siège d'une colonisation bactérienne avec formation d'un biofilm. Toute surface du corps humain exposée à l'environnement extérieur (peau, dents, épithéliums buccal, respiratoire, gastro-intestinal et vésical, vagin) peut aussi faire l'objet d'une colonisation bactérienne avec formation d'un biofilm (Cooper et Okhiria, 2006). Tenant compte de ces deux aspects (surface biotique ou abiotique), Costerton et ses collaborateurs (1999) ont défini le biofilm comme une communauté structurée de cellules bactériennes incluses dans une matrice polymérique autoproduite et adhérentes à une surface inerte ou vivante. Dans ce contexte précis, la matrice du biofilm a comme seule origine les cellules bactériennes.

Cette définition paraît cependant incomplète car la matrice du biofilm peut être aussi constituée de matériaux non cellulaires tels que les cristaux minéraux (exemple les canalisations d'eau) (Donlan, 2002).

La définition précédente limite la formation du biofilm à l'interface solide/liquide alors qu'un biofilm peut aussi se former à l'interface air/liquide ou liquide /liquide. Les agrégats de cellules bactériennes flottant dans le liquide ont les mêmes caractéristiques que les agrégats formés à l'interface solide/liquide (Hall-Stoodley *et al.*, 2012). Sur le plan médical la matrice du biofilm peut héberger des composants «extramicrobiens» provenant de l'hôte. D'autres bactéries peuvent se lier à la fibronectine à la surface d'un implant médical et, dans une endocardite infectieuse, les populations bactériennes peuvent s'imbriquer dans une masse de plaquettes agrégées, de fibrine et d'autres protéines de l'hôte.

Restreindre la définition du biofilm à la seule origine bactérienne pousse à faire abstraction des infections dans lesquelles les bactéries interagissent avec les molécules et les récepteurs de l'hôte pour s'attacher, se multiplier et s'agréger. Tous les facteurs cités ci-dessus permettent de donner une définition du biofilm plus complète et pertinente cliniquement. Ainsi, le biofilm est défini comme un ensemble des cellules microbiennes agrégées, entourées d'une matrice polymérique autoproduite et pouvant contenir des composants de l'hôte (Hall-Stoodley *et al.*, 2012). Cette matrice représente jusqu'à 85% du volume total du biofilm (figure 5).



**Figure 5 :** Représentation schématique de la structure tridimensionnelle d'un biofilm bactérien. Les flèches indiquent la circulation du fluide à l'intérieur des canaux aqueux.

"Center for biofilm engineering" Montana State University (**Balestrino, 2006**).

### 1.2 Structure et organisation

Le biofilm est constitué essentiellement des microorganismes et de la matrice qu'ils synthétisent. Les micro-organismes représentent 2 à 15% du matériel du biofilm selon l'espèce impliquée alors que la matrice extracellulaire (EPS, *extracellular polymeric substances*), représente 50 à 90% de la masse organique carbonée du biofilm. Mais l'eau demeure le principal composant du biofilm [(Costerton, 1999); (Sutherland, 2001); (Donlan, 2002)]. Les propriétés physico-chimiques de l'EPS sont variables d'un biofilm à un autre, mais un biofilm est initialement constitué de polysaccharides. La composition et la structure de polysaccharides déterminent la conformation primaire du biofilm. La quantité des EPS produite varie en fonction du micro-organisme, et elle augmente avec l'âge du biofilm. La matrice du biofilm peut aussi être composée d'ions métalliques, de cations divalents, de macromolécules (protéines, ADN, lipides, phospholipides) et de composants de l'hôte [(Sutherland, 2001); (Donlan, 2002); (Hall-Stoodley *et al.*, 2012)].

La matrice d'exopolysaccharides exerce différents rôles. Elle assure la protection et la cohésion de chaque microcolonie bactérienne, absorbe l'eau et piège les petites particules circulantes. L'EPS intervient aussi sur la relation des microorganismes entre eux et avec les surfaces. Son important degré d'hydratation, due à sa capacité à fixer un grand nombre de

molécules d'eau par des liaisons hydrogène, permet de lutter contre la dessiccation de certains biofilms dans le milieu naturel. Cette matrice contribue aussi aux propriétés d'antibiorésistance des biofilms en se liant directement aux agents antimicrobiens et en les empêchant de pénétrer au sein du biofilm (Wingender *et al.*, 1999). Elle est aussi impliquée dans le maintien d'un microenvironnement unique pour les bactéries (Costerton *et al.*, 1994).

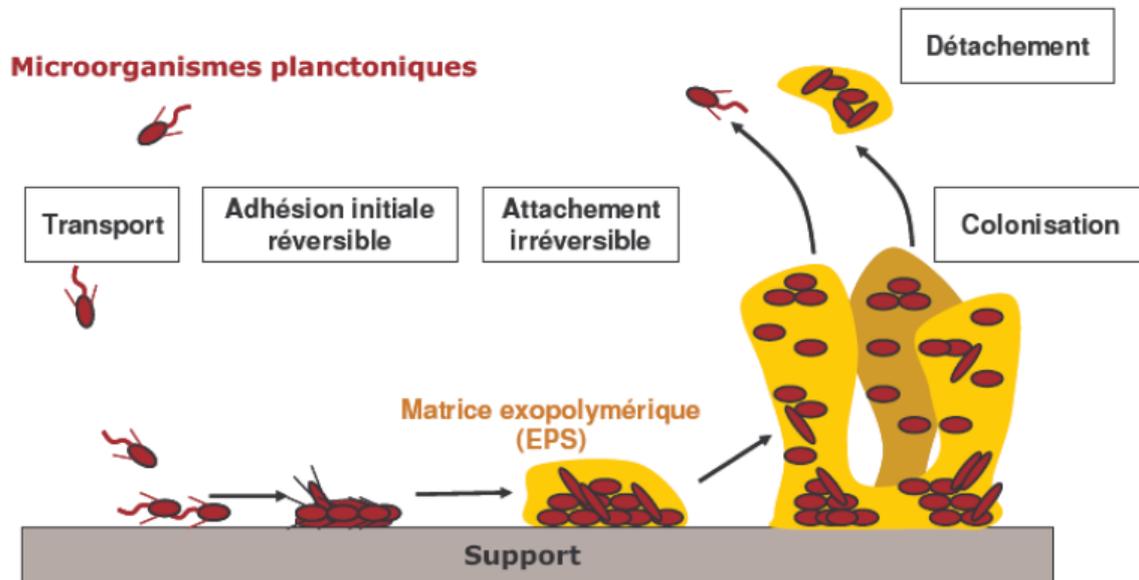
### 1.3 Physiologie du biofilm

Les études menées sur le transport par diffusion des composants gazeux et liquides à travers la matrice du biofilm ont montré que les cellules situées dans le biofilm reçoivent moins d'oxygène et de nutriments que les cellules en suspension. On peut mettre en évidence un gradient de nutriments et d'oxygène depuis le sommet du biofilm jusqu'à sa base où l'on a un microenvironnement anaérobie. Les cellules de la périphérie d'une microcolonie sont mieux desservies par les réseaux de canaux que celles situées au centre. L'état métabolique d'une bactérie à l'intérieur d'un biofilm dépend de sa localisation au sein de la structure. Les cellules situées dans les couches les plus profondes ont une activité métabolique réduite [(Le Magrex *et al.*, 1994); (McLandsborough *et al.*, 2006)]. Les cellules bactériennes qui s'établissent sur une surface et s'engagent dans la formation du biofilm adoptent ainsi un phénotype profondément différent, l'expression de nombreux gènes change, ce qui conduit à des modifications métaboliques [(Becker *et al.*, 2001); (Beenken *et al.*, 2004)].

### 1.4 Formation des biofilms

La formation d'un biofilm bactérien sur une surface solide est un phénomène complexe dans lequel des processus physiques, chimiques et biologiques sont impliqués [(Characklis et Marshall, 1990) ; (Lappin-Scott et Costerton, 1995)]. La constitution d'un biofilm mature nécessite plusieurs étapes (Figure 6) :

- attachement réversible des bactéries,
- adhésion irréversible et production d'EPS,
- formation des micro-colonies,
- maturation du biofilm et mise en place de la structure tridimensionnelle du biofilm,
- détachement du biofilm.



**Figure 6 :** Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm (Filloux et Vallet, 2003).

**adhésion initiale** : c'est la première étape de la formation du biofilm [(Sauer *et al.*, 2002); (Stoodley *et al.*, 2002)]. Les bactéries planctoniques s'approchent de la surface grâce à la force du flux, à la gravitation ou à leur mobilité intrinsèque (flagelle), et vont ainsi « scruter » la surface. Lorsqu'elles se trouvent au voisinage du support, les bactéries s'y fixent de manière transitoire, faisant face aux forces répulsives du matériau. Ces attachements transitoires sont réversibles pendant une période de quelques secondes à quelques minutes. Ils sont considérés comme une opportunité pour la bactérie s'adapter à l'environnement, ce qui entraîne soit une fixation définitive, soit un retour à la phase planctonique (Caiazza et O'Toole, 2004). Les cellules attachées de manière temporaire adhèrent souvent par un de leurs pôles [(Hinsa *et al.*, 2003) ; (Caiazza et O'Toole, 2004) ; (Agladze *et al.*, 2005)].

**Adhésion des bactéries** : L'approche des bactéries de la surface dépend des propriétés dynamiques du milieu (vitesse d'écoulement du fluide) et des propriétés physico chimiques de la surface (Katsikogianni *et al.*, 2004). L'adhésion bactérienne implique le déplacement de la cellule vers le lieu de son adhésion. Cette approche nécessite différents appendices bactériens, tels que les flagelles et les cils [(O'Toole et Kolter, 1998) ; (Gavin *et al.*, 2003)] qui permettent également à la bactérie de se déplacer sur la surface. D'autres appendices, les pilis

sont pour leur part impliqués dans l'attachement initial à la surface [(Fletcher *et al.*, 1993) ; (McBride, 2001)]. Dans un premier temps l'adhésion est due à des interactions faibles entre la surface et les bactéries (interactions de type van der Waals et électrostatiques). A ce stade, la bactérie peut désorber de la surface et retrouver son état planctonique, l'adhésion est donc réversible.

Dans un deuxième temps, l'adhésion devient irréversible grâce à la sécrétion d'exopolymères par les bactéries permettant de consolider leur fixation au support. Dans ce cas, des interactions fortes s'établissent entre la bactérie et la surface avec des liaisons de type hydrophobe. La synthèse des EPS, qui débute dès les premières étapes d'adhésion, se poursuit pendant la maturation du biofilm [(Spiers *et al.*, 2003) ; (Kuchma *et al.*, 2005)] et la matrice peut alors occuper jusqu'à 75-95 % du volume d'un biofilm mature (Suci *et al.*, 1994).

**Croissance du biofilm :** Une fois que la bactérie est irréversiblement adhérente à la surface, sa multiplication conduit à la formation de colonies qui vont recouvrir toute ou une partie de la surface selon les propriétés de surface des bactéries et des matériaux. La structure du biofilm dépend des conditions environnementales telles que la source de carbone ou le régime hydrodynamique [(Stanley *et al.*, 2003) ; (Klausen *et al.*, 2006)]. Par la suite le biofilm a une croissance exponentielle se traduisant par une augmentation importante de son épaisseur jusqu'à former un film hétérogène tridimensionnel [(Costerton *et al.*, 1995) ; (Davey et O'Toole, 2000) ; (Sauer *et al.*, 2002)]. Dans cette structure tridimensionnelle se forment des canaux permettant la circulation de nutriments (Costerton *et al.*, 1999), d'oxygène et l'évacuation des produits issus du métabolisme bactérien. Finalement l'épaisseur du biofilm se stabilise lorsque les phénomènes d'arrachement du biofilm compensent sa croissance.

**Dispersion du biofilm :** Le détachement de cellules du biofilm intervient lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables : limitation de la disponibilité en oxygène dans des biofilms épais, apparition de forces de cisaillement dues aux conditions hydrodynamiques, diminution de la concentration ou modification de la nature des nutriments disponibles [(Sauer *et al.*, 2002) ; (Sauer *et al.*, 2004)]. Les bactéries peuvent alors migrer afin de trouver un environnement plus favorable à leur développement. Ce phénomène n'est pas restreint au dernier stade du développement du biofilm mais peut avoir lieu, soit par lyse cellulaire soit par le départ de cellules viables, tout au long de la formation du biofilm et en réponse à un changement d'environnement.

### 1.5 Facteurs favorisant la formation d'un 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).

#### 1.5.1 Caractéristiques de la surface

N'importe quel matériau en contact avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm. La rugosité, les propriétés chimiques d'une surface et la présence préalable de films protéiques influent sur l'attachement des bactéries à cette surface et à la formation d'un biofilm (De Chalvet De Rochemonteix, 2009).

##### ➤ **Rugosité de la surface.**

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des microcolonies est importante (Characklis, 1990). 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). Néanmoins, certaines souches sauvages de bactéries colonisent aussi des surfaces lisses (Donlan et Costerton, 2002). Les biofilms auront ainsi tendance à se former au niveau des aspérités des matériaux, formant des recoins propices aux proliférations bactériennes et moins sensibles aux agents désinfectants ou antiseptiques.

##### ➤ **Propriétés physico-chimiques de la surface**

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 Teflon ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux (Bendinger, 1993).

##### ➤ **Présence de films protéiques sur la surface**

La présence de polymères sur un matériau modifie les propriétés physico-chimiques de sa surface, et a une influence directe sur l'attachement de bactéries à cette dernière. En effet, la présence préalable sur un biomatériau d'un film protéique comme le sang, les larmes, l'urine, la salive, le liquide interstitiel et les sécrétions respiratoires influence l'attachement de bactéries à sa surface, et favorise la formation de biofilms (Mittelman, 1996).

### 1.5. 2 Caractéristiques du milieu

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessitent des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux clefs [(Fletcher, 1988) ; (O'Toole *et al.*, 2000); (Donlan, 2002) ; (Martinez, 2007) ;( Goller, 2008)]:

**a.** La température est importante non seulement parce qu'elle affecte l'activité métabolique et enzymatique des bactéries, mais aussi parce qu'elle influence certains paramètres physicochimiques (pH, activité ionique, agitation thermique et solubilité des gaz) ainsi que les propriétés de surface des microorganismes. La température de croissance peut avoir un effet significatif sur la mobilité électrophorétique cellulaire et la production de flagelles et, ainsi sur l'adhésion (Dumas, 2007).

**b.** Le pH du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides suite au déplacement des équilibres d'ionisation (protonation/déprotonation) des groupements fonctionnels exposés selon leur pKa (Hamadi *et al.*, 2004) ce qui peut avoir comme conséquence une réduction ou une augmentation des interactions électrostatiques répulsives défavorables à l'adhésion (Boutaleb, 2007).

**c.** concentration en oxygène, concentration en fer, osmolarité, présence d'ions spécifiques,

**d.** sources de carbone disponibles : elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation (Martinez, 2007).

**e.** 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).

**f.** concentrations en certains cations : l'augmentation de la concentration de plusieurs cations (sodium Na<sup>+</sup>, Calcium Ca<sup>2+</sup>, ion ferrique Fe<sup>3+</sup>) influence l'attachement de *Pseudomonas fluorescens* sur des surfaces en verre, en réduisant les forces répulsives s'exerçant entre les bactéries chargées négativement et la surface de verre (Fletcher, 1988).

**g.** hydrodynamique du fluide : selon la position du matériau dans un fluide, il sera plus ou moins exposé à des turbulences. La zone de moindres turbulences, à l'écart des flux laminaires, est appelée zone de fixation. C'est précisément dans cette zone qu'il est plus facile pour les micro-organismes de se fixer sur une surface, puisqu'ils sont moins soumis aux forces exercées par le fluide (Donlan, 2002).

### 1.5.3 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 avoir 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, et les acides mycoliques (composants de certaines bactéries Gram positives) 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).

La synthèse de fimbriae de type I par des bactéries est un processus complexe gouverné par les statuts nutritionnels des cellules (stimulation de la synthèse si déficit carboné ou en acides aminés chez les souches uropathogènes d'*Escherichia coli*) et par les conditions environnementales (pas de synthèse si pH bas ou température basse). L'expression des curli est sous le contrôle de cascades de phosphorylation. Les conditions environnementales répriment ou stimulent l'expression de gènes codant pour des caractères de motilité. La synthèse de curli est stimulée dans les conditions environnementales suivantes : faible osmolarité, basse température, faible disponibilité du milieu en azote, phosphate, fer et croissance ralentie (Goller, 2008).

### 1.5.4 Les interactions physicochimiques

La nature de la surface bactérienne détermine les interactions microorganisme-support [(Reifsteck *et al.*, 1987);(Bellon-Fontaine *et al.*, 1996)]. Ainsi, les interactions physicochimiques entre une surface bactérienne et un support résultent d'une combinaison de forces de Van der Waals, de forces électrostatiques, de propriétés acide-base de Lewis et de liaisons hydrophobes [(Bellon-Fontaine *et al.*, 1996); (Briandet, 1999); (Krepesky *et al.*, 2003)].

### **2. Biofilms et implants médicaux**

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, pace-makers, cathéters de dialyse péritonéale, sondes de tympanostomie, sondes urinaires, prothèses vocales...etc. 82% des infections nosocomiales sont dues à la présence d'implants médicaux contaminés (Archibald, 1997).

#### **2.1 Biofilms et infections du tractus urinaire (biofilm et sondes urinaires)**

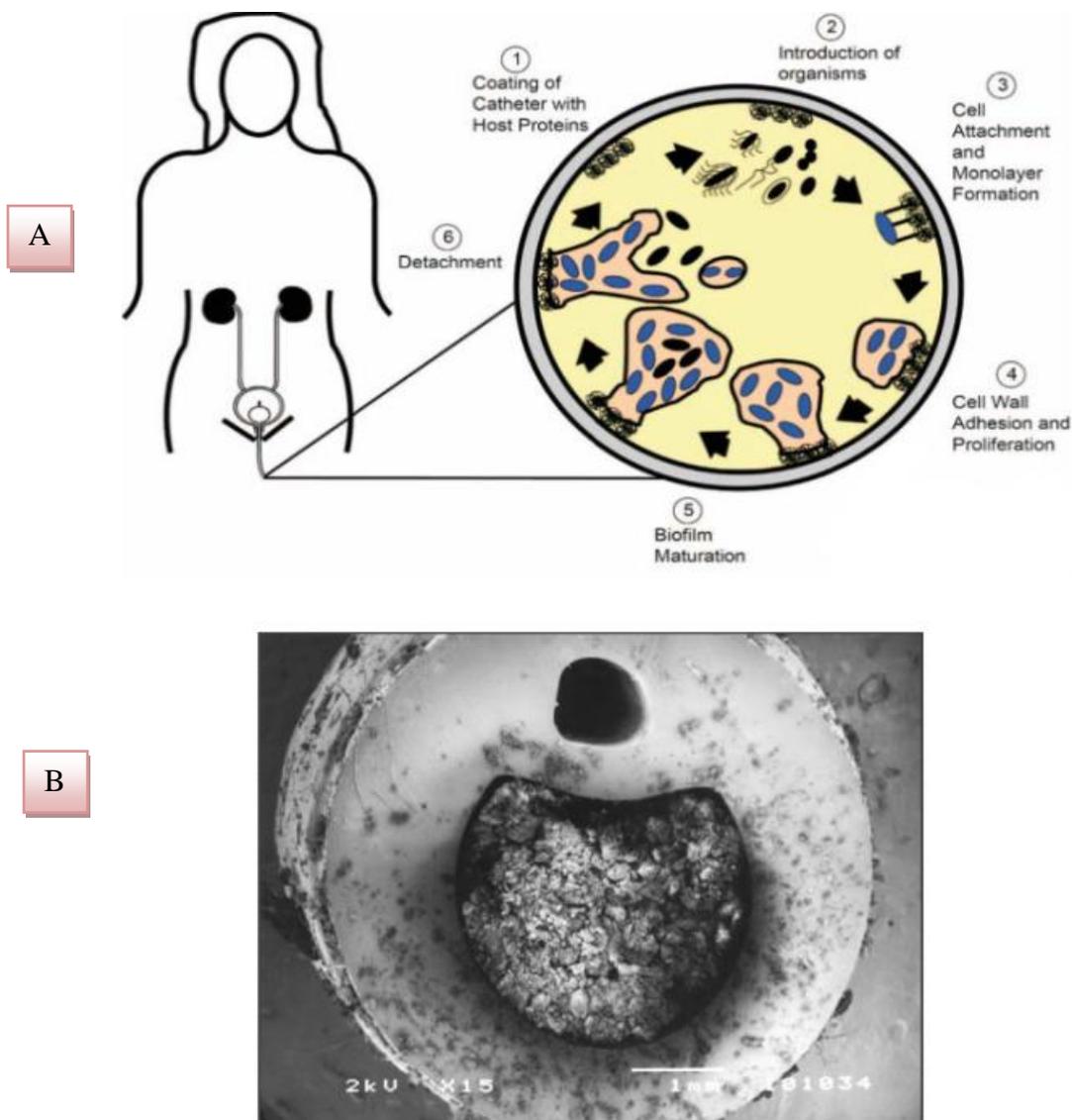
Les infections bactériennes du tractus urinaire (ITUs) sont les infections nosocomiales les plus fréquentes. Le risque de développer une infection urinaire augmente avec l'implantation de matériel médical comme les sondes urinaires. La pose d'une sonde urinaire est le premier facteur responsable du développement d'une infection urinaire (Hatt et Rather, 2008). Les agents pathogènes les plus fréquemment rencontrés font partie de la flore du colon et du gros intestin et peuvent être introduits dans le tractus urinaire suite à des contaminations. Ces agents pathogènes vont former un biofilm sur la sonde urinaire et être à l'origine d'une infection. Les complications les plus fréquentes après la pose d'une sonde urinaire sont les infections nosocomiales du tractus urinaires, dix(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, 1996). Les ITUs sont asymptomatiques dans 90% des cas : une simple bactériurie sera alors observée. Les ITUs peuvent devenir symptomatiques (bactériurie, pyurie...) (Jacobsen *et al.*, 2008). La majorité des micro-organismes responsables proviennent de la flore cutanée ou de la région anale (contamination fécale) du patient, mais aussi des micro-flores transitoires portées par le personnel hospitalier.

Ce sont surtout ces dernières qui peuvent être antibiorésistantes, ce qui complique le traitement de ces infections. Lors de l'insertion de la sonde, la muqueuse urétrale peut être endommagée et son effet protecteur vis-à-vis des microorganismes est alors altéré. Les zones altérées de la muqueuse uro-épithéliale suite à la pose de la sonde sont de nouveaux sites de fixation potentiels pour les bactéries. La pose d'une sonde dans de mauvaises conditions d'hygiène peut favoriser la pénétration de germes dans le tractus urinaire. La présence d'un corps étranger dans le tractus urinaire perturbe les mécanismes normaux de défense de l'hôte.

La présence d'urine résiduelle dans la vessie favorise le développement bactérien (Hatt et Rather, 2008).

Le mécanisme de formation de biofilm sur une sonde urinaire est simple. 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 (Figure 7).

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).



**Figure 7** : A : mécanisme de la formation du biofilm sur sonde urinaire (Jacobsen, 2008),

B: une sonde urinaire contaminée (Stickler,1996)

### 2.2 Biofilms et cathéters veineux centraux

Les cathéters veineux centraux sont les implants médicaux les plus à risque par rapport au développement d'une infection nosocomiale, ceci pose de graves problèmes de santé publique puisque les traitements systémiques de routine des patients atteints d'infections de ce type se révèlent le plus souvent inefficaces (Donlan, 2008). Les microorganismes en cause proviennent de la flore cutanée du patient, de la micro-flore exogène du personnel hospitalier, ou encore d'environnements contaminés. Les micro-organismes atteignent le cathéter par migration à partir de la peau le long de la partie externe du cathéter. Les micro-organismes les plus fréquemment isolés sont: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* et *Klebsiella pneumoniae* [(Donlan, 2001) ; (Donlan, 2008)].

La colonisation bactérienne a lieu dans les 24 heures suivant la pose du cathéter. Au contact du flux sanguin, la surface du cathéter se recouvre d'un film protéique (plaquettes, plasma, fibronectine, laminine, ou fibrine). La présence de ce dernier va modifier les propriétés physico-chimiques de la surface du cathéter et favoriser la formation de biofilms dès 3 jours après la pose du cathéter (Donlan, 2008). La localisation et l'extension du biofilm sur le cathéter dépend de la durée de la cathérisation. Les cathéters de courte durée (inférieure à 10 jours) ont des biofilms au 64 niveau de la partie externe du cathéter et que les cathéters de longue durée (30 jours) ont des biofilms plutôt au niveau de la lumière du cathéter (Raad *et al.*, 1993).

### 3. Le biofilm face aux antibiotiques

La persistance des infections chroniques même en présence d'une antibiothérapie et d'un système immunitaire actif, peut être due à l'émergence de phénomènes de résistance bactérienne. Il faut aussi prendre en considération le cas où les bactéries s'organisent spatialement pour former des biofilms [(Fux *et al.*, 2005) ; (Bjarnsholt *et al.*, 2005)].

La notion de «résistance» des biofilms aux antibiotiques mérite d'être clarifiée. En effet, une souche bactérienne est définie comme étant résistante si sa croissance n'est pas inhibée à une concentration critique (CMI) d'antibiotique généralement observée pour la majorité des souches de l'espèce considérée. Les cellules d'un biofilm sont quant à elles décrites comme résistantes par comparaison avec leurs homologues planctoniques. Par ailleurs, il est parfois plus exact de parler de tolérance plutôt que d'une véritable «résistance» lorsque le mécanisme impliqué est de nature phénotypique (adaptation des cellules à la vie en

biofilm) et donc réversible (les bactéries revenues à l'état planctonique retrouvent leur sensibilité initiale. Cependant, il est rarement possible d'identifier la nature de l'insensibilité aux antibiotiques des bactéries incluses en biofilms. Il est aujourd'hui bien établi que la résistance des biofilms à l'action des agents antimicrobiens est multifactorielle (Daddi Oubekka, 2012).

L'éradication d'un biofilm bactérien pose de gros problèmes cliniques, car l'antibiothérapie active habituellement sur les bactéries à l'état planctoniques se révèle bien souvent moins efficace sur des structures organisées en biofilm [(Brooun *et al.*, 2000); (Liu *et al.*, 2000); (Stewart et Costerton, 2001)].

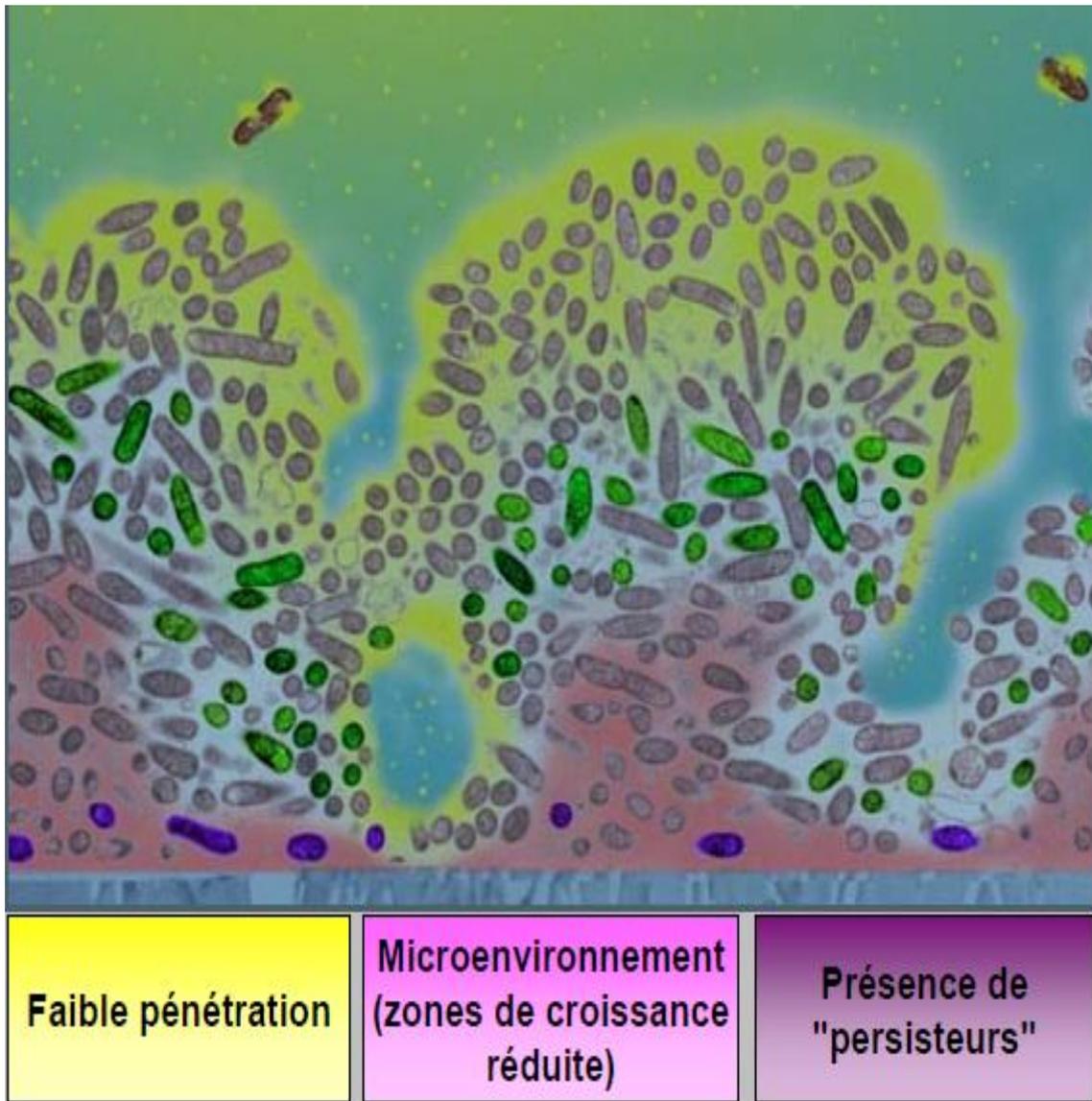
Les mécanismes de résistance habituels, basés sur des modifications enzymatiques, des mutations ou des pompes membranaires d'efflux, ne semblent pas entrer en jeu dans les résistances observées dans les biofilms bactériens (Mah et O'Toole, 2001). En revanche, la dispersion des bactéries d'un biofilm permet généralement de constater l'efficacité des antibiotiques adaptés [(Anwar *et al.*, 1989); (Williams *et al.*, 1997)].

Trois hypothèses principales sont avancées afin d'explicitier les mécanismes de résistance des biofilms aux antibiotiques (Stewart et Costerton, 2001).

La première repose sur une notion de barrière physique qui expliquerait la pénétration lente et incomplète de certains antibiotiques. La seconde hypothèse est liée à l'environnement spécifique du biofilm, dont les zones les plus profondes, riches en résidus acides et pauvres en oxygène et en nutriments, pourraient gêner l'action de l'antibiotique. Enfin, la dernière hypothèse s'appuie sur les modifications phénotypiques observées dans certains biofilms et dont les micro-organismes constituants pourraient présenter des formes plus résistantes (Figure 8).

Ces trois hypothèses reposent sur la nature communautaire et multi-cellulaire du biofilm. La plupart des spectres antibiotiques ont été étudiés sur des formes planctoniques, et doivent maintenant être étudiés sur des modèles de biofilms plus complexes. Ainsi, de nouvelles concentrations minimales d'inhibition, ainsi que de nouvelles associations médicamenteuses doivent être envisagées.

Les recherches actuelles essaient d'envisager des molécules capables de rompre ou d'empêcher la formation de la matrice polysaccharidique, voire d'agir sur les signaux de différenciation du « quorum sensing ».



**Figure 8:** Récapitulation des principaux mécanismes de résistance aux agents antimicrobiens des biofilms. D'après le "Center for biofilm engineering"

Montana State University

## 4. Régulation de la formation des biofilms : Le quorum sensing

### 4.1 Le quorum sensing. Définition et mécanismes

La formation d'un biofilm est contrôlée par des mécanismes de quorum sensing. Il s'agit de mécanismes de contrôle des processus ayant lieu au sein des cellules, matérialisés par des signaux de cellules à cellules, et dépendant de la quantité de cellules présentes : on parle de mécanismes de perception du quota. Ces mécanismes sont basés sur le principe de masse critique [(Costerton *et al.*, 1999) ; (Tomlin *et al.*, 2005)]. Une fois que les signaux

atteignent une valeur seuil (valeur critique), des régulateurs transcriptionnels sont activés et exercent un contrôle sur des gènes spécifiques [(Costerton, 1999) ; (Clutterbuck *et al.*, 2007) ; (Irie et Parsek, 2008)]. La nature et la fonction des molécules signalant les échanges de cellule-à-cellule changent à partir d'une concentration donnée des bactéries (Costerton, 1999).

### **4. 2 Les molécules du quorum sensing**

Les molécules du quorum sensing sont différentes selon les types de bactéries [(Parsek et Fuqua, 2004) ; (Irie et Parsek, 2008)]. On trouve des acylhomosérines lactones (AHL) chez la plupart des bactéries Gram-négatives. La majorité des bactéries Gram-positives utilisent des peptides auto-inducteurs, dont la taille est très variable (de 5 à 87 acides aminés). Les molécules du quorum sensing sont dégradées par des enzymes : AHL-lactonases et AHL-acylases. On obtient par conséquent une ségrégation spatiale des molécules du quorum sensing au sein d'un biofilm (Irie et Parsek, 2008).

### **4. 3 Le quorum-sensing des bactéries à Gram-négatif**

De manière surprenante, *E. coli*, *S. enterica* et *K. pneumoniae* possèdent ce système de QS, mais de façon incomplète. En effet, ces organismes expriment un récepteur de type LuxR, appelé SdiA, mais pas d'homologue de LuxI. Ceci suggère que ces espèces bactériennes répondent seulement aux AHL produites par d'autres, ce qui pourrait être le cas au sein d'écosystèmes complexes tel que la flore du tractus gastro-intestinal (Smith et Ahmer, 2003).

Il a été récemment montré que le gène *srgE* et l'opéron *rck* (*pefI-srgDAB-rck-srgC*) de *S. enterica* impliqués dans la protection de *S. enterica* vis-à-vis des défenses de l'hôte dans l'intestin (Ahmer *et al.*, 1998) sont régulés par SdiA, en présence d'AHL (Smith et Ahmer, 2003).

### 1. Lieu d'étude

Cette étude est réalisée au niveau de deux laboratoires : Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédical et l'Environnement (LAMAABE) de l'Université Abou-Bekr Bekaid-Tlemcen et Laboratoire Microorganismes : Génome Environnement (LMGE) Université D'Auvergne, Clermont-Ferrand, France.

### 2. Prélèvements

De Mai 2010 à Mai 2012, 260 patients ont été inclus dans cette étude où 300 dispositifs médicaux (sondes urinaires, sondes d'intubation et tubes endotrachéales) ont été collectés au niveau de différents services du CHU de Tlemcen : service de réanimation, d'urologie, de médecine interne et de chirurgie.

Les dispositifs médicaux ont été soigneusement prélevés dans des conditions d'asepsie, placées individuellement dans des tubes en verre stériles puis transportés immédiatement au laboratoire pour être analysé.

### 3. Ensemencement et isolement

L'extrémité distale de chaque dispositif médical a été coupée, placé dans 1 mL d'eau physiologique stérile puis agité au vortex durant 1 minute (technique de Brun Buisson). Un volume de 20 µL a été ensemencé simultanément sur gélose nutritive pour dénombrement et confirmation de l'infection sur dispositifs médicaux et sur un milieu Mac Conkey pour l'isolement des *Klebsiella pneumoniae*, grâce à l'action de deux inhibiteurs, cristal violet pour l'inhibition de la flore gram (+) et les sels biliaires pour la sélection des entérobactéries. Les boites ensemencées sont incubées à 37°C pendant 18-24 heures.

### 4. Identification

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

- l'étude des caractères macroscopiques ;
- l'étude des caractères microscopiques (forme des colonies, mobilité, coloration de Gram) ;
- l'étude des caractères biochimiques (API 20<sup>E</sup> (Biomérieux®, France).

### 5. Détection de la capsule

La présence d'une capsule a été examinée par coloration avec l'encre de Chine. Sur une lame, une goutte de suspension bactérienne a été mélangée avec le colorant. Au microscope optique, la capsule apparaît comme un halo clair autour des bactéries (El Fertas-Aissani *et al.*, 2012).

### 6. Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion de disque selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA SFM, 2010). Les antibiotiques utilisés (Bio-Rad) sont : l'amoxicilline (AMX), l'amoxicilline- acide clavulanique (AMC), la ceftazidime (CAZ), la cefotaxime (CTX), la colistine(C), l'imipénème (IMP), la céfalotine (CF), la gentamycine(GN), la tobramycine (TB), la tétracycline (TET), l'acide nalidixique (AN), l'Amikacine (AK), la Ciprofloxacine (CIP), l'ofloxacine (OFX).

### 7. Détection des BLSE : Test de synergie

Le test consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de  $\beta$ -lactamases et un disque de céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération (CTX, CAZ). Cette image est dite « bouchon de champagne » (Philippon et Arlet, 2006).

#### 7.1 Technique

La recherche de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme, en disposant 2 disques : amoxicilline+ acide clavulanique (AMC) et une céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération (CAZ) à une distance de 20 à 30mm sur gélose Muller Hinton. L'incubation se fait à 37°C pendant 18h.

#### 7.2 Lecture

La production de BLSE se traduit par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre le disque AMC et C3G.

### 8. Evaluation de la formation de biofilm *in vitro*

Cette partie est consacrée aux techniques quantitatives et qualitatives de la formation du biofilm.

#### 8.1 Méthode de plaque de culture de tissus (TCP)

##### 8.1.1 Technique

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

A partir d'une culture de 18 heures dans le milieu BHIB, les puits d'une microplaque de 96 puits (polystyrène) sont inoculés avec 10  $\mu$ L des bactéries diluées au 1/10. Chaque puits contient 150  $\mu$ L de BHIB. Les microplaques sont incubées pendant 24 heures à 37°C. Les puits sont lavés trois fois avec 0,2 mL de tampon phosphate salin PBS (pH= 7,2) afin d'éliminer les bactéries libres (planctoniques). Les biofilms formés par l'adhérence des organismes sessiles sont colorés avec du cristal violet (0,1%) pendant 5 min. 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).

##### 8.1.2 Lecture

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

#### 8. 2 La méthode tube (TM)

C'est une technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm décrite par Christensen *et al.*, (1982).

##### 8.2.1 Technique

A partir d'une boîte de culture 18-24 heures,ensemencer une colonie dans 10 mL de BHIB supplémenté de 2% de saccharose puis incubé à 37°C pendant 24 h. Les tubes ont été lavés avec du PBS (pH=7,3) puis séchés. Chaque tube a été ensuite coloré par le cristal violet

(0,1%) pendant 15 minutes. L'excès de colorant a été enlevé et les tubes ont été lavés avec de l'eau distillée, puis séchés en position renversée (Mathur *et al.*, 2006).

### 8.2.2. Lecture

La formation du biofilm est considérée comme positive quand un film visible double et recouvre le mur et le bas du tube. La formation d'un anneau à l'interface liquide n'est pas indicative de la formation du biofilm. La formation de biofilms est notée comme de 0 pour absent, + pour modéré et +++ pour fort (Stepanovic *et al.*, 2000).

## 8.3 La méthode du Rouge Congo Agar

La gélose Rouge Congo Agar est un milieu très convenable pour la détection des souches productrices de slime. Sur ce milieu les souches exprimant le PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesion) donnent des colonies noires avec une surface rugueuse contre des colonies de couleur rouge et à surface lisse pour les souches PIA négatives (Ziebuhr *et al.*, 2001).

### 8.3.1 Technique

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

### 8.3.2 Lecture

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

### **9. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et des Concentrations Minimales Inhibitrices Des Biofilms(CMIBs)**

#### **9.1 Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)**

Les CMI (Concentrations Minimales Inhibitrices) ont été déterminées par microplaques selon les indications du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM, 2010). 100µL de milieu de culture liquide sont déposés dans les 96 puits d'une microplaque stérile à fond rond. 100µL de la solution-mère de chaque produit à tester sont déposés dans le premier puits de 2 lignes (essais en double).

Après homogénéisation, des dilutions de raison 2 sont réalisées de la colonne 1 à la colonne 10 incluse. L'inoculation a été réalisée par dépôt de 100µL de la suspension mère du microorganisme test ajustée à environ  $10^8$  bactéries/ml ou à différentes concentrations, dans chaque puits d'une seconde microplaque (Dépôt de 1 à 3 µL/puits : concentration finale  $10^6$  bactéries/mL pour un inoculum initial à  $10^8$ /mL). Les colonnes 11 et 12 servent respectivement de témoin de stérilité du milieu (sans produit et sans microorganisme) et de témoin croissance du microorganisme (sans produit et avec microorganisme). Après 24 heures d'incubation à 37°C, les CMI sont déterminées comme les plus petites concentrations avec absence de croissance visible.

#### **9.2 Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices Des Biofilms (CMIB)**

Les biofilms ont été formé comme décrit ci-dessus. Après 24 heures d'incubation ces derniers sont rincés trois fois avec du PBS avant l'ajout de 250 µL de TSB additionnés d'antibiotiques aux concentrations prédéfinies. Les microplaques scellées ont été incubées à 37° C pendant 24 h. Après incubation, les puits ont été lavés trois fois avec PBS stérile (pH 7,2). Le biofilm traité est gratté et transféré vers une autre microplaque stérile. Après incubation 24h à 37 ° C, les puits ont été soigneusement rincés, séchés et colorés au cristal violet suivant la technique standard. La densité optique est mesurée à 590 nm par le lecteur ELISA.

La DO initiale après incubation avec différentes concentrations des agents antimicrobiens est comparée à celle du témoin sans antibiotique.

L'élimination de la formation du biofilm par les agents antimicrobiens se traduit par une densité optique inférieure à celle de la DO initiale.

## 10. Caractérisation de propriétés physico-chimiques de la surface de *Klebsiella pneumoniae*

### 10.1 Préparation de la suspension bactérienne

Une suspension bactérienne est préparée dans 100 mL de milieu Luria Bertani (LB) à partir d'une culture jeune de *Klebsiella pneumoniae* obtenue sur gélose Mac Conkey. La suspension ainsi préparée est incubée dans un premier temps à 37°C pendant 18 heures, les cellules sont ainsi récoltées après une centrifugation à 500 rpm pendant 15 min. le culot obtenu est ensuite lavé, après deux centrifugations successives, à l'aide du tampon PBS (phosphat befferd saline) stérile dont le pH est ajusté selon les valeurs souhaitées (Van Loosdrecht *et al.*, 1987). Le culot bactérien est ensuite remis en suspension dans une quantité minimale du tampon et la densité optique de la suspension bactérienne est ajustée à 600nm de sorte à obtenir les valeurs de DO comprises entre 0.08et 0,1.

### 10.2 Etude de l'hydrophobicité de la paroi de *Klebsiella pneumoniae*

L'hydrophobicité de la paroi cellulaire est estimée selon le protocole BATH (Bacterial Adhesion to Hydrocarbon) [(Rosenberg *et al.*, 1980) ;(Rosenberg,1984)].

Un volume de 0.3 mL de chacun des solvants hydrophobes retenus dans cette étude est additionné à 1.8mL de la suspension bactérienne initialement préparée selon le protocole ci-dessus. La densité optique de la suspension(DO<sub>i</sub>) est ajustée entre 0.8 et 1. L'ensemble est vortexé pendant 2minutes j'jusqu'a l'obtention d'une émulsion. Après une période de décantation de 20minutes, les deux phases sont ainsi séparées (Figure 9). La phase aqueuse est alors prélevée et une mesure de la densité optique à 600nm est effectué(DO<sub>f</sub>). Le pourcentage d'adhésion au solvant est donné par la relation suivante :

$$A_{(\%) } = \frac{DO_i - DO_f}{DO_i} \times 100$$

DO<sub>i</sub> : représente la densité initiale, DO<sub>f</sub> : la densité optique de la phase aqueuse après décantation.

Lorsque la  $A_{(\%) } < 20\%$  hydrophile  
 $A_{(\%) } < 40\%$  hydrophobe  
 $20\% < A_{(\%) } < 40\%$  moyennement hydrophobes

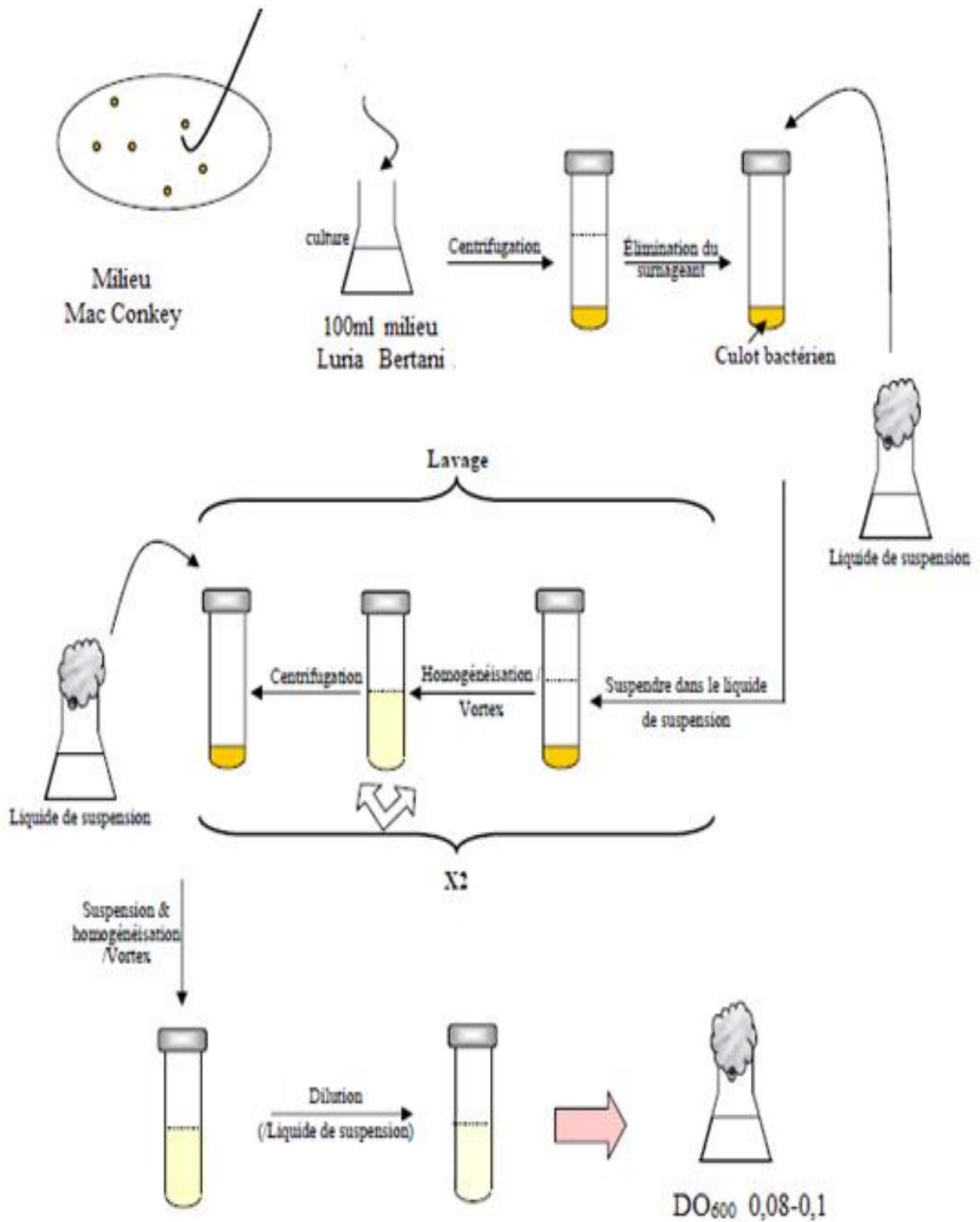
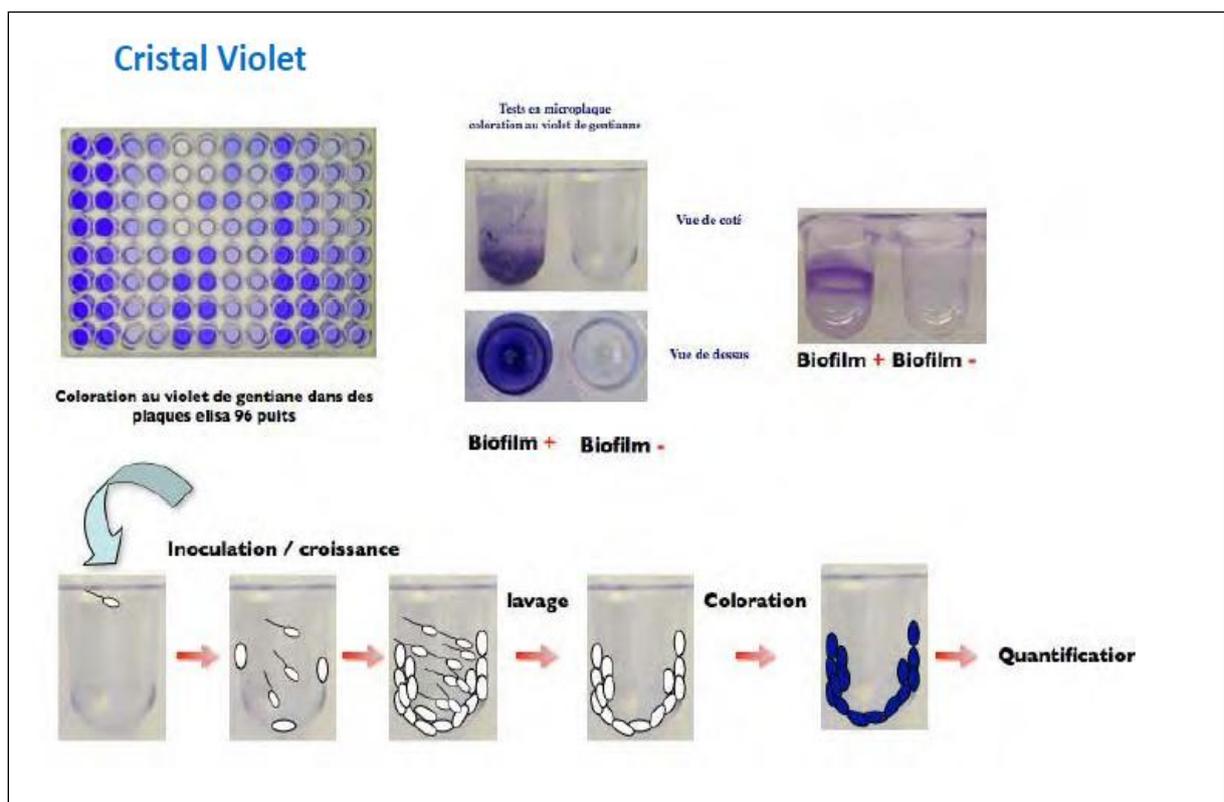


Figure 9: Préparation de la suspension bactérienne

## 11. Étude du biofilm de *Klebsiella pneumoniae* par deux modèles expérimentales

### 11.1 Formation de biofilm en microplaque de PVC

A partir d'une culture bactérienne de 18h dans un milieu M63B1 additionné du Glucose à 0,4%, les puits d'une plaque 96 puits(PVC) sont incubés avec 4 $\mu$ L de bactéries diluées au 1/10. Chaque puits contient 150 $\mu$ L de M63B1 additionné du Glucose 0,4%. Les microplaques sont incubées pendant 24h à 37°C, puis 150 $\mu$ L de cristal violet à 0.5% dans de l'eau distillée stérile sont ajoutés dans chacun des puits (Figure 10). Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, les puits sont vidés et rincés 3 fois à l'eau. 100  $\mu$ L d'éthanol absolu sont ensuite ajoutés après avoir laissé sécher quelques minutes. La quantité de cristal violet solubilisé après 5 min d'incubation à température ambiante est mesurée par lecture de la DO à 570 nm dans un lecteur de plaque ELISA.



**Figure 10:** Formation de biofilm en microplaque PVC (Protocole Laboratoire LMGE)

### 11.2 Biofilm en microfermenteur

#### 11.2.1 Principe

Les biofilms peuvent être cultivés *in vitro* dans les cellules à flux (cell well). Celles-ci sont des systèmes ouverts qui permettent l'approvisionnement en continu des nutriments d'une manière similaire à l'environnement réel qu'il soit médical, naturel ou industriel.

#### 11.2.2 Mode opératoire

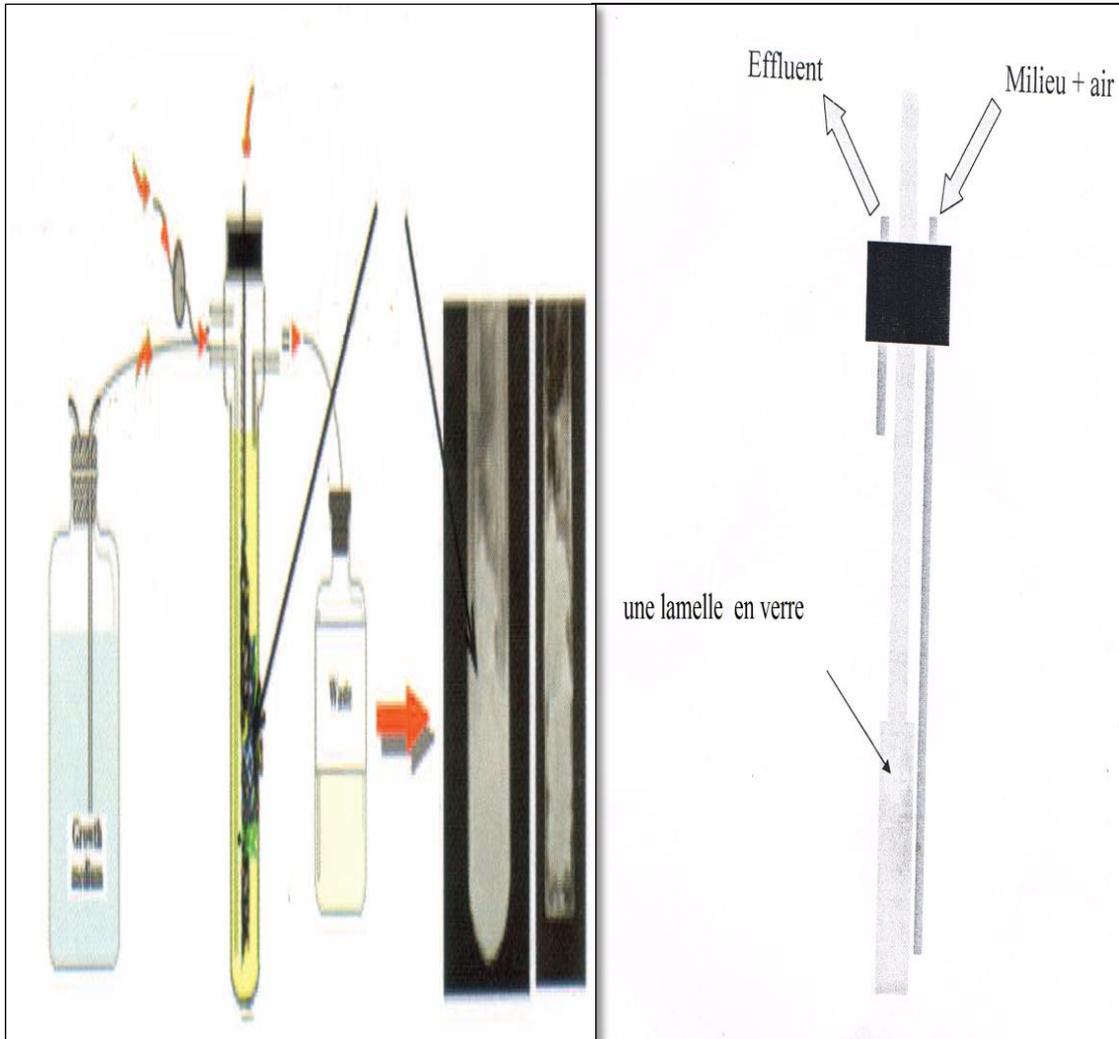
Les biofilms sont réalisés dans un système de culture en flux continu à haut débit en microfermenteur (Figure 11). Les microfermenteurs sont inoculés par trempage de la spatule en verre pendant 1 minute dans une suspension bactérienne à 0,1 unité de DO réalisée à partir d'une culture de 18h en milieu M63B1 additionné du Glucose à 0,4%. La vitesse de flux en milieu est ajustée à 1,75 mL/min (De Araujo *et al.*, 2010).



**Figure 11** : Photo du microfermenteur

### 11.2.3 Quantification du biofilm

Après 24h d'incubation les bactéries adhérentes sur les lamelles de microfermenteur (figure 12) sont mises en suspension dans 3mL de M63B1et détachées par ultrasonication et passage au vortex, puis la DO est mesurée à 590 nm.



**Figure 12:** Le principe du microfermenteur (Protocole Laboratoire LMGE)

### **12. Détection des pili de type 3 de quelques souches de *Klebsiella pneumoniae* PCR (Polymerase Chain Reaction)**

La PCR permet d'amplifier les séquences d'ADN de manière spécifique, à l'aide d'un couple d'amorces constitué d'oligonucléotides complémentaires des extrémités du fragment d'ADN à amplifier, qu'elles vont délimiter. Le mélange réactionnel est composé par les deux amorces, la Taq-polymérase, les désoxyribonucléotides est soumis à des modifications itératives de températures. L'amplification d'ADN est exponentielle, ce qui permet d'augmenter de manière considérable la quantité d'ADN, afin de faciliter sa détection et son analyse.

#### **12.1 Extraction de l'ADN bactérien : méthode rapide par ébullition**

Pour chaque isolat, l'ADN total a été extrait par ébullition. Les bactéries ont été cultivées pendant une nuit sous agitation à 37 ° C dans 10 ml de bouillon LB. Une anse de 1 µL de la culture bactérienne était mise en suspension dans 100 µL d'eau distillée stérile dans un tube eppendorf. Après 10 minutes, à 100°C dans un bain-marie le tube était centrifugé 8 minutes à 11000 tours par minute. Le surnageant contenant la matrice d'ADN était récupéré puis conservé à - 20°C pour des études ultérieures.

#### **12.2 Préparation du mélange réactionnel**

Le mélange réactionnel de PCR est préparé en fonction du nombre d'extraits à amplifier. Un tube témoin négatif et un tube témoin positif doivent être inclus dans la technique pour valider la série.

Le mix, distribué dans des tubes de PCR, à raison de 45 µL est le suivant :

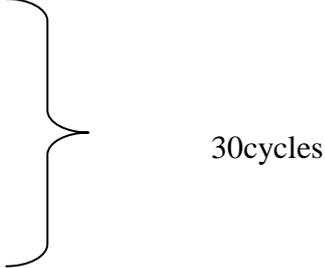
- Amorces sens (25µM) : 1 µL
- Amorces anti-sens (25 µM) : 1 µL
- dNTP : 1 µL
- Enzyme(Taq) : 0,5 µL
- Eau distillée : 36,5 µL
- Tampon 10X : 5 µL

Les deux amorces utilisées : MrkD F: 5'-CCACCAACTATTCCCTCGAA-3 'et MrkD R: 5'-ATGGAACCCACATCGACATT-3' (Gen Bank numéro d'accession: pour MrkD: AY225462) (Hennequin et Forestier, 2007).

### 12.3 La PCR

Pour chaque souche, ajouter 5  $\mu\text{L}$  d'extrait d'ADN au mix afin d'obtenir un volume final de 50  $\mu\text{L}$ . Ajouter 5  $\mu\text{L}$  d'eau distillée dans le tube témoin négatif, à la place de l'extrait d'ADN. La souche de référence : *Kp* Im 21 a été utilisée comme un témoin positif. Les tubes sont introduits dans un thermocycleur (Roche, Mannheim, Allemagne).

L'amplification se déroule selon les conditions suivantes :

- 2 minutes à 94°C
  - 30 secondes à 94°C
  - 30 secondes à 58°C
  - 45 secondes à 72°C
  - 7 secondes à 72°C
- 
- 30cycles

### 12.4 Electrophorèse et révélation

Après amplification, les produits de PCR obtenus sont soumis à une migration à 120 Volts, en gel d'agarose à 1 % et visualisé sous lumière U.V. après passage dans un bain de bromure d'éthidium 0,1 % (Merck®, Darmstadt, Allemagne). Le marqueur de taille DNA Ladder (Invitrogen®, Carlsbad, Nouveau Mexique), est déposé en même temps que les échantillons.

Les produits amplifiés ont été examinés par 1,3% électrophorèse sur gel d'agarose dans un tampon 0,5 x TBE.

### 1. Prélèvements

Le centre hospitalier universitaire de Tlemcen représente l'unique établissement hospitalo-universitaire de la wilaya. Il a été construit en 1954 durant la période coloniale sur une superficie de 13 hectares. Il draine une population de diverses régions ouest du pays.

Le CHU Tlemcen a été créé par le décret exécutif N° 97-467 du 02 décembre 1997 ; il assure une formation médicale et paramédicale et présente une activité très importante.

Il est composé de 27 services, dont 26 services d'hospitalisation pour une capacité de 850 lits (Hassaine, 2008).

Entre Mai 2010 et Mai 2012, 300 prélèvements ont été analysés, soit 100 sondes urinaires, 100 tubes endotrachéales et 100 sondes d'intubation, tous ont été prélevés chez 260 patients hospitalisés plus de 48h dans quatre services : service de réanimation, service d'urologie, médecine interne et service de chirurgie) du CHU de Tlemcen (Algérie). L'âge des patients varie de 18 et 79 ans, les caractéristiques de ces patients sont résumées dans le tableau 1.

La suspicion de signes d'infection, signes locaux inflammatoires (rougeur, chaleur, œdème, douleur), et des signes généraux (fièvre supérieure à 38C) a été noté chez tous ces patients porteurs d'un de ces dispositifs médicaux.

**Tableau 1** : caractéristiques et pathologies rencontrées chez les différents patients

Nombre de patients	Pathologies
60	Accidents vasculaires cérébraux +diabète
40	Accidents vasculaires+diabète
20	Amputation+ diabète
50	Embolie pulmonaire
20	Traumatisme crânien+diabète
40	Hémorragie interne
30	Tumeur

Le diagnostic et la confirmation de la colonisation ou de l'infection liée à tous ces dispositifs médicaux à été réalisé pour l'ensemble des prélèvements.

Une culture quantitative après « vortexage » (technique de Brun Buisson), un seuil supérieur ou égal à  $10^3$  UFC/mL définit l'infection sur dispositifs médicaux.

Sur l'ensemble des 300 dispositifs médicaux récoltés, deux tiers d'entre eux étaient infecté avec un dénombrement  $\geq 10^3$  UFC/mL ; soit 200 patients sur les 260 étudiés présentaient une infection nosocomiale liée à la présence d'un dispositif invasif.

La relation entre dispositifs médicaux (DM) et infection nosocomiale n'est pas nouvelle, mais s'est diamétralement modifiée ces dernières années.

L'enquête de prévalence réalisée par Hassaine en 2008 est la première enquête sur les infections nosocomiales au CHU de Tlemcen. Cette étude a montré que 16.85% des patients ont une infection nosocomiale. Ce taux reste élevé à celui trouvé dans d'autres hôpitaux d'Algérie ; il est de 6% à l'hôpital Frantz Fanon Blida, de 11.1% au CHU de Sidi Bel-Abbès, de 13.7% (1999) à l'hôpital de Parnet Alger, de 16% (2000) au CHU Bab el Oued Alger et 12.06 % au CHU de Tizi-Ouzou (2003).

En comparaison à d'autres pays magrébins, le taux de prévalence des infections nosocomiales à l'hôpital de Sousse était de 7% en 1999, à la même année il était de 11.5% au CHU Ibn Rochd Rabat et de 6.7% au CHU Hassan II au Maroc. Ce taux reste inférieur à 10% dans les hôpitaux européens (Hassaine, 2008).

En revanche, 31% des patients étaient porteurs de dispositifs invasifs. Les sites d'infections les plus retrouvés sont les sondes urinaires (42.37%), suivi de l'infection du site opératoire (39%). Les infections sur cathéters occupent la 3<sup>ème</sup> position avec 8.47% (Hassaine, 2008).

Notre étude confirme les résultats retrouvés par Hassaine 2008, où le nombre des bactéries isolées des dispositifs médicaux variait de  $3,2 \cdot 10^3$  et  $3,45 \cdot 10^8$  UFC /mL. Les sondes urinaires semblent être les plus infectées avec des seuils allant à  $3,15 \cdot 10^8$  UFC /mL (tableau 2).

**Tableau 2:** Diagnostic de l'infection sur les dispositifs médicaux recueillis chez les patients hospitalisés

	<b>Sonde Urinaire (n=100) Dénombrement UFC/MI</b>	<b>Tube Endotrachéale (n=100) Dénombrement UFC/mL</b>	<b>Sonde d'intubation (n=100) Dénombrement UFC/MI</b>
	<b>n=80</b>	<b>n=70</b>	<b>n=50</b>
<b>Culture positive</b>	Max = $3,15 \cdot 10^8$ Moy = $5,2 \cdot 10^6$ Min = $2,7 \cdot 10^4$	Max = $5,2 \cdot 10^7$ Moy = $3,4 \cdot 10^4$ Min = $4,2 \cdot 10^3$	Max = $6,3 \cdot 10^7$ Moy = $2,7 \cdot 10^5$ Min = $3,2 \cdot 10^3$
<b>Culture Négative</b>	<b>n=20</b>	<b>n=30</b>	<b>n=50</b>

**Max** : la valeur maximale, **Moy** : la valeur moyenne, **Min** : la valeur minimale

## 2. Caractères bactériologiques des souches de *Klebsiella pneumoniae*

Les méthodes microbiologiques standards pour l'identification de *Klebsiella pneumoniae* ont été la croissance sur milieu gélosé de mac Conkey, la coloration de Gram, et l'identification biochimique par galerie API20E.

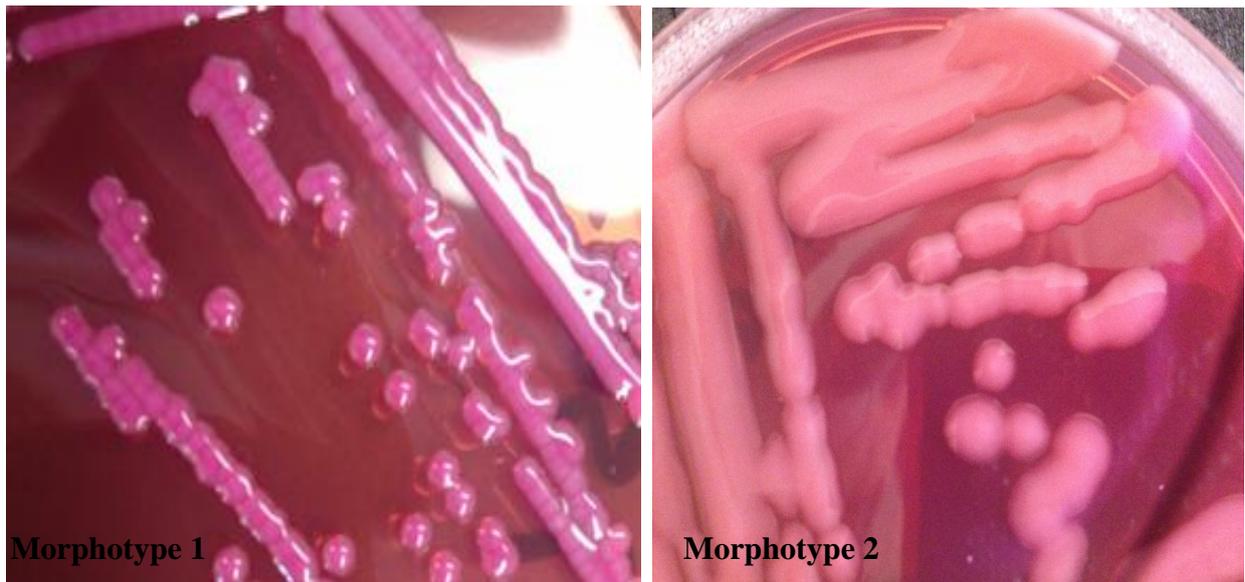
### 2.1 Aspect macroscopique

*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 13):

**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".

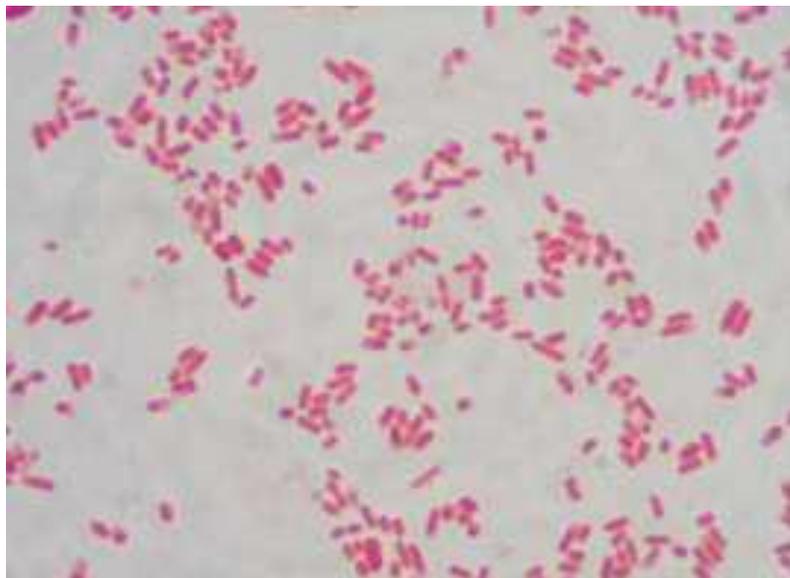
**Morphotype 2** : colonies muqueuses, lactose positif, épaisses, opaques, bombées, de consistance visqueuse et confluyente.



**Figure 13 :** Les deux morphotypes de *Klebsiella pneumoniae* sur le milieu Mac Conckey

## 2.2 Aspect microscopique

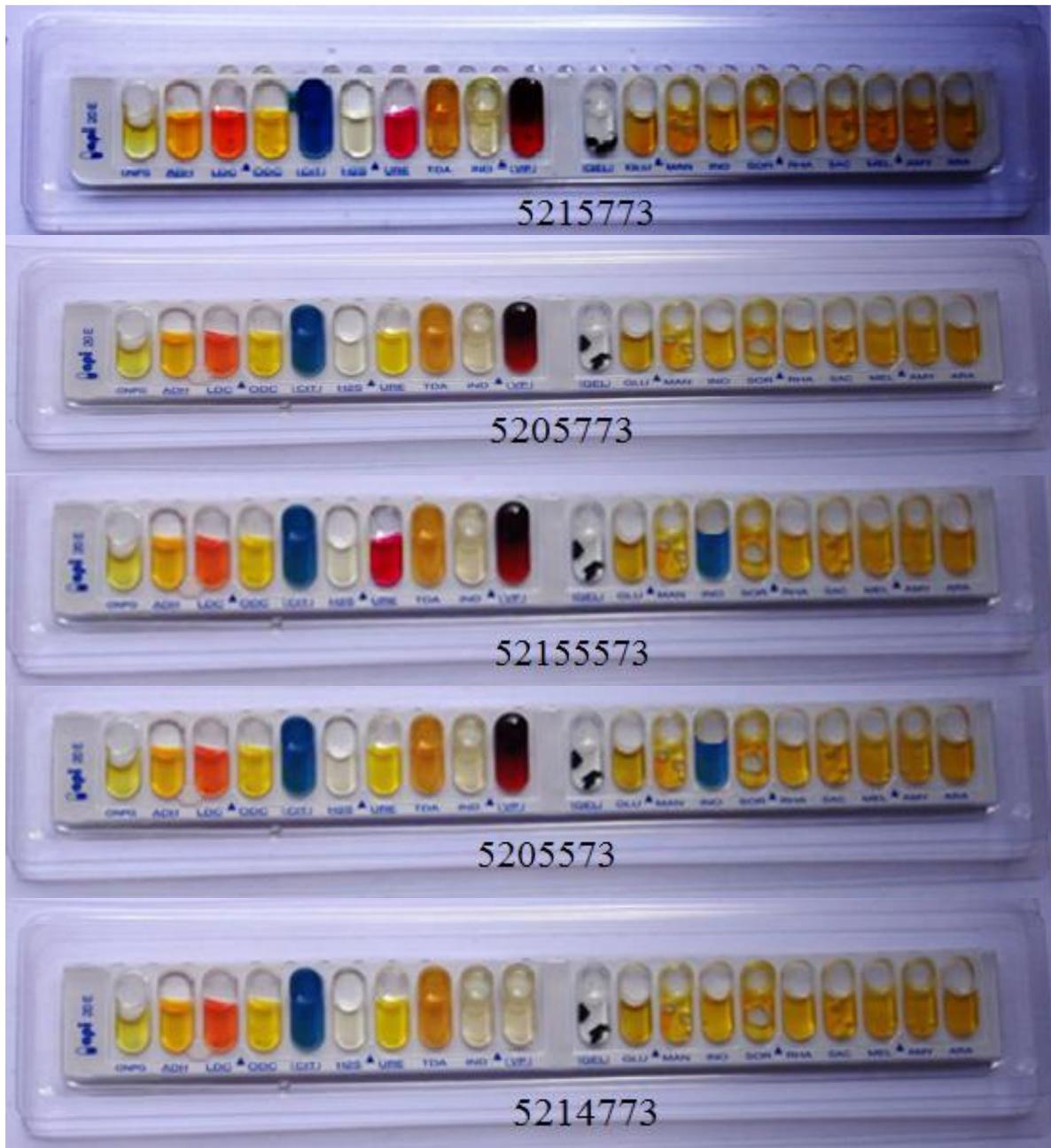
Toutes les souches isolées sont des bacilles à Gram négatif (Figure14), toujours immobile, donnant un aspect muqueux, assez typique.



**Figure 14 :** Examen microscopique après coloration de Gram.

### 2.3 Caractères biochimiques

L'identification par la galerie API 20E a permis de caractériser 115 souches de *Klebsiella pneumoniae*, avec cinq profils numériques différents: 5215773 (60/115), 5205773 (20/115 : urée -), 5215573 (17/115 : inositol-), 5205573 (13/115 : urée- inositol-) 5214773 (10/115 : VP-), (Figure 15).



**Figure 15 :** Identification de *Klebsiella pneumoniae* (galerie API20 E)

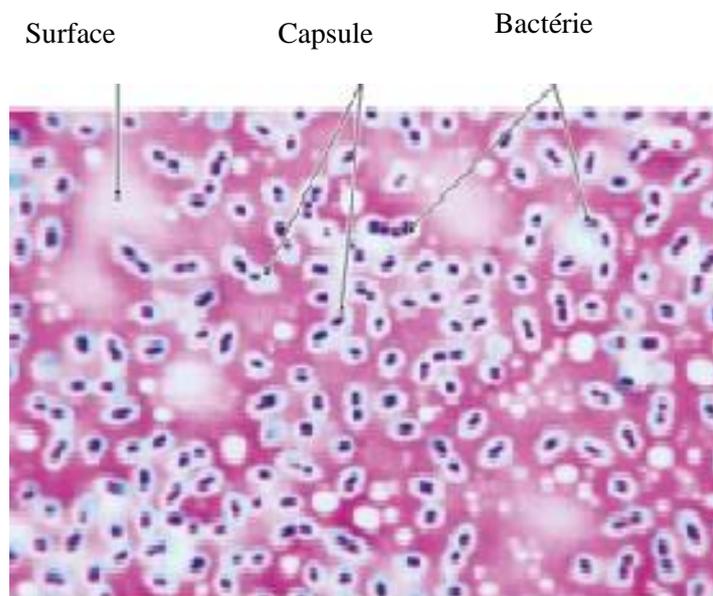
La prévalence de la colonisation par *K. pneumoniae* semble élevée dans la plupart des pays en développement témoignant d'une forte contamination de l'environnement hospitalier par cette bactérie et de la carence des mesures permettant de limiter sa transmission (Ben Jaballah *et al.*, 2006).

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, ce qui la place au 3<sup>ème</sup> rang des bacilles à Gram négatif après *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

### 2.3 Détection de la présence de la capsule des souches de *Klebsiella pneumoniae*

Presque tous les membres de la famille des *Enterobacteriaceae* sont capables de produire une capsule. En effet, un simple examen direct à l'état frais en présence d'encre de Chine diluée au 1/3 révèle la présence d'une capsule.

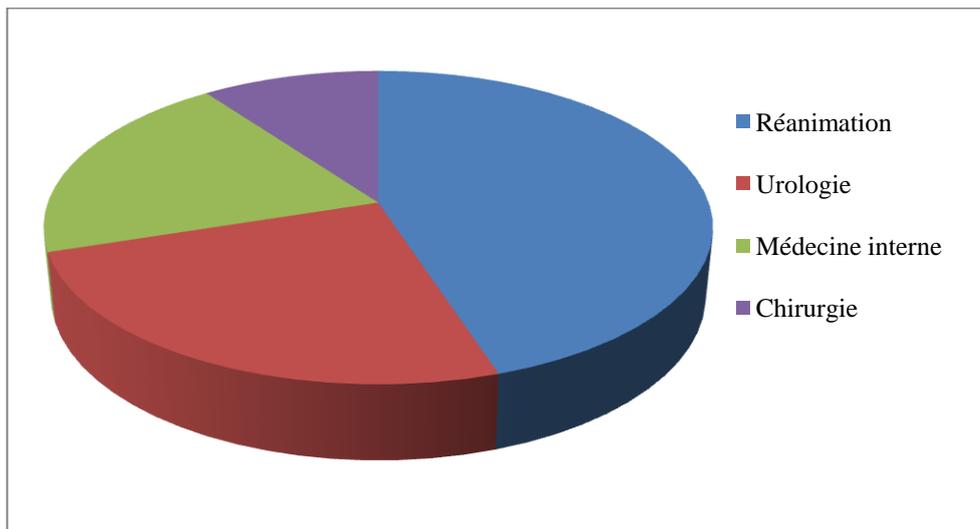
La capsule était visible comme un halo clair entourant chacune des 115 souches identifiées (Figure 16).



**Figure 16** : Détection de la capsule par l'encre de chine

### 3. Répartition des souches selon le service

La répartition des souches isolées des dispositifs médicaux chez des patients hospitalisés selon les services est comme suit : 45% étaient isolées au niveau du service de réanimation, 25% étaient isolées du service d'urologie, 20% étaient isolées du service de médecine interne et 10% du service de chirurgie (figure17).



**Figure 17 :** Répartition des souches de *K. pneumoniae* isolées des dispositifs médicaux dans différents services du CHU Tlemcen

Un grand pourcentage des souches a été isolé de service de réanimation. En effet la réanimation restera la discipline médicale où les infections nosocomiales sont les plus fréquentes. Cette situation est évidemment due à l'utilisation des dispositifs invasifs.

On a remarqué que le biotype 5215773 était dominant dans tous les services étudiés, ce qui indique sa grande dissémination. Alors que certains biotypes sont spécifiques pour certains services ; le 5205773 (urée -) a été retrouvé dans le service de chirurgie, le 5214773 (VP-) dans la médecine interne et la réanimation, le 52155573 (inositol-) dans le service l'urologie, le 5205573 (urée-, inositol-) dans le service de réanimation.

### 4. Répartition des souches selon le site d'isolement et la durée d'implantation

Chez tous les sujets en bonne santé une flore saprophyte à faible pouvoir pathogène est présente à des concentrations importantes dans certains sites. Cet équilibre écologique représente un des maillons essentiels de la défense antibactérienne, en empêchant le

développement de germes à haut niveau pathogène. Dès la première semaine d'hospitalisation la flore endogène normale est remplacée par une flore hospitalière, constituée de bacilles à Gram négatif et de levures. Cette modification de flore provient d'une exposition inhabituelle à des germes pathogènes et du déficit immunitaire du patient. L'infection est le résultat de l'interaction entre l'hôte et son agent (Léone *et al.*, 2000).

L'espèce *Klebsiella pneumoniae* est placée au premier plan des pathogènes opportunistes. L'importance médicale de cette espèce bactérienne est sa capacité à provoquer de nombreux types d'infections chez l'homme et à persister à la surface des implants médicaux.

L'implantation temporaire d'une sonde vésicale, d'une sonde d'intubation ou tubes endotrachéales est associée à un risque infectieux non négligeable, puisque 60 % des infections associées aux soins auraient pour origine un dispositif invasif (Espinasse *et al.*, 2012).

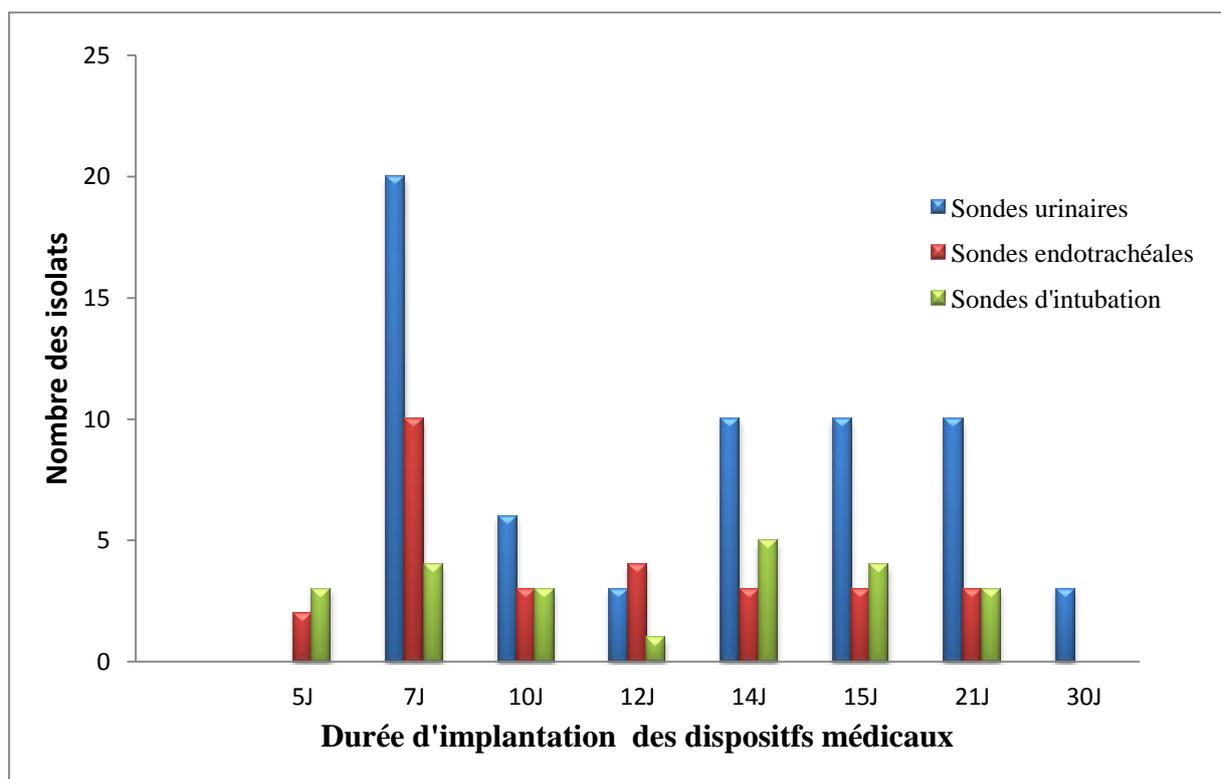
➤ Un grand pourcentage de nos souches (46.5%) est isolé à partir des sondes urinaires. En effet, la contamination de la sonde provient de l'entrée des germes dans le système clos, par infraction au moment d'une ouverture momentanée de ce système : soit au moment de la vidange de la poche, soit au moment de la déconnection entre la sonde et le tube collecteur lors du changement de la poche. Une fois arrivée dans le tube, le germe remonte vers la vessie soit en suivant l'humidité de la paroi, ou par son entraînement par un reflux d'urine.

La contamination directe de la sonde par le patient au niveau du méat urétral est fréquente et est responsable de 66% des infections urinaires ascendantes (Tambyah *et al.*, 1999).

La sonde urinaire perturbe le cycle de fonctionnement normal de la vessie et altère les moyens de défenses vésicales par une action mécanique sur l'endothélium et la couche de mucopolysaccharides acides aussi par une perturbation du transit urinaire (Botto, 2002).

➤ 28.3% de nos souches de *K. pneumoniae* sont isolées des tubes endotrachéales (TET). Effectivement l'insertion d'un tube endotrachéale peut produire des blessures et inoculer les bactéries par microaspiration de l'oropharynx dans le bas appareil de voie respiratoire, altérant dans ce cas les défenses de l'hôte en produisant des exopolysaccharides ce qui peut favoriser et générer la formation du biofilm sur ce dispositif médical permettant l'adhérence aux surfaces abiotiques et une protection contre l'action des antibiotiques (Rello, 1996).

➤ Quant aux sondes d'intubation *K. pneumoniae* était isolée avec une fréquence de 25.2%, la colonisation de la sonde d'intubation est essentiellement secondaire à la colonisation des voies aériennes inférieures. En 1999, Feldmann et ses collaborateurs ont étudié la chronologie de la migration bactérienne et démontré que la sonde d'intubation commençait à être colonisée à partir de la 60<sup>ème</sup> heure qui suit la colonisation des voies aériennes inférieures. Il existe une atteinte prédominante de l'extrémité distale de la sonde (Berra *et al.*, 2006). Contrairement à d'autres matériels biomédicaux placés dans des zones stériles (pacemaker et cavités cardiaques, prothèses et articulations, etc.) la sonde d'intubation est placée à travers la cavité oro-pharyngée atteignant la trachée où se trouvent de nombreuses bactéries résidentes (Boyer *et al.*, 2013) et d'autres qui peuvent les rejoindre en migrant de la sphère oropharyngée en suivant soit la surface externe de la sonde via le ballonnet, soit la surface interne lors des aspirations (Koerner, 1997).



**Figure 18 :** Répartition des souches selon la durée d'implantation des dispositifs médicaux

La présence de *Klebsiella pneumoniae* sur dispositifs médicaux peut être favorisée par la durée d'implantation de celui-ci. En effet et selon la figure 18, la durée d'implantation de

sondes urinaire chez différents patients allait de 7, 15, 21, voir même 30 jours avec une durée moyenne de 7 jours.

D'après Cartier et Lobel 1990, la prévalence de l'infection chez les sondés varie en fonction de la durée du sondage, elle serait de 15 à 30% au bout d'une semaine, 25 à 50% après deux semaines et 50 à 90% après un mois.

La durée d'implantation de sondes endotrachéales et de sondes d'intubation variait de 5 à 21 jours chez les patients ventilés en réanimation.

En conséquence, une durée prolongée favoriserait le développement des bactéries et la survenue d'infection nosocomiale sur ces dispositifs médicaux. C'est pourquoi plusieurs auteurs suggèrent de remplacer le dispositif médical avant une culture bactérienne, ce qui aurait pour effet d'augmenter la diffusion de l'antibiothérapie et de fournir des résultats plus valides (Shah *et al.*, 2005).

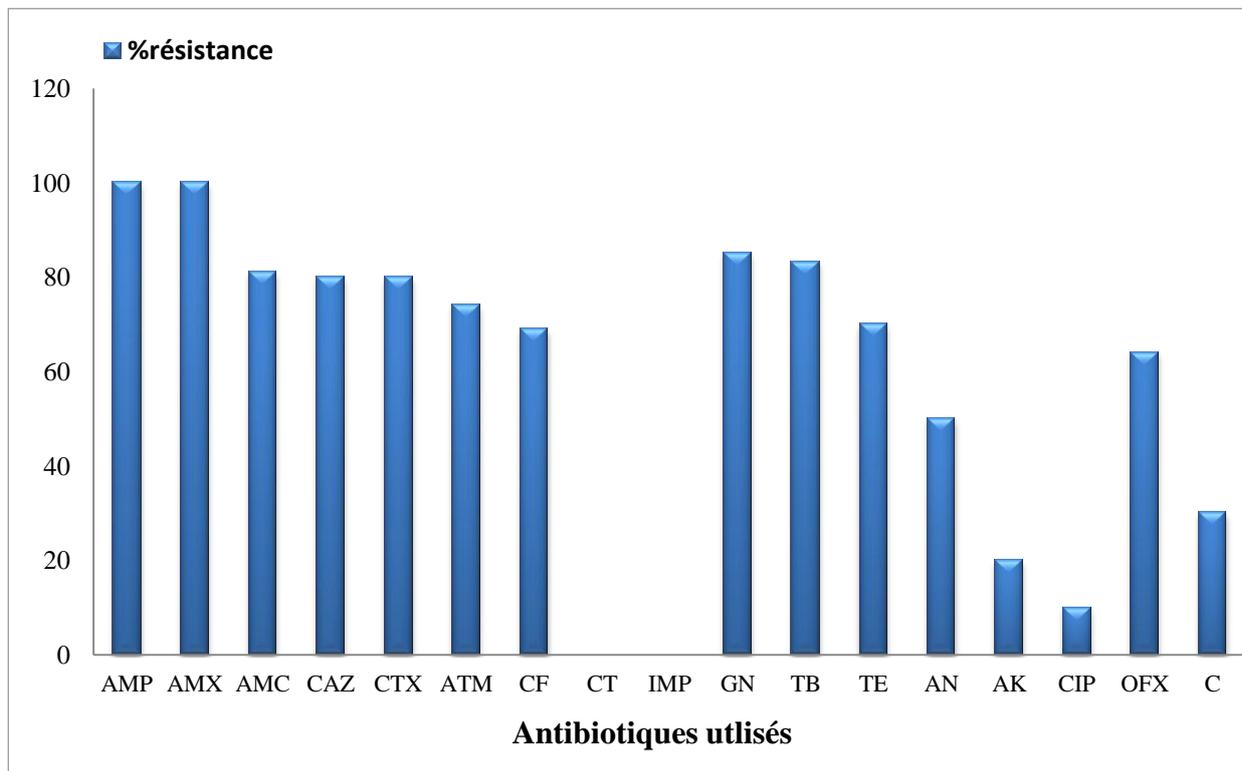
Si le dispositif médical n'est pas remplacé, plusieurs microorganismes seraient effectivement présents, ce qui pourrait conduire à une antibiothérapie erratique (Berthelot *et al.*, 2003).

Tout dispositif médical devrait être changé régulièrement plusieurs fois par semaine, par exemple : la sonde doit être changée rapidement en cas d'infections, lors d'un traitement antibiotique, lorsqu'elle est bouchée ou défectueuse. Dans une situation plus chronique et en milieu clinique, elle devrait être changée tous les 7 jours. Pour un patient chronique ayant peu de complications, le changement pourrait s'effectuer entre deux et six semaines [(Wyndaele *et al.*, 2001) ; (Tenke *et al.*, 2004)].

Afin de limiter la colonisation sur les dispositifs médicaux ; des mesures de prévention doivent être prises en considération. Un sondage urinaire régulier, l'application stricte des règles d'asepsie et mesures d'hygiène et le bon choix des biomatériaux.

### **5. Etude de la sensibilité de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques**

Un antibiogramme complet a été réalisé sur 115 isolats prélevés des 300 dispositifs médicaux. Etant donnés leurs phénotypes de résistance très différents, les fréquences de sensibilité pour chaque antibiotique ont été calculées et représentées dans la figure ci dessous.



**Figure 19:** Fréquence de résistance aux antibiotiques des souches *K. pneumoniae* isolées des dispositifs médicaux étudiés (CHU Tlemcen).

Selon la figure 19, les souches de *K. pneumoniae* isolées et identifiées présentent des fréquences de résistance élevées à la plupart des antibiotiques en particulier aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) dont les taux sont parmi les plus importants.

Ces mêmes souches révèlent des taux de résistance très élevés pour l'ampicilline (100%), l'amoxicilline (100%), l'amoxicilline/acide clavulanique (81%), la cefotaxime (80%), la ceftazidime (75%), la céfalotine (69%) et (74%) pour l'aztréoname.

Quant aux aminosides, le taux le plus important a été observé pour la gentamycine (85%), suivi de la tobramycine (83,33%), et de la tétracycline (70%).

En ce qui concerne les quinolones les taux de résistance sont les suivants : pour l'acide nalidixique 50%, et 64% pour l'ofloxacin.

En revanche une bonne activité de l'amikacine et de la ciprofloxacine a été remarquée avec respectivement 80%, 90% des souches sensibles.

Aucune résistance n'a été observée pour l'imipénème et la colistine (Figure 20).



**Figure 20:** Résultats d'antibiogramme d'une souche de *K. pneumoniae* isolée du service de réanimation

La majorité des 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).

### **6. Détection des BLSE des souches de *Klebsiella pneumoniae***

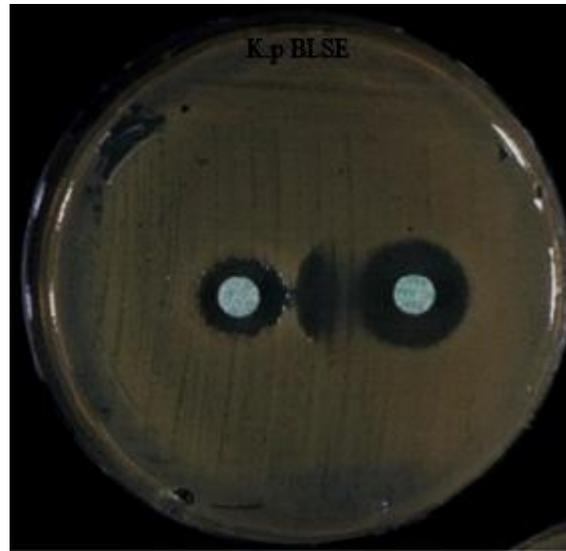
Les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE) ont émergé peu de temps après l'introduction des céphalosporines de troisième génération (C3G) (Philippon, 2013).

Les premières observations de BLSE ont été décrites en Europe et rapidement après, aux Etats-Unis à partir de 1988 où une nouvelle résistance à la ceftazidime et à l'aztréonam a permis de retrouver une nouvelle bêta-lactamase à transmission plasmatique chez une *K. pneumoniae*. Cette enzyme est transmise rapidement et facilement aux autres bacilles à Gram négatif dont *E. coli* [(Quinn *et al.*, 1989) ; (Zogheib et Dupont, 2005)] Leur impact est très important, surtout dans les services de réanimation avec de véritables épidémies [(Paterson *et al.*, 2001) ; (Zogheib et Dupont, 2005)]. Il a été démontré dans des études européennes précédentes que *K. pneumoniae* et *E. coli* étaient les espèces les plus fréquemment responsables de la sécrétion de BLSE (Hernandez *et al.*, 2005).

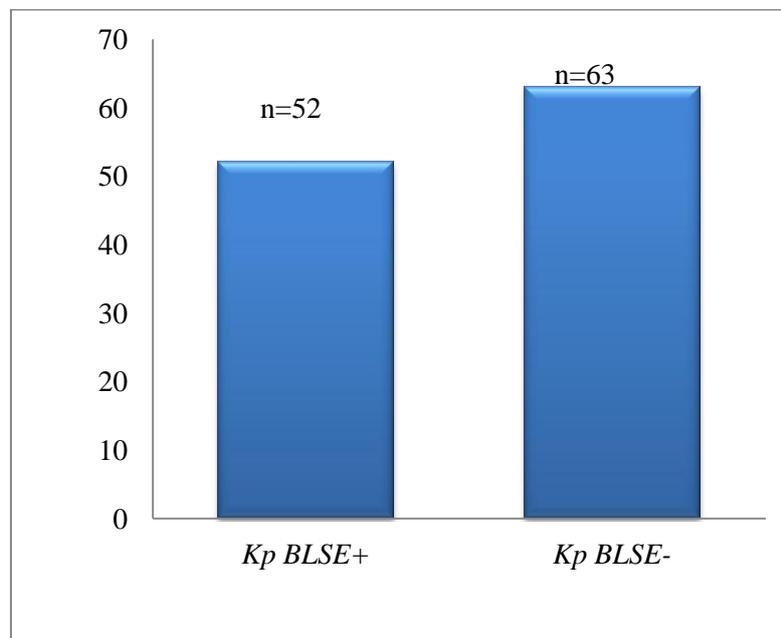
La résistance aux C3G dans notre étude était de l'ordre de 80 % et le pourcentage des souches BLSE était de 45,21% soit (52/115) (figure 21, 22), le service pourvoyeur de ces *K. pneumoniae* BLSE est essentiellement le service de réanimation.

En Algérie l'étude de Nedjai *et al.*, (2012) révèle des taux élevés de *K. pneumoniae* productrices de BLSE, des taux moins importants ont été obtenus dans une étude tunisienne

(Ben et Khedher, 2012). En Espagne ce taux est 20,8 % (Romero *et al.*, 2007). Les BLSE sont souvent déclarées pour être un problème hospitalier [(Pitout *et al.*, 2005); (Pitout et Laupland, 2008)].



**Figure 21** : Test de synergie permettant la détection de BLSE observé chez une souche de *K. pneumoniae*



**Figure 22** : Nombre de souches de *Klebsiella pneumoniae* BLSE+ isolées des dispositifs médicaux

52 patients étaient infectés par des souches de *Klebsiella pneumoniae* BLSE+, l'acquisition de ce phénotype de résistance a été détecté dès le 7<sup>ème</sup> jour d'hospitalisation des patients et se poursuivant jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour (tableau 3).

Selon le tableau 3, 13 patients ont acquis le phénotype BLSE+ au bout de quelques jours (3-5jours) essentiellement au niveau de service de réanimation dont deux tiers d'entre eux présentaient le même biotype, ce qui confirme leur dissémination entre les services.

**Tableau 3 :** Détection des BLSE chez les patients hospitalisés au cours de leur séjour

<i>K. pneumoniae</i>	Présence des BLSE							
	5J	7J	10J	12J	14J	15 J	21J	30J
<i>KP1</i>			BLSE					
<i>KP2</i>					BLSE			
<i>KP3</i>		BLSE-					BLSE+	
<i>KP4</i>			BLSE					
<i>KP5</i>				BLSE				
<i>KP6</i>							BLSE	
<i>KP7</i>		BLSE-					BLSE+	
<i>KP8</i>		BLSE-					BLSE+	
<i>KP9</i>		BLSE+					BLSE+	
<i>KP10</i>							BLSE	
<i>KP11</i>		BLSE-				BLSE+		
<i>KP12</i>		BLSE-				BLSE+		
<i>KP13</i>				BLSE				
<i>KP14</i>				BLSE				
<i>KP15</i>				BLSE				
<i>KP16</i>		BLSE-				BLSE+		
<i>KP17</i>				BLSE				
<i>KP18</i>		BLSE-				BLSE+		
<i>KP19</i>				BLSE				
<i>KP20</i>				BLSE				
<i>KP21</i>				BLSE				
<i>KP22</i>		BLSE-				BLSE+		
<i>KP23</i>							BLSE	
<i>KP24</i>						BLSE		
<i>KP25</i>							BLSE	
<i>KP26</i>							BLSE	
<i>KP27</i>		BLSE-				BLSE+		

## Résultats et discussion

KP28	BLSE-	BLSE+
KP29		BLSE
KP30		BLSE
KP31		BLSE
KP32		BLSE
KP33		BLSE
KP34	BLSE	
KP35		
KP36		BLSE
KP37	BLSE	
KP38		BLSE
KP39		BLSE
KP40		BLSE
KP41	BLSE	
KP42		BLSE
KP43		BLSE
KP44		BLSE
KP45		BLSE
KP46		BLSE
KP47		BLSE
KP48	BLSE	
KP49		BLSE
KP50		BLSE
KP51		BLSE
KP52		BLSE

Effectivement un travail portant sur la résistance de *K. pneumoniae* au CHU de Tlemcen a révélé des taux élevés des BLSE (parmi 71 souches cliniques d'entérobactéries, 50 souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été productrices de BLSE) avec une dissémination et une acquisition des gènes codant pour les BLSE, cette acquisition est liée à la circulation de plasmides entre les souches étudiées [(Baba Ahmed *et al.*, 2012) ; (Baba Ahmed, 2013)].

La production d'une BLSE reste le mécanisme de résistance prépondérant aux céphalosporines à large spectre chez cette espèce.

Néanmoins, depuis une dizaine d'années, d'autres mécanismes de résistance ont émergé chez *K. pneumoniae* tel que la production d'enzymes de type AmpC. Ces  $\beta$ -lactamases plasmidiques sont souvent associées à d'autres gènes de résistances aux antibiotiques et constituent un réel problème en thérapeutique.

L'émergence de ces souches de *Klebsiella pneumoniae* multirésistantes est désormais un fait établi au CHU de Tlemcen. Une meilleure maîtrise en termes d'hygiène hospitalière (formation du personnel aux règles préventives, connaissance de l'écologie locale, isolement des porteurs...) et un meilleur contrôle de la consommation en antibiotiques au sein de l'établissement seraient toutefois des facteurs favorisant une meilleure maîtrise de cette émergence.

### **7. Evaluation de la formation du biofilm *in vitro* par trois techniques**

Vu le prolongement de la durée d'implantation et la multirésistance des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées des dispositifs médicaux chez tous les patients étudiés, il apparaît donc indispensable de connaître et savoir si toutes ces souches sont capables de former un biofilm pouvant être responsable des situations précitées.

La surface d'adhésion des organismes sessiles peut être abiotique (les matériaux inertes) ou biotique (les tissus ou les cellules vivantes) (Dune, 2002). Toute surface naturelle ou artificielle peut être le siège d'une colonisation bactérienne avec formation d'un biofilm. C'est le cas de toutes les variétés d'implants biomédicaux.

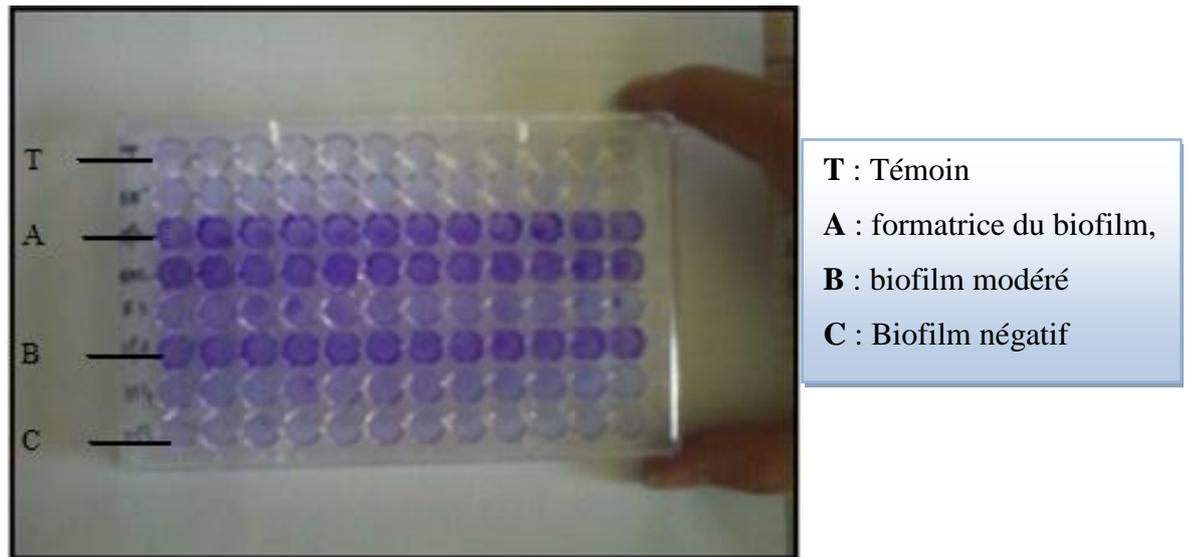
Le passage d'un mode de vie planctonique à un mode de biofilm est un processus dynamique et complexe, régulé par de nombreux facteurs exogènes et endogènes. Il est caractérisé par un changement radical de phénotype et par l'acquisition de propriétés spécifiques aux biofilms.

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

Des méthodes classiques de la détection de la production de biofilm *in vitro* ont été établies, telles que la méthode qualitative en tube TM (Christensen *et al.*, 1982), la méthode quantitative de la microplaque 96puits [(Freeman *et al.*, 1989); (Mathur *et al.*, 2006)], et la méthode qualitative du Rouge Congo (Mathur *et al.*, 2006).

Les 115 souches isolées lors de cette étude ont été testées pour leur capacité à former des biofilms par les trois techniques.

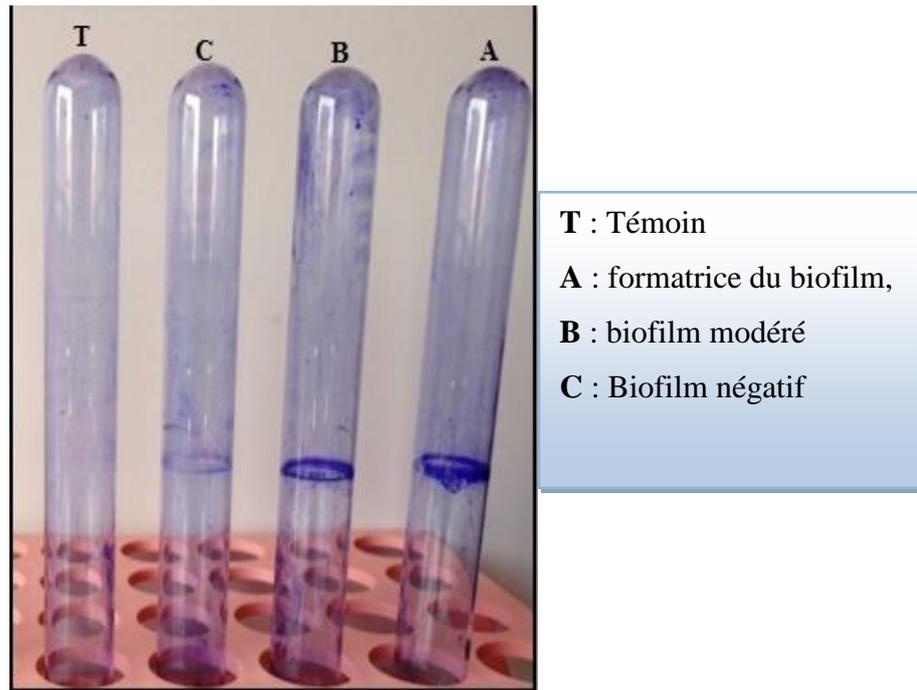
La technique de microplaque 96 puits a montré que 51 souches sont de bonnes formatrices de biofilm, 35 sont modérées et 20 souches sont non formatrices (Figure 23).



**Figure 23** : Evaluation de la production de biofilm par la méthode TCP

Selon la technique TM et sur l'ensemble des souches (115), 30 souches ont été fortement formatrices du biofilm, 65 souches étaient modérément et 20 souches ont été non formatrices du biofilm (Figure24).

La méthode TM semble facile à réaliser mais la lecture des résultats peut-être difficile, car plusieurs auteurs stipulent que la formation du biofilm est considérée comme positive quand un film visible recouvre le mur et le bas du tube alors que d'autres considère que la formation d'un anneau à l'interface liquide n'est pas indicative de la formation du biofilm (Mathur *et al.*, 2006).



**Figure 24:** Evaluation de la production de biofilm par la méthode TM

La recherche de la production de slime sur milieu rouge Congo révèle 85 souches productrices de slime contre 30 non productrices. Les souches productrices de slime avaient un phénotype variable ou positif (Figure 25).



**Figure 25 :** Phénotype de production de slime chez *K. pneumoniae* sur milieu RCA.

Suite à toutes ces techniques et selon plusieurs auteurs la méthode de rouge Congo semble être moins efficace pour détecter la formation du biofilm in vitro.

La détection du biofilm par les méthodes TM et TCP semblent plus fiables à celle du rouge Congo (tableau 4).

Nos résultats concordent avec ceux d'Oli *et al.*, (2012), où ils montrent que la technique TCP est la plus fiable pour la détection de la formation de biofilm chez des souches cliniques.

L'étude de Knobloch *et al.*, (2002) suggèrent que le dépistage par le rouge congo ne peut être recommandé pour évaluer la formation de biofilm pour les isolats de *K. pneumoniae*. De même Mathur *et al.*, (2006) ont récemment découvert que PIA (polysaccharides adhesins intracellulaires) qui influe sur la formation de *Staphylococcus aureus* ne peut pas être détectée par la méthode du rouge Congo.

Taj *et al.*, (2012) ont montré que le dépistage par la technique de rouge Congo n'est pas recommandé pour l'étude de la formation de biofilm et que les résultats obtenus par la technique TM sont bien corrélé avec les résultats obtenus par la microscopie électronique.

La comparaison de la production de biofilm de nos *K. pneumoniae* par ces trois méthodes conventionnelles est rapportée dans le tableau 4.

**Tableau 4:** Résultats de la formation du biofilm par les deux techniques TM, TCP et RCA

Technique	Nombre des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i>		
	Absence	Modéré	Fort
TM	20	65	30
Microplaque	29	35	51
RCA	30	65	20

Par conséquent nous pensons que la technique TCP peut être recommandée comme méthode de dépistage rapide et général pour la détection des bactéries productrices de biofilms *in vitro*.

A travers cette étude la plupart des souches isolées des sondes urinaires de type latex sont de bonnes formatrices de biofilm.

Le biofilm microbien s'installe en 24 à 72 heures après la pose de la sonde. Les espèces de *Klebsiella pneumoniae* dotées d'une uréase sont présentes dans le biofilm, elles

hydrolysent l'urée en ammoniac libre induisant une augmentation du pH urinaire et la précipitation de minéraux sous forme de cristaux de struvite ou d'hydroxyapatite qui s'incrustent sur la sonde. L'incrustation qui siège autour du ballonnet et dans la lumière de la sonde entraîne une réduction du canal de drainage et une stagnation des urines, favorisant ainsi la survenue de bactériurie. C'est une particularité du biofilm des sondes vésicales (Espinasse *et al.*, 2010).

Qu'elles que soient l'acquisition endoluminale ou extraluminale, les bactéries qui colonisent la sonde croissent sous forme de microcolonies enchâssées dans un biofilm qui les protège.

La formation du biofilm se produit selon une séquence bien établie : les bactéries adhèrent à la surface du corps étranger, s'y multiplient et secrètent du " slime " ou " glycocalyx ", une matrice polysaccharidique extra-cellulaire. Les sels urinaires et les protéines urinaires de l'hôte telle la protéine de Tamm-Horsfall s'incorporent dans cette matrice, formant des incrustations à la surface de la sonde pouvant se développer dans un délai bref.

50% des souches isolées des tubes endotrachéales de type PVC étaient des bonnes formatrices du biofilm. Des auteurs ont déjà montré une prévalence élevée du biofilm sur ces dispositifs, même sur de courtes périodes d'implantation (Feldman *et al.*, 1999).

En outre, l'insertion d'un tube endotrachéale peut produire des blessures et inoculer les bactéries endogènes de l'oropharynx dans le bas appareil de voie respiratoire ce qui favorise la formation du biofilm sur ce dispositif médical (Rello, 1996).

20% des souches isolées des sondes d'intubation ont été formatrices du biofilm. Sottile *et al.*, (1986) sont les premiers à avoir montré au microscope électronique que 84 % des sondes d'intubation sont recouvertes sur toute leur surface par un biofilm. La concentration bactérienne peut atteindre  $10^6$  UFC/cm de sonde.

Inglis *et al.*, (1989) trouvent les mêmes bactéries formatrices du biofilm sur les deux surfaces (interne et externe) de la sonde d'intubation.

Les autres facteurs jouant un rôle sur la formation du biofilm sont le débit des gaz délivrés par le ventilateur et la qualité de la sonde elle-même. Quoiqu'il en soit, dès que les bactéries rencontrent la surface de la sonde, la formation du biofilm s'organise, le plus souvent sous forme sessile (Koerner, 1997) puis est régulée sous l'influence de signaux biochimiques (par quorum sensing) (Berra *et al.*, 2012). Le développement du biofilm peut finalement amener à l'obstruction progressive de la sonde (Boyer *et al.*, 2013).

Domka *et al.*, (2007) confirment qu'une durée supérieure ou égale à 7 jours favorise une bactériurie urinaire qui pourrait prendre origine d'un biofilm.

Nos résultats et observations concordent avec ces études montrant que la durée d'implantation du dispositif médical influence considérablement la formation du biofilm.

D'après ces résultats on a constaté que les souches isolées de sondes urinaire en latex sont considérées comme de bonnes formatrices du biofilm par rapport à celles isolées des tubes endotrachéales et des sondes d'intubation de nature PVC. En effet, le latex est souvent irritant et susceptible de provoquer des inflammations de l'urètre et en partie détruit par l'alcalinité des urines.

Huang *et al.*, (2005) suggèrent l'utilisation de sondes en silicone à la place de sondes en latex chez les patients nécessitant une durée d'hospitalisation prolongée.

Abd El-Baky en 2012 rapporte que l'adhérence microbienne sur les biomatériaux se produit dans l'ordre suivant: latex > silicone > PVC > Téflon > Polyuréthane > Acier > titanium.

La nature du dispositif médical (DM) joue aussi un rôle important dans la formation du biofilm. Où le constituant de ce dernier doit répondre à certains critères dont la biocompatibilité tissulaire, flexibilité, solidité et surface la plus lisse possible.

### **8. Etude de l'effet de trois antibiotiques sur la forme planctonique et biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae***

Seules 24 souches de *K. pneumoniae* isolées de sondes urinaire et de tubes endotrachéales ont été retenues pour cette partie, le choix a été fait selon leur biotypie, antibiotypie, production de BLSE, la présence d'une capsule et leurs grandes capacités de former le biofilm

De nombreux problèmes associés au développement des biofilms en milieu médical, ont pour origine leur résistance extrêmement élevée aux agents antibactériens (antibiotiques et désinfectants). Cette résistance accrue est multifactorielle, est liée aux conditions de vie dans le biofilm (hétérogénéité, accès aux nutriments, oxygène etc.). Elles modifient les propriétés physiologiques des micro-organismes et induisent des mécanismes de résistance spécifiques qui s'ajoutent aux mécanismes de résistance connus (Lewis, 2008).

Alors que les progrès de la médecine moderne permettent de lutter efficacement contre de nombreuses maladies infectieuses, celles qui sont liées à la présence de biofilms, échappent largement à ce type de traitements. Les antibiotiques sont en effet très peu efficaces contre les biofilms et les symptômes peuvent réapparaître après traitement.

En conséquence l'éradication et/ou l'inhibition de la formation du biofilm reste un sérieux problème de santé publique.

Afin de comparer l'effet des ATB sur les deux formes de bactéries, une détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales inhibitrices du biofilm CMIB vis-à-vis de 3 antibiotiques largement utilisés dans les services étudiés (gentamycine cefotaxime ciprofloxacine) a été recherché (tableau 5).

**Tableau 5:** Effet des trois antibiotiques sur la forme planctonique et la forme biofilm

Souches N=24	Gentamycine mg/L		Cefotaxime mg/L		Ciprofloxacine mg/L	
	CMI	CMIB	CMI	CMIB	CMI	CMIB
<i>Kp5</i>	<b>0.128</b>	2.56	1.024	<b>10</b>	0.5	<b>1</b>
<i>Kp14</i>	<b>0.128</b>	2.56	1.024	<b>10</b>	0.5	<b>1.05</b>
<i>Kp15</i>	<b>0.512</b>	10	0.512	<b>5</b>	1	<b>1.05</b>
<i>Kp21</i>	<b>0.512</b>	10	0.512	<b>5</b>	1	<b>1</b>
<i>Kp23</i>	<b>1.024</b>	10	1.024	<b>10</b>	1	<b>1.05</b>
<i>Kp24</i>	<b>0.128</b>	10	1.024	<b>10</b>	0.5	<b>1</b>
<i>Kp3</i>	<b>0.512</b>	10	0.128	<b>10</b>		
<i>Kp6</i>	<b>0.512</b>	10	0.128	<b>10</b>		
<i>Kp9</i>	<b>0.256</b>	10	0.256	<b>3</b>		
<i>Kp11</i>	<b>0.256</b>	10	0.256	<b>3</b>		
<i>Kp16</i>	<b>1.024</b>	10	1.024	<b>10</b>		
<i>Kp2</i>	<b>0.512</b>	10	1.024	<b>10</b>		
<i>Kp7</i>			2.048	<b>15</b>		
<i>Kp8</i>			2.048	<b>10</b>		
<i>Kp10</i>			2.048	<b>15</b>		
<i>Kp12</i>			0.256	<b>1.5</b>		
<i>Kp13</i>			0.256	<b>1.5</b>		
<i>Kp17</i>			0.512	<b>1.5</b>		
<i>Kp18</i>			1.024	<b>10</b>		
<i>Kp19</i>			0.256	<b>1.5</b>		
<i>Kp20</i>			0.128	<b>1.5</b>		
<i>Kp22</i>			0.256	<b>3</b>		
<i>Kp1</i>			1.024	<b>1.5</b>		
<i>Kp4</i>			0.128	<b>1.5</b>		

De façon générale, nos résultats montrent que les concentrations minimales inhibitrices de la forme biofilm (âgé de 24heures) de toutes les souches sélectionnées (n= 24) étaient plus importantes que les CMI de la forme planctonique.

Notons que les CMIBs étaient respectivement 25 fois plus élevée que la CMI de la forme planctonique vis-à-vis de la céfotaxime, 10 fois plus élevée pour la gentamicine et doublement plus élevée pour la ciprofloxacine (Tableau 5).

En effet, Verma *et al.*, (2010) ont montré que le biofilm jeune de *Klebsiella pneumoniae* peut être éradiqué de façon significative par un seul traitement par la ciprofloxacine.

Plusieurs travaux ont montré une différence de sensibilité aux antibiotiques entre les populations planctoniques et les populations du biofilm de *K. pneumoniae*, tel que les travaux de Ceri *et al.*, (1999) qui ont obtenus des résultats similaires par l'utilisation des dispositifs du Calgary.

De même Singla *et al.*, (2012) ont montré que *K. pneumoniae* en mode de croissance biofilm était plus résistante à des antibiotiques qu'en mode planctonique, les valeurs CMIB étaient identiques ou huit fois plus élevée que leurs correspondants CMI ; Il a été observé que l'amikacine à une concentration de 40 µg /mL était capable d'éradiquer les jeunes biofilms mais avec l'augmentation de l'âge du biofilm, il est devenu totalement inefficace due à une production accrue d'exopolysaccharide.

Ito *et al.*, (2009) en étudiant l'effet de la pénétration des agents antimicrobiens dans les biofilms d'*Escherichia coli*, ils ont montré une résistance accrue vis-à-vis des sous populations dans les couches profondes de biofilms matures et que la production et la résistance de ces dernières ont été facilitées par les phénotypes spécifiques du biofilm d'*Escherichia coli*.

Les concentrations antimicrobiennes nécessaires pour inhiber les biofilms bactériens peuvent être 10-1000 fois plus élevées que celles qui sont nécessaires pour inhiber les mêmes bactéries sous forme planctonique (Simoès, 2011). La nature moléculaire de cette résistance apparente n'a pas été bien élucidée, et un certain nombre de mécanismes ont été proposées pour expliquer la diminution de la pénétration des antibiotiques (Ito *et al.*, 2009).

Les bactéries dans les biofilms diffèrent d'un point de vue physiologique et métabolique des homologues planctoniques, cette différence est due à la résistance accrue des biofilms aux agents antimicrobiens (Bedi *et al.*, 2009).

La capacité des bactéries à développer une résistance aux antibiotiques et à coloniser les surfaces abiotiques en formant des biofilms est une cause majeure d'infections associées aux implants médicaux, ce qui engendre une prolongation des périodes d'hospitalisation ainsi qu'un taux élevé de mortalité.

Plusieurs approches de lutte contre les biofilms ont été décrites. Certaines consistent à rechercher des molécules qui interfèrent avec les mécanismes de communication nécessaires au développement de ces communautés microbiennes. De telles molécules empêcheraient les biofilms d'acquiescer l'organisation responsable de ses propriétés de résistance. D'autres, consistent à rechercher des molécules qui bloquent la synthèse de la matrice, car elle constitue l'armure de protection des microorganismes. Enfin, il faut chercher à développer des surfaces anti-biofilm par recouvrement des surfaces de matériaux avec des agents antimicrobiens qui inhiberaient ou réduiraient la formation des biofilms.

Par conséquent, l'identification de nouveaux agents antimicrobiens qui inhibent ou détruisent les biofilms est très nécessaire.

### **9. Résultats d'hydrophobicité de quelques souches de *Klebsiella pneumoniae***

Le mode de vie des bactéries en biofilm est responsable d'infection sur dispositifs et implants médicaux est souvent liée la structure pariétale de la bactérie et la nature de surface.

L'adhérence peut se faire sur différents supports, chacun ayant des caractéristiques d'hydrophobicité et de charges de surface différentes, ce qui peut favoriser ou non l'adhérence microbienne en fonction des souches bactériennes utilisées.

L'hydrophobicité de la cellule est basée sur des composés liés à la membrane externe comprenant des lipopolysaccharides, lipoprotéines et l'acide lipotéichoïques. L'orientation de ces composés sur la membrane externe détermine l'hydrophobicité de la cellule (Neu, 1996).

La plupart des bactéries à Gram négative ont de longues chaînes de polysaccharides dans leur lipopolysaccharides exposé, ayant pour résultat une surface hydrophile tandis que les bactéries à Gram positive ont la partie de lipide d'acide lipotéichoïques se prolonger à l'extérieur de la cellule, ayant pour résultat une surface hydrophobe (Frank, 2001).

Les polysaccharides peuvent être chargés ou neutres influençant ainsi l'adhésion des cellules au support ainsi que l'agrégation intercellulaire (Sutherland, 2001). Leur charge électrique peut varier suite à la modification du milieu due à la consommation des nutriments, aux rejets cellulaires et à la capture d'ions par la matrice de polysaccharides (Briandet, 1999).

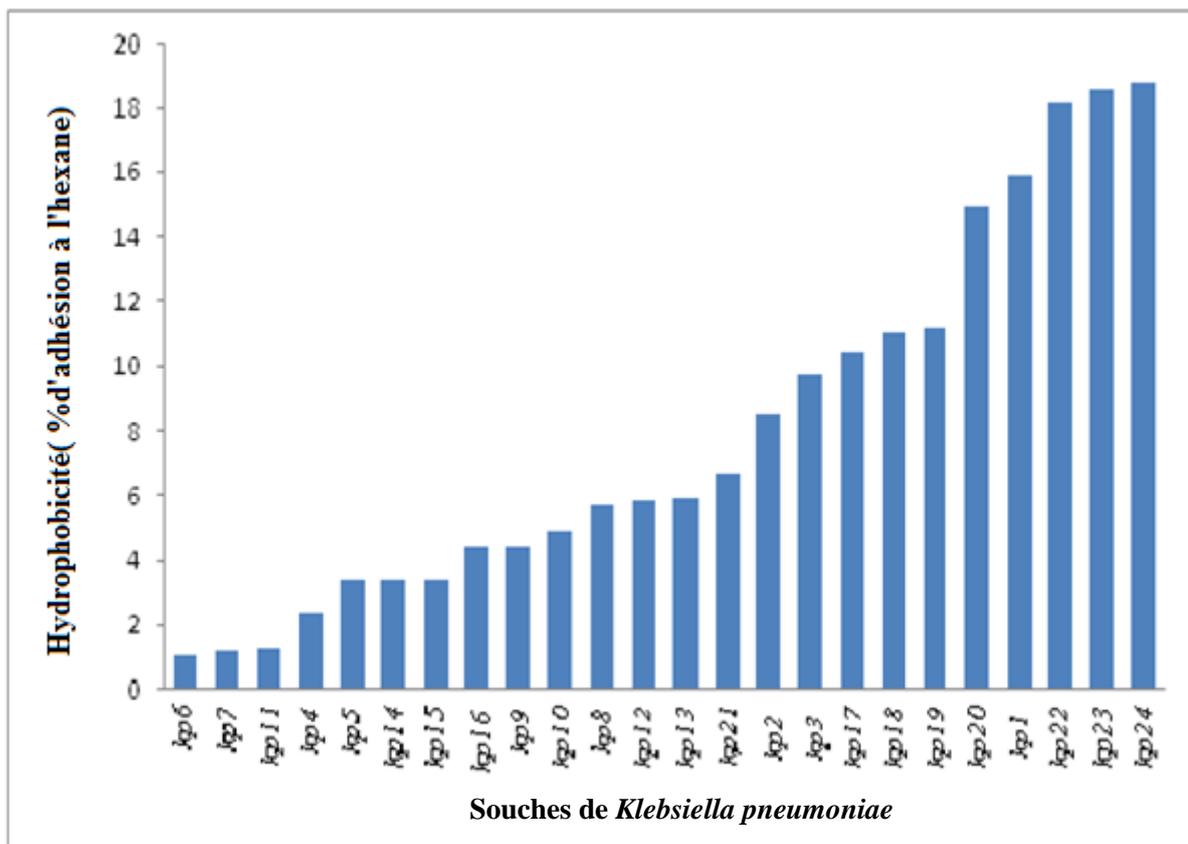
L'hydrophobicité de surface peut être estimée soit par mesure d'angle de contact entre substrat et bactérie, soit par le test MATS (*microbial adhesion to solvents*). La méthode MATS consiste à mettre en contact une suspension bactérienne de densité optique (DO) connue avec un solvant. Après une brusque agitation, des microgouttelettes de solvants

se forment sur lesquelles la bactérie adhère ou non, en fonction de l'hydrophobicité la mesure de la DO de la phase aqueuse permet de déterminer le pourcentage d'adhésion au solvant, indiquant si la bactérie est plutôt hydrophobe ou plutôt hydrophile.

La surface des cellules est considérée hydrophobe lorsque ce pourcentage est supérieur à 20% et relativement hydrophile dans le cas contraire.

On constate selon la figure 26, que la valeur moyenne d'adhésion à l'hexane est inférieure à 20%, nous permettant ainsi de dire que toutes nos souches étudiées ont une surface très hydrophile.

Rappelons que toutes nos souches de *Klebsiella pneumoniae* présentaient une capsule polysaccharidique ce qui expliquerait en partie leurs caractère hydrophile.



**Figure 26 :** Affinité pour l'hexane des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées des dispositifs médicaux

A cet effet Brisse *et al.*, (2006) stipulent que les souches de *K. pneumoniae* sont entourées par une capsule polysaccharidique et sont généralement hydrophile et responsable de l'aspect muqueux et brillant des colonies sur gélose.

Certains auteurs considèrent que l'hydrophobicité de la surface bactérienne est le paramètre clé qui gouverne l'adhésion bactérienne aux supports inertes [(Jana *et al.* , 2000) ; (Cappello *et al.*, 2006)].

Plusieurs travaux ont montré la diversité de l'hydrophobicité de *Klebsiella pneumoniae*, tel que le travail de Dimartino *et al* en 2003 où 43,4% de l'ensemble de ses souches sauvages étaient hydrophiles.

Les variations de l'hydrophobicité dépend du mode de la croissance bactérienne (Gilbert *et al.*, 1991) et des conditions de culture (Spenceley *et al.*, 1992). L'hydrophobicité peut également être modifiée par des traitements mécaniques et enzymatiques (Rosenberg et Kjelleberg, 1986)

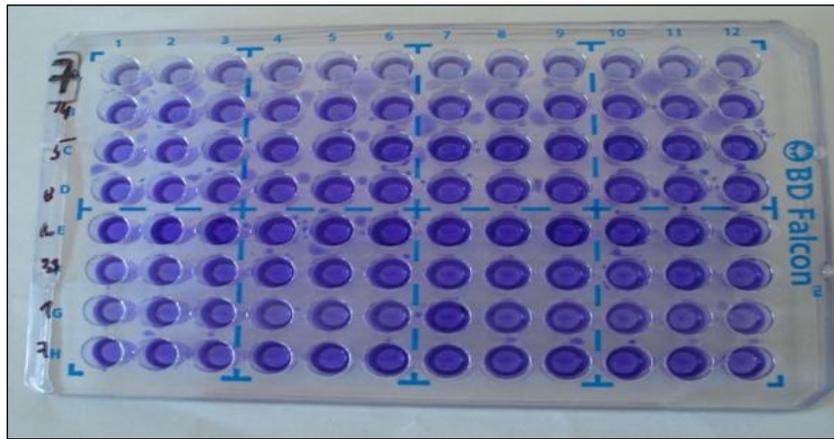
Des observations montrent que l'hydrophobicité varie avec la température et le stade de croissance (Chavant *et al.*, 2002). En 1998 Smoot et Pierson montrent également que l'hydrophobicité augmente quand la température de croissance diminue.

### **10. Formation de biofilm sur les microplaques en PVC et le microfermenteur**

Afin de mieux comprendre et expliquer la formation du biofilm des 24 souches de *Klebsiella pneumoniae* sélectionnées sur deux systèmes expérimentaux : statique en microplaques de polyvinyl-chloride (PVC) et dynamique en flux continu microfermenteur, un travail a été réalisé au laboratoire Microorganismes : Génome Environnement (LMGE) Université D'Auvergne, Clermont-Ferrand, France sous la direction du professeur Christiane Forestier.

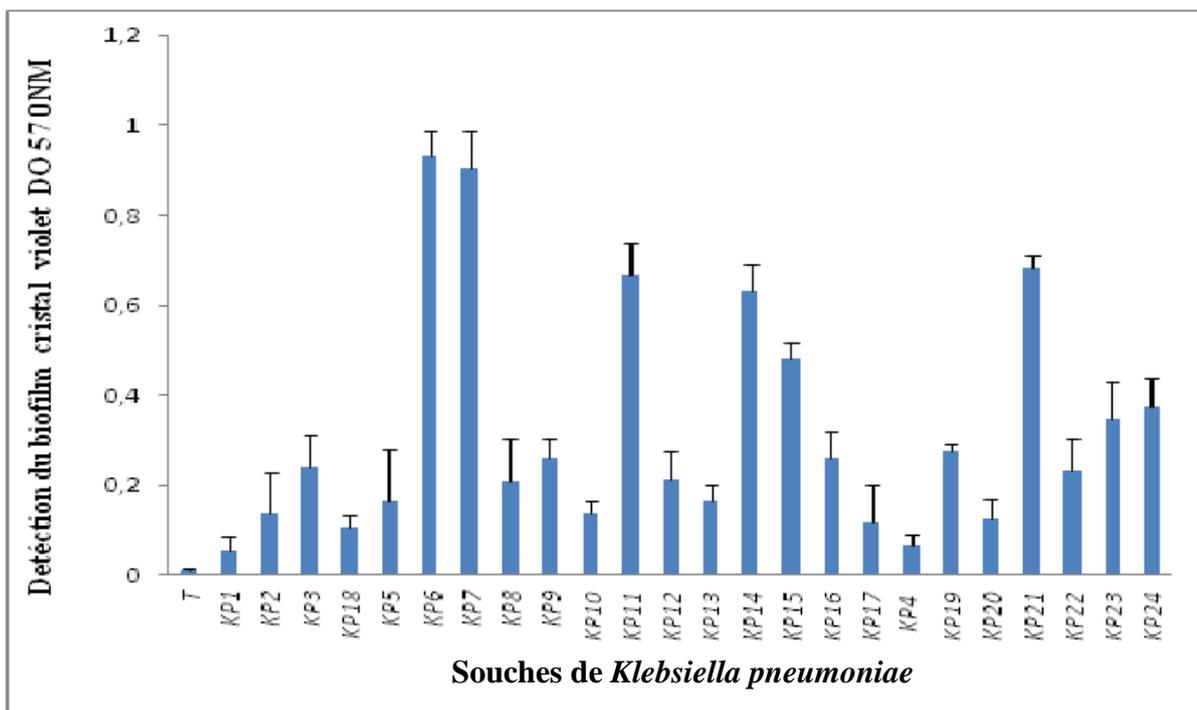
#### **10.1 Analyse de la formation de biofilm sur les microplaques en PVC**

Après 24h d'incubation, la masse bactérienne accumulée au sein des biofilms formés sur microplaques en PVC est quantifiée par coloration des bactéries adhérentes (la quantité de colorant étant alors directement proportionnelle à la quantité de bactéries) (figure 27).



**Figure 27 :** Formation du biofilm sur microplaque BD Falcon en PVC. La formation du biofilm a été quantifiée par le cristal violet

Sur les 24 souches, 12 d'entre elles ont été fortement formatrice du biofilm avec une DO comprise entre 0.48 et 0.93, 10 souches ont été modérément productrices et 2 souches ont été considérées comme non formatrices (Figure 28).

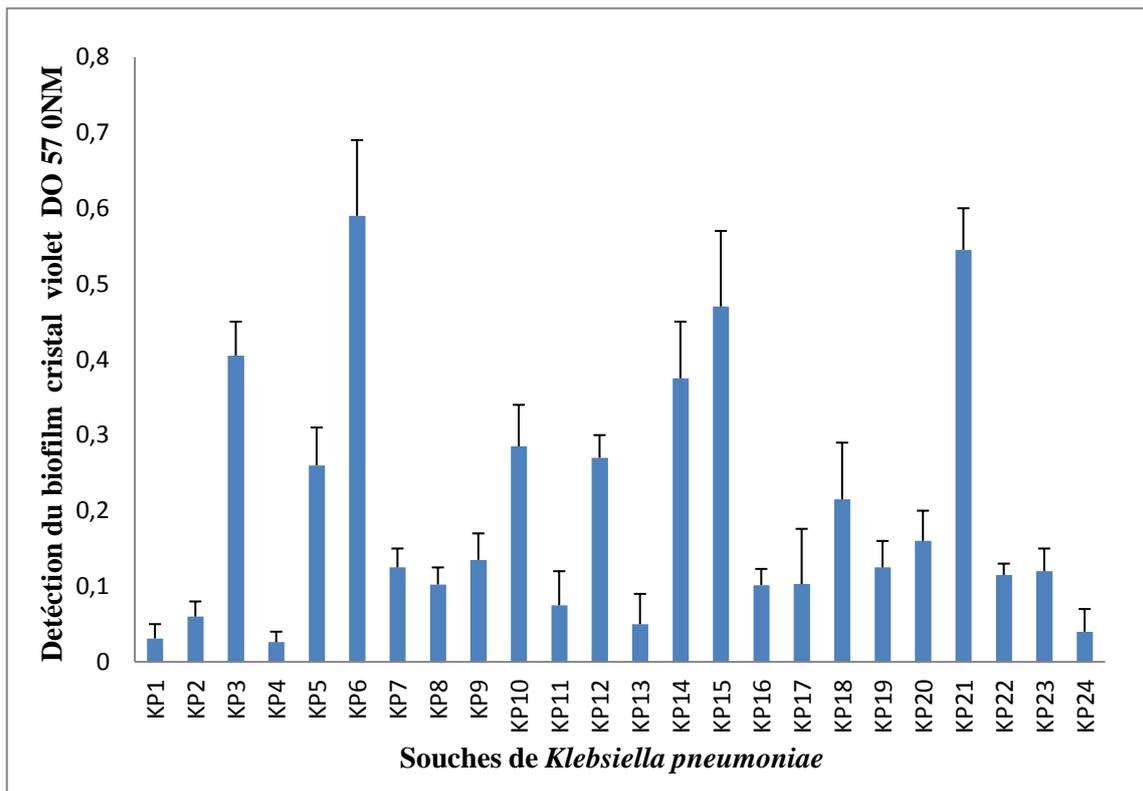


**Figure 28:** Quantification des biofilms formés par des souches de *K. pneumoniae* en microplaque pendant 24 heures dans M36B1 glucose + 0,4% en mesurant la DO à 570 nm. La formation du biofilm a été quantifiée par le cristal violet. Les valeurs sont des moyennes des trois expériences indépendantes. KP3, KP6, KP14, KP15, KP21, KP5, Formatrice du biofilm; KP2, KP6, KP7, KP11, KP14, KP15, KP21, KP23, KP24, KP9, KP16, KP19, KP3: Formatrice du biofilm; KP2, KP4, KP5, KP17, KP18, KP20, KP10, KP8, KP3, KP13, modérément formatrice du biofilm; KP1, KP18: non formatrice

### 10.2 Analyse de la formation du biofilm par le microfermenteur

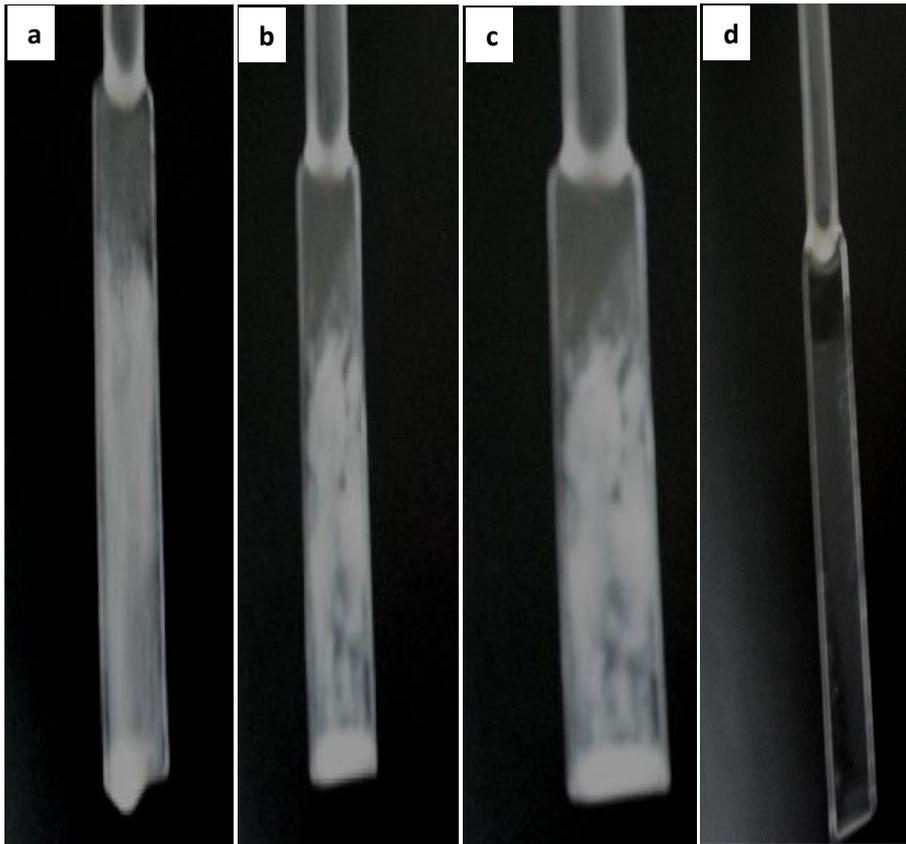
Après 24h d'incubation les bactéries fixées sur les lamelles de verre (Figure 29) sont quantifiées par mesure de la densité optique comme décrit précédemment.

Selon la figure 30 ; six isolats ont été des forts producteurs du biofilm tandis que 14 ont été modérés et 2 isolats ont été non producteurs du biofilm.



**Figure 29:** Quantification des biofilms formés par des souches de *K. pneumoniae* en microfermenteur dans M36B1 glucose + 0,4% en mesurant la DO à 570 nm.

*KP3, KP6, KP14, KP15, KP21, KP5*, formatrice du biofilm; *KP2, KP7, KP8, KP9, KP11, KP16, KP17, KP19, KP20, KP22, KP23, KP10, KP12, KP13, KP18, KP24*, modérément formatrice ; *KP1, KP4*, non formatrice du biofilm



**Figure 30** : Des exemples d'adhésion des souches de *Klebsiella pneumoniae* sur les lames de microfermenteur : **a, b, c**: forte adhésion, **d**: faible adhésion

La formation du biofilm par *Klebsiella pneumoniae* a été testée sur deux surfaces abiotiques, verre (hydrophile) et PVC (hydrophobe), qui sont souvent présents dans plusieurs habitats de *K. pneumoniae* en milieu hospitalier.

Quelques auteurs ont observé dans certains cas que l'adhésion des bactéries hydrophobes est plus importante sur les supports hydrophobes et celle des bactéries hydrophiles est plus importante sur les supports hydrophiles (Bellon-Fontaine *et al.*, 1990).

Sur les 24 souches de *K. pneumoniae*, 6 souches adhèrent fortement et efficacement respectivement sur les lames de microfermenteur (verre) et sur PVC. Cela peut être expliqué par le fait que ces 6 souches présentaient un caractère très hydrophile par rapport aux autres isolats.

Concernant le reste des souches la formation du biofilm sur substrat hydrophobe PVC était plus importante que le support verre (les lamelles du microfermenteur).

Selon nos résultats il n'existe aucune relation entre l'hydrophobicité et la formation du biofilm puisque toutes nos souches présentaient un caractère hydrophile et la majorité

d'entre elles étaient de bonnes formatrices du biofilm sur support hydrophobe (PVC) (tableau 6).

**Tableau 6 :** La relation entre la formation du biofilm (PVC, microfermenteur) et l'hydrophobicité

Souches	Formation de biofilm sur PVC	Formation de biofilm en microfermenteur	Hydrophobicité
<i>Kp1</i>	-	-	Hydrophile
<i>Kp2</i>	+	+	Hydrophile
<i>Kp3</i>	+	+	Hydrophile
<i>Kp4</i>	-	-	Hydrophile
<i>Kp5</i>	+++	+++	Hydrophile
<i>Kp6</i>	+++	+++	Hydrophile
<i>Kp7</i>	+++	+	Hydrophile
<i>Kp8</i>	+++	+	Hydrophile
<i>Kp9</i>	+++	+	Hydrophile
<i>Kp10</i>	+++	+++	Hydrophile
<i>Kp11</i>	+++	+	Hydrophile
<i>Kp12</i>	+	+	Hydrophile
<i>Kp13</i>	+	+++	Hydrophile
<i>Kp14</i>	+++	+++	Hydrophile
<i>Kp15</i>	+++	+	Hydrophile
<i>Kp16</i>	+++	+	Hydrophile
<i>Kp17</i>	+	+	Hydrophile
<i>Kp18</i>	+	+	Hydrophile
<i>Kp19</i>	+	+	Hydrophile
<i>Kp20</i>	++	+	Hydrophile
<i>Kp21</i>	+++	+++	Hydrophile
<i>Kp22</i>	+	+	Hydrophile
<i>Kp23</i>	+++	+	Hydrophile
<i>Kp24</i>	+++	+	Hydrophile

+++ Bonne formatrice du biofilm; + Modérément formatrice du biofilm ; - Non formatrice du biofilm

Plusieurs auteurs ont observé que l'adhésion des bactéries hydrophobes est généralement supérieure à celle des bactéries hydrophiles (Bayouhd *et al.*, 2006).

Gallardo-Moreno *et al.*, (2002) ont observé pour deux souches de *Candida parapsilosis* isolées du sang, que l'adhésion était proportionnelle au caractère hydrophobe de la souche et qu'un changement de température contribue à augmenter le caractère hydrophobe favorisant encore l'adhésion.

Le même auteur a rapporté que l'adhésion *Enterococcus faecalis* est plus importante sur le silicone (hydrophobe) comparé au verre (hydrophile), cette adhésion étant potentialisée par un changement de la composition du milieu de culture qui induisait une augmentation du caractère hydrophobe des souches bactériennes.

Bruinsma *et al.*, (2001) montrent également que sur deux types de lentilles de contact, l'une présentant un caractère hydrophobe et l'autre hydrophile, une souche hydrophobe (*P. aeruginosa*) adhère mieux qu'une souche hydrophile (*Staphylococcus aureus*).

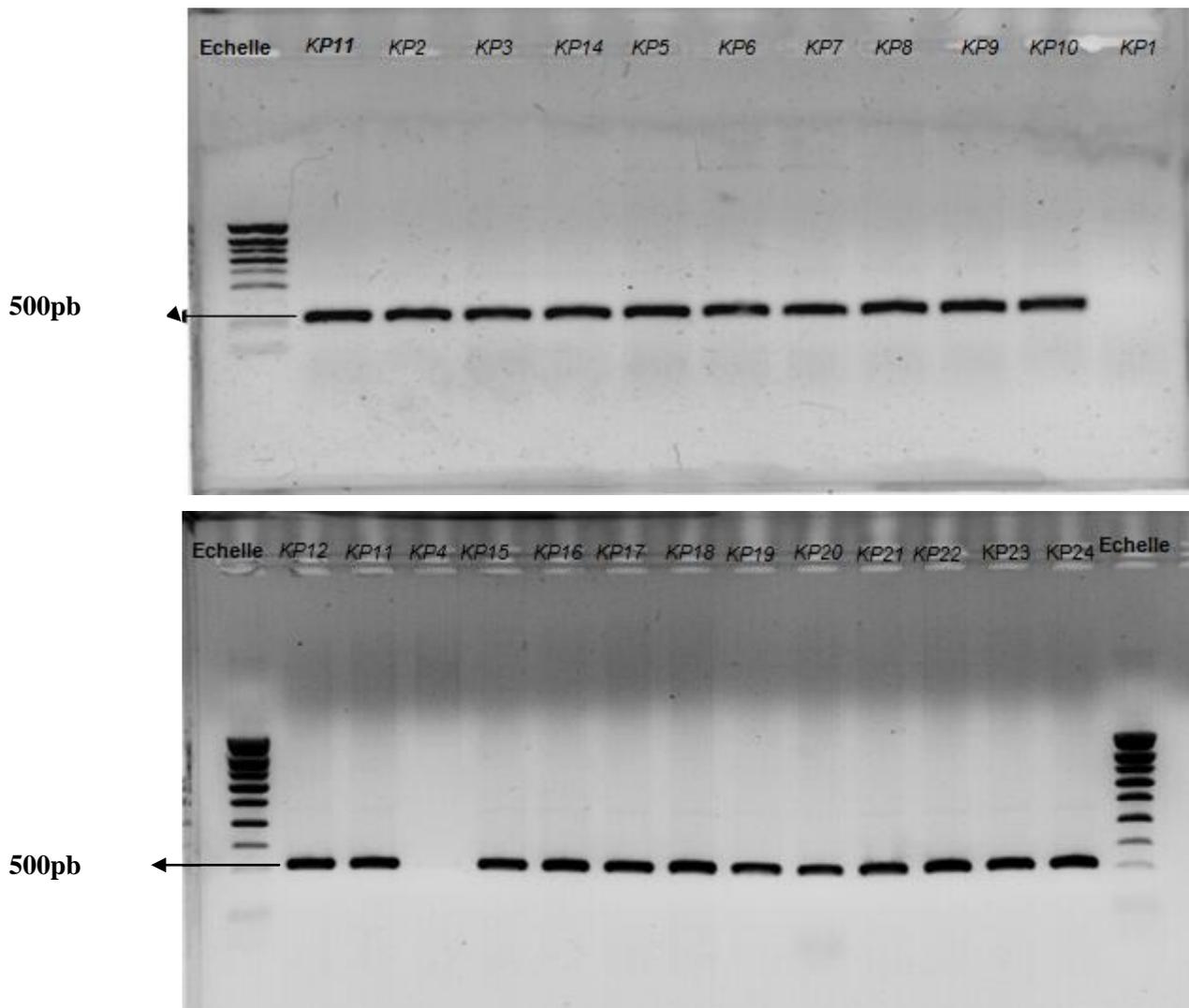
Egalement, Bayouhd *et al.*, (2006) ont observé que *Pseudomonas stutzeri* (hydrophobe) adhère mieux que *Staphylococcus epidermidis* (hydrophile) quelque soit l'hydrophobicité du support.

Ceci montre qu'il existe encore des controverses entre les différents auteurs à ce sujet. Ce type de contradictions existe jusqu'à l'heure actuelle dans ce domaine, car le phénomène d'adhésion ne peut pas être traité seulement en raisonnant par rapport à l'hydrophobicité, mais en prenant compte d'autres paramètres tels que les autres propriétés physico-chimiques des cellules bactériennes et des surfaces colonisables (caractère acide-base et charge globale des cellules bactérienne), qui constituent les principaux facteurs contrôlant l'adhérence initiale bactérienne. Il ne faut pas oublier en outre que ces propriétés sont elles-mêmes sensibles aux conditions physicochimiques du milieu de suspension, au moins pour le partenaire bactérien [(van Oss *et al.*, 1986) ; (Bellon-Fontaine *et al.*, 1990) ; (Bos *et al.*, 1999) ; (Gallardo Moreno *et al.*, 2002) ; (Hamadi *et al.*, 2004) ; (Bayouhd *et al.*, 2006)].

## 11. Etude des facteurs influençant sur la formation du biofilm de *Klebsiella pneumoniae*

### 11.1 Détection des pili de type3 codant le gène MrkD

L'ADN des 24 souches de *K. pneumoniae* sélectionnées a été analysé par PCR pour rechercher et mettre en évidence le gène MrkD responsable de l'adhésion sur surface abiotique. Les résultats sont présentés dans la Figure 32.



**Figure 31** : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification du gène *mrkD* dans les souches

*K. pneumoniae* est un pathogène opportuniste fréquemment associé à des infections chez les patients hospitalisés avec sondes urinaires ou tubes endotrachéales menant à l'acquisition des infections nosocomiales des voies urinaires et respiratoires, respectivement. L'insertion de ces dispositifs entraîne également des dégâts localisés aux surfaces épithéliales, conduisant à la formation d'une autre niche écologique où les pili de type 3 pourraient jouer un rôle dans le processus infectieux (Johnson et Clegg, 2010). De plus ces dispositifs médicaux à demeure favorisent la formation du biofilm de *K. pneumoniae* en fournissant une surface inerte pour la fixation des adhésines bactériennes, améliorant ainsi la colonisation microbienne et le développement du biofilm (Yang *et al.*, 2013).

Les pili sont des adhésines majeures chez de nombreuses espèces bactériennes, leur petite taille leur permet de passer facilement la barrière de répulsion et d'assurer la liaison de la bactérie au support.

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)].

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 piliée 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)].

Les fimbriae de type 3 ont été identifiés comme des appendices de médiation de la formation de biofilms sur des surfaces biotiques et abiotiques (Murphy et Clegg, 2012).

Des études antérieures ont révélé que les fimbriae de type 3 jouent un rôle important dans la formation biofilm de *K. pneumoniae* [(Langstraat *et al.*, 2001) ; (Jagnow et Clegg, 2003); (Johnson *et al.*, 2011)].

Yang *et al.* (2013) ont montré que l'agent pathogène *K. pneumoniae*, facilite la colonisation de surfaces biotiques et abiotiques dont la formation des biofilms par cette bactérie nécessite l'expression des fimbriae de type 3.

Dans le présent travail sur les 24 souches de *K. pneumoniae*, 22 avaient les pili de type 3. Toutes proviennent de patients sondés et ventilés pendant un temps d'implantation supérieure ou égal à sept jours.

Les 22 souches présentant les pili de type 3 étaient soit fortement soit modérément formatrices du biofilm, contrairement aux deux autres non formatrices.

Nos résultats confirment les travaux précédents démontrant que les fimbriae de type 3 favorisent la formation du biofilm de *K. pneumoniae*.

Contrairement à l'étude de Di Martino *et al.*, 2003 où la présence des pili de types 3 n'engendre pas la formation du biofilm chez des souches cliniques de *K. pneumoniae* ce qui impliquerait d'autres facteurs responsables de l'adhésion des souches de *Klebsiella pneumoniae* sur des surfaces abiotiques.

### 11.2 Effet des BLSE et de la capsule sur la formation du biofilm

*Klebsiella pneumoniae* est souvent impliquée dans les infections liées aux biofilms, et elle est l'une des espèces les plus communes connues pour produire les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) [(Woodford *et al.*, 2004); (Pitout *et al.*, 2005)].

Les  $\beta$ -lactamases à Spectre étendu (BLSE) sont très dynamiques et constituent un problème croissant en raison de leur activité d'hydrolyse contre les céphalosporines de troisième génération tels que céfotaxime, ceftazidime, et le monobactame aztréonam souvent utilisés dans le traitement des infections acquises aux hôpitaux [(Romero *et al.*, 2005); (Dechen *et al.*, 2009)].

Rappelons que parmi les 115 souches isolées 52 souches sont des productrices des BLSE dont la moitié d'entre elles sont des bonnes formatrices du biofilm.

Ceci pourrait certainement avoir une relation entre la production des BLSE et la formation du biofilm.

Cette hypothèse a déjà été retenue par Melzer *et al* en 2008, sur un total de 150 souches de *K. pneumoniae* (113 étaient isolées des crachats, 24 isolées à partir de l'urine, sept du sang et six prélèvements des plaies), les souches productrices de BLSE avaient une capacité de former le biofilm.

Ils ont conclu que dans le cas de maladies respiratoires ou les infections des voies urinaires par *K. pneumoniae*, associées aux dispositifs médicaux, la production de BLSE et la formation du biofilm devraient être considérés dans la thérapie antimicrobienne.

Hennequin et Forestier (2010) démontrent que la présence d'une capsule et de plasmides codant pour la production de BLSE sont impliqués dans l'adhésion des souches de *Klebsiella pneumoniae* sur les cellules intestinales.

De même la capsule est associée à des stades de développement du biofilm et qui présente une résistance accrue aux antibiotiques. La capsule est impliquée dans l'adhérence de la bactérie aux cathéters, sondes et autres dispositifs médicaux, dont elle favorise la colonisation. Elle augmente également l'adhérence des bactéries aux cellules intestinales et des bactéries entre elles (Schembri *et al.*, 2005).

Dzul *et al.* (2010) ont trouvé que la capsule des souches clinique de *K. pneumoniae* contribue à la structure des agrégats du biofilm.

Les infections bactériennes sont la cause majeure de la morbidité et de la mortalité en milieu hospitalier dont la majorité peut être due à *K. pneumoniae*. L'importance médicale de cette espèce bactérienne est sa capacité à provoquer de nombreux types d'infections chez l'homme et à persister à la surface des implants médicaux. La présence d'un film protéique sur les implants médicaux en contact direct avec un fluide favorise l'adhésion et la formation des biofilms par *K. pneumoniae*.

Ce travail nous a permis de montrer que sur 300 dispositifs médicaux récoltés dans différents services du CHU de Tlemcen, 200 étaient infectés. Les sondes urinaires semblent être les plus chargées en bactéries avec des seuils atteignant les  $3,45 \cdot 10^8$  UFC/ml.

Ces résultats nous permettent d'évaluer et d'approcher la définition de critère de qualité d'un service de soins. La surveillance des dispositifs invasifs et de leurs infections reste un objectif prioritaire des services à grand risque afin de croire la crédibilité de la structure hospitalière et de diminuer les infections nosocomiales.

Après analyse bactériologiques de différents dispositifs médicaux, 115 souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été isolées, ce qui montre la complexité des infections à *Klebsiella pneumoniae* en milieu hospitalier. Toutes les souches identifiées étaient capsulées à biotypes variables dont 45,21% étaient productrices de BLSE.

De plus, au sein de cette espèce, nous avons pu observer qu'un grand nombre de souches ont acquis le caractère BLSE après un court séjour d'hospitalisation au CHU de Tlemcen.

L'évaluation de formation de biofilm de nos isolats par les trois techniques (TCP, TP, RCA) a révélé que la TCP donne de bons résultats et peut être recommandée comme méthode de dépistage général pour la détection des bactéries productrices de biofilms *in vitro*.

Les souches de *K. pneumoniae* isolées des sondes urinaires étaient des bonnes formatrices du biofilm à celles isolées des deux autres dispositifs médicaux.

Comme nous l'avons repris à divers niveaux du présent travail, l'importance des biofilms sur dispositifs médicaux tient entre autre à leurs fortes résistances (rôle de la matrice d'exopolysaccharides) et à la difficulté d'imprégnation par les antibiotiques. La faible efficacité de certains antibiotiques étudiés lors de ce travail tel la cefotaxime la gentamycine et la ciprofloxacine vis-à-vis des *Klebsiella pneumoniae* sessiles expliquerait la nécessité de rechercher d'autres moyens de lutte.

La formation de biofilms est influencée par le type de support, de façon générale, la rugosité, l'hydrophobicité d'une surface et la présence préalable de films protéiques

influent l'attachement des micro-organismes à cette surface et favorisent la formation d'un biofilm.

L'adhésion des microorganismes aux surfaces serait un facteur non négligeable dans la résistance bactérienne aux antibiotiques ce qui pourrait expliquer l'émergence très rapide de *Klebsiella pneumoniae* BLSE dans notre étude.

Pour certains auteurs, l'hydrophobicité des surfaces des microorganismes est généralement considérée comme un facteur qui gouverne le phénomène d'adhésion. La technique MATS a révélé que 24 sur 115 souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées présentaient un caractère hydrophile. Ce caractère peut être lié à la présence de la capsule polysaccharidique des isolats.

Malgré que la formation du biofilm sur surface hydrophobe (microplaque en PVC) était plus importante comparée au support hydrophile (les lames de microfermenteur), six de nos souches présentaient non seulement une forte capacité de former le biofilm sur PVC mais également sur les lames du microfermenteur.

Dans notre étude, La formation du biofilm ne peut pas être traitée seulement en raisonnant par rapport à l'hydrophobicité, mais également par la présence de quelques facteurs tel la présence du gène MrkD qui code les pili de type 3 (détecté par la technique PCR) et responsable de la formation du biofilm sur surface abiotique.

Celui-ci était présent chez 22 souches de *K. pneumoniae* ce qui explique leur adhésion et en conséquence leur pathogénicité.

De même la production des BLSE et la présence de capsule pourraient certainement être responsables de la formation du biofilm.

Compte tenu des infections associées aux dispositifs invasifs étudiés, des programmes de surveillance rigoureux devraient être proposés à notre CHU et à tous les établissements de soins, respecter les conditions d'asepsie recommandées pour la pose et pour la manipulation de ces dispositifs, et particulièrement la désinfection des mains par friction hydroalcoolique et la préparation cutanée du site d'insertion. Le facteur de risque majeur de ces infections étant la durée d'exposition au dispositif, obtenir un consensus sur les indications pertinentes et veiller à la justification du maintien du dispositif constituent un axe de prévention de ces infections associées aux dispositifs invasifs.

Enfin nous disons que la caractérisation et la connaissance d'autres facteurs spécifiques impliqués dans la formation du biofilm par cette bactérie pathogène constituerait une nouvelle approche dans la compréhension de l'installation du biofilm, sa conception et la mise au point d'une thérapeutique antimicrobienne.

Celles-ci permettront de traiter les dispositifs médicaux de façon à inhiber la fixation des bactéries impliquées dans la formation du biofilm.

## Références bibliographiques

---

- Abd El-Baky RM (2012).** Application of Scanning Electron Microscopy for the Morphological Study of Biofilm in Medical Devices. *Technology*. 591-616.
- Agladze K., Wang X., Romeo T. (2005).** Spatial periodicity of *Escherichia coli* K-12 biofilm microstructure initiates during a reversible, polar attachment phase of development and requires the polysaccharide adhesin PGA. *Journal of Bacteriology*. 187:8237-46.
- Ahmer B.M., Van Reeuwijk J., Timmers C.D., Valentine P.J., Heffron F. (1998).** *Salmonella typhimurium* encodes an SdiA homolog, a putative quorum sensor of the LuxR family that regulates genes on the virulence plasmid. *Journal of Bacteriology*. 180:1185-93.
- Allen B.L., Gerlach G.F., Clegg S. (1991).** Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*. 173:916-20.
- Anwar H., Van Biesen T., Dasgupta M., Lam K., Costerton J. W. (1989).** Interaction of biofilm bacteria with antibiotics in a novel in vitro chemostat system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 33(10): 1824-6.
- Archibald LK, Gaynes RP. (1997).** Hospital acquired infections in the United States: The importance of interhospital comparisons. *Nosocomial Infection*. 11: 245-255.
- Arlet G., Sanson-le Pors M.J., Rouveau M., Fournier G., Marie O., Schlemmer B., Philippon A. (1990).** Outbreak of nosocomial infections due to *Klebsiella pneumoniae* producing .SHV-4 beta-lactamase. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 9:797-803.
- Baba Ahmed Z. (2013).** Etude de la résistance aux antibiotiques des bactéries à gram négatif au niveau de CHU de Tlemcen. Thèse de Doctorat Université de Tlemcen , Algérie.
- Baba Ahmed Z., Ayad A., Mesli E., Messai Y., Bakour R., Drissi M. (2012).** CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae in the intensive care unit of Tlemcen Hospital, Algeria. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 18(4).
- Bagley ST., Seidler R.J., Talbot HWJ., Morrow JE. (1978).** Isolation of *Klebsiellae* from within living wood. *Applied and Environmental Microbiology*. 36:178-85.
- Balaban N.A., Giacometti O., Cirioni Y., Gov R., Ghiselli F., Mocchegiani C., Viticchi M.S., Del Prete V., Saba G., Scalise Dell'Acqua. (2003).** Use of the quorum-sensing inhibitor RNAIII-inhibiting peptide to prevent biofilm formation in vivo by drug-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Infection and Diseases*. 187:625–630.
- Balestrino D. (2006).** Formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae* : facteurs impliqués et rôle du quorum-sensing. Thèse de doctorat Clermont Ferrand. France p7-9.

## Références bibliographiques

---

- Bayoudh S., Othmane A., Bettaieb F., Bakhrouf A., Ben Ouada H., Ponsoonnet L. (2006).** Quantification of the adhesion free energy between bacteria and hydrophobic and hydrophilic substrata. *Materials Science and Engineering*. 26:300-305.
- Becker P., Hufnagle W., Peters G., Herrmann M. (2001).** Detection of differential gene expression in biofilm-forming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus* using micro-representational-difference-analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2958-2965.
- Bedi M. S., Verma V., Chhibber S. (2009).** Amoxicillin and specific bacteriophage can be used together for eradication of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25(7): 1145-1151.
- Beenken K. E., Dunman P. M., McAleese F., Macapagal D., Murphy E., Projan S. J., Blevin J. S., Smeltzer M. S. (2004).** Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of Bacteriology*. 186: 4665-4684.
- Bellon-Fontaine MN., Mozes N., Van der Mei H. C., Sjollem J., Cerf O., Rouxhet P. G., Busscher H. J. (1990).** A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata. *Cell Biophysics*. 17:93-106.
- Bellon-Fontaine M.N., Rault J., Van Oss C.J. (1996).** Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. In *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, pp.47-53.
- Ben H. K. A et Khedher M. (2012).** [Epidemiological study of *Klebsiella* spp. uropathogenic strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in a Tunisian university hospital. *Pathologie-biologie*, 60(2): 1-5.
- Ben Jaballah N., Bouziri A., Kchaou W., Hamdi A., Mnif K., Belhadj S., 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.
- 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. *Applied and environmental microbiology*. 59(11): 3973-3977.
- Berra L., Curto F., Li Bassi G. (2006).** Antibacterial-coated tracheal tubes cleaned with the Mucus Shaver: a novel method to retain long-term bactericidal activity of coated tracheal tubes. *Intensive Care Medicine*. 32:888–93
- Berra L., Coppadoro A., Bittner EA. (2012).** A clinical assessment of the Mucus Shaver: a device to keep the endotracheal tube free from secretions. *Critical Care medicine* 40:119–124

## Références bibliographiques

---

- Berthelot P., Mallaval FO., Fascia P., Turco M., Jucht F. (2003).** Preventing nosocomial urinary tract infection: catheters and techniques. *Médecine et maladies infectieuses*. 33:499-505.
- Bjarnsholt T., Jensen P.O., Burmolle M., Hentzer M., Haagensen J.A., Hougen H.P., Calum H., Madsen K.G., Moser C., Molin S., Hoiby N., Givskov M. (2005).** *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology (Reading, England)*. 151:373-383.
- Bos R., Van der Mei H. C., Busscher J H. (1999).** Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews*. 23:179-230.
- Botto H. (2002).** Infections urinaires nosocomiales de l'adulte : conférence de consensus, texte court. *Médecine et maladies infectieuses*. 33 : 370–375.
- Boutaleb N. (2007).** Étude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse de doctorat. Universités de Bretagne-Sud, France. 174 pages.
- Boyer A., Clouzeau B., Bui H. N., Vargas F., Hilbert G., Gruson D. (2013).** Nouvelles techniques pour lutter contre le biofilm de la sonde d'intubation. *Réanimation*. 1-7.
- Bradford P.A., Urban C., Mariano N., Projan S.J., Rahal J.J., Bush K. (1997).** Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmidmediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41:563-9.
- Briandet R. (1999).** Maîtrise de l'hygiène des surfaces par la création de biofilms. Aspects physico-chimiques, Thèse de Docteur de l'ENSAR - Mention Physico-chimie et Qualité des Bioproduits, Rennes, France.
- Brisse S., Grimont F., Grimont P AD. (2006).** The Genus *Klebsiella* . *Prokaryotes*. 6:159–196.
- Brooun A., Liu S., Lewis K. (2000).** A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44(3): 640-6.
- Bruinsma G. M., Van der Mei H. C., Busscher H. J. (2001).** Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials*. 22:3217-3224.
- Brun-Buisson C. (2005).** Risques et maîtrise des infections nosocomiales en réanimation: texte d'orientation SRLF/SFAR. *Réanimation*. 14(6): 463-471.

## Références bibliographiques

---

- Caiazza N.C., O'Toole G.A. (2004).** SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology*. 186:4476-85.
- Cappello S, Guglielmino PP. (2006).** Effects of growth temperature on polystyrene adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37:205-207.
- Carter J. S., Bowden F. J., Bastian I., Myers G. M., Sriprakash K. S., Kemp D. J. (1999).** Phylogenetic evidence for reclassification of *Calymmatobacterium granulomatis* as *Klebsiella granulomatis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 49(4): 1695-1700.
- Cartier F, Lobel B (1990).** Infection urinaire nosocomiale. *Revue du praticien*. 40(14) : 1279-1284.
- CASFM. (2010).** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.
- Ceri H., Olson M., Stremick C., Read RR., Morck D., Buret A. (1999).** The Calgary Biofilm Device: a new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*. 37:1771-1776.
- Characklis WG, Marshall K.C. (1990).** Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
- Chavant P., Martinie B., Meylheuc T., Bellon-Fontaine M.N., Hebraud M. (2002).** *Listeria monocytogenes* LO28: Surface Physicochemical Properties and Ability To Form Biofilms at Different Temperatures and Growth Phases. *Applied and environmental microbiology*. 728–737
- Christensen GD., Simpson WA., Bisno AL., Beachy EH. (1982).** Adherence of biofilm producing strains of *Staphylococci epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity* 37: 318-326.
- Christensen GD., Simpson WA., Younger JA., Baddour LM., Barrett FF., Melton DM. (1985).** Adherence of coagulase negative Staphylococci to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*. 22:996–1006.
- Clutterbuck A. L., Woods E. J., Knottenbelt D. C., Clegg P. D., Cochrane C. A., Percival S. L. (2007).** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary microbiology*. 121(1): 1-17.
- Cooper R, Okhiria O. (2006).** Biofilms, wound infection and the issue control. *Wounds UK*. 2: 48-57.
- Costerton J. W., Lewandowski Z., Debeer D., Caldwell D., Korber D., James G. (1994).** Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology*. 176: 2137-2142.

## Références bibliographiques

---

- Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M. (1995).** Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*. 49:711-45.
- Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
- Costerton J.W. (1999).** Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 11:217-721.
- Daddi Oubekka S. (2012).** Dynamique réactionnelle d'antibiotiques au sein des biofilms de *Staphylococcus aureus* Apport de la microscopie de fluorescence multimodale p46-47
- 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. *Infection and Immunity*. 60:44-55.
- Davey M.E, O'Toole G.A. (2000).** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 847-867
- De Araujo C., Balestrin D., Roth L., Charbonnel N., Forestier C. (2010).** Quorum sensing affects biofilm formation through lipopolysaccharide synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Research in Microbiology*. 161:595-603
- De Chalvet De Rochemonteix A. (2009).** Thèse de Doctorat .Les biofilms et la peau. La faculté de médecine de Créteil.
- De Lorenzo V, Martinez JL. (1988).** Aerobactin production as a virulence factor: a reevaluation. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 7(5):621-629.
- Dechen CT., Das S., Adhiakari L., Pal R., Singh T.S.K. (2009).** Extended spectrum beta lactamases detection in gram negative bacilli of nosocomial origin. *J Glo Inf Dis*. 1(2):22–28.
- Di Martino P., Bertin Y., Girardeau J. P., Livrelli V., Joly B., Darfeuille-Michaud A. (1995).** Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infection and immunity*. 63(11): 4336-4344.
- 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. *Infection and immunity*. 64(6): 2266-2273.
- Di Martino P., Cafferini N., Joly B., Darfeuille-Michaud A. (2003).** *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Research in Microbiology*. 154:9-16.

## Références bibliographiques

---

- Domka J., Lee J., Bansal T., Wood T. K. (2007).** Temporal gene expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environmental Microbiology*. 9: 332–346.
- Donlan RM (2001).** Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Disease journal*. 7: 277- 281
- Donlan RM (2002).** Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Disease journal*. 8 (9): 881-890
- Donlan RM, Costerton JW. (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*.15: 167- 193.
- Donlan RM . (2008).**Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? *Curr. Top. Microbiology and Immunology*. 322: 133-161.
- Dumas C. (2007).** Catalyse électro-microbienne dans les piles à combustible. Thèse de Doctorat. Institut National polytechnique de Toulouse. 306 pages.
- Dunne W.M. (2002).** Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?.*Clinical microbiology reviews*. 15(2): 155-166.
- Dzul S. P., Thornton M. M., Hohne D. N., Stewart E. J., Shah A. A., Bortz D. M., Younger J. G. (2011).** Contribution of the *Klebsiella pneumoniae* capsule to bacterial aggregate and biofilm microstructures. *Applied and environmental microbiology*. 77(5): 1777-1782.
- El Fertas-Aissani R., Messai Y., Alouache S., Bakour R. (2012).** Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathologie Biologie*.
- Espinasse F., Page B., Cottard-Boulle B. (2010).** Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Revue Francophone des Laboratoires*. (426) : 51-63.
- Fader RC, Davis CP. (1980).** Effect of piliation on *Klebsiella pneumoniae* infection in rat bladders. *Infection and Immunology*. 30(2):554-561.
- Fader RC, Davis CP. (1982).** *Klebsiella pneumoniae*-induced experimental pyelitis: the effect of piliation on infectivity. *Journal of Urology*. 128(1):197-201.
- Favre-Bonte S., Darfeuille-Michaud A., Forestier C. (1995).** Aggregative adherence of *Klebsiella pneumoniae* to human intestine-407 cells. *Infection and Immunity*. 63(4):1318-1328.
- Feldman C., Kassel M., Cantrell J., Kaka S., Morar R., Goolam Mahomed A., Philips JI. (1999).** The presence and sequence of endotracheal tube colonization in patients undergoing mechanical ventilation. *European Respiratory Journal*. 13:546–551.

## Références bibliographiques

---

- Filloux A, Vallet I. (2003).** Biofilm: set-up and organization of a bacterial community. *Medecine sciences: M/S.* 19(1): 77-83.
- Fletcher M (1988).** Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium- substratum separation distance. *Journal of Bacteriology.* 170: 2027-2030.
- Fletcher E.L., Weissman B.A., Efron N., Fleiszig S.M., Curcio A.J., Brennan N.A. (1993).** The role of pili in the attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to unworn hydrogel contact lenses. *Current Eye Research.* 12: 1067-1071.
- Frank J.F. (2001).** Microbial attachment to food and food contact surfaces. *Advances in Food and Nutrition Research.* 43: 319-369.
- Freeman D.J., Falkiner FR., Keane CT. (1989).** New method of detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology.* 42: 87-84.
- Freney J.F., Gavini H., Alexandre S., Madier D., Izard H., Leclerc J., Fleurette. (1986).** Nosocomial infection and colonization by *Klebsiella trevisanii*. *Journal of Clinical Microbiology.* 23:948-50.
- Fux C.A., Costerton J.W., Stewart P.S., Stoodley P. (2005).** Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in microbiology.* 13: 34-40.
- Gallardo-Moreno A. M., Gonzalez-Martin M. L., Pérez-Giraldo C., Garduno E., Bruque J. M., Gomez-Garcia C. A. (2002).** Thermodynamic Analysis of Growth Temperature Dependence in the Adhesion of *Candida parapsilosis* to Polystyrene. *Applied and Environmental microbiology.* 68:2610-2613.
- Garrouste-Orgeas M., Marie O., Rouveau M., Villiers S., Arlet G., Schlemmer B. (1996).** Secondary carriage with multi-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in an adult ICU population: relationship with nosocomial infections and mortality. *Journal of Hospital Infection.* 34:279-89.
- Gavin R., Merino S., Altarriba M., Canals R., Shaw J.G., Tomás J.M. (2003).** Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. *FEMS Microbiology Letters.* 224: 77-83.
- Gavini F., Leclerc B., Lefebvre H., Ferragut C., Izard D. (1977).** Taxonomic study of enterobacteria belonging or related to the genus *Klebsiella* (author's transl). *Annals of Microbiology (Paris).* 128B:45-59
- Gaytán-Martínez J., Mateos-García E., Sánchez-Cortés E., González-Llaven J., Casanova-Cardiel L. J., Fuentes-Allen J. L. (2000).** Microbiological findings in febrile neutropenia. *Archives of medical research.* 31(4): 388-392.

## Références bibliographiques

---

- Gilbert P., Evans D.J., Brown M.R.W. (1991).** Surface properties of Gram-negative bacteria in relation to growth and dispersal of biofilm (Abstr). *Biofouling*. 4:238–238
- Goller C.C, Romeo T. (2008).** Environmental influences on biofilm development. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 322: 37- 66
- Hall-Stoodley L., Stoodley, P., Kathju S., Høiby N., Moser C., William Costerton J., Bjarnsholt T. (2012).** Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 65(2): 127-145.
- Hamadi F., Latrache H., El Ghmari A., Ellouali M., Mabrouki M., Kouider N. (2004).** Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and electron acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Annals of Microbiology*. 54: 213-225.
- Hatt JK, Rather PN. (2008)** .Role of bacterial biofilms in urinary tract infections. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 322: 163- 192
- Hassaine H. (2008).** Écologie bactérienne et lutte contre l'infection nosocomiale. Thèse de Doctorat Université de Tlemcen, Algérie.
- Haverkorn ML, Michel MF. (1979).** Nosocomial *Klebsiellas* I. Colonization of hospitalized patients. *Journal of Hygiene*. Camb. 82:177-93.
- Hennequin C, Forestier C. (2010).** Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. *Research in Microbiology*.158: 339-347
- Hernandez JR., Martinez-Martinez L., Canton R. (2005).** Coque TM, Pascual A. Nationwide Study of *Escherichia coli* and *K. pneumonia* producing extended-spectrum  $\alpha$ -lactamases in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49:2122–2125.
- Hinsa S.M., Espinosa-Urgel J.L., Ramos G.A., O'Toole. (2003).** Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Molecular Microbiology*. 49:905-918.
- Hornick D.B., Allen B.L., Horn M.A., Clegg S. (1992).** Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. *Infection and Immunity*. 60:1577-88.
- Hornick D.B., Thommandru J., Smits W., Clegg S. (1995).** Adherence properties of an mrkDnegative mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*. 63:2026-32.

## Références bibliographiques

---

- Huang W. Y., Wei L. P., Ji Y. G., Xu D. X., Mo, J. K. (2005).** Effect of silicon and latex urinary catheters: a comparative study. *Academic journal of the first medical college of PLA*. 25(8): 1026-1028.
- Illiaquer M (2010).** Epidémiologie et caractérisation moléculaire de souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3ème génération, hors BLSE, isolées entre 2007 et 2009, au C.H.U. de Nantes.
- Inglis TJ., Millar MR., Jones JG., Robinson DA. (1989).** Tracheal tube biofilm as a source of bacterial colonization of the lung. *Journal of Clinical Microbiology* 27:2014–8
- Irie Y, Parsek MR. (2008).** Quorum sensing and microbial biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 322: 67- 84
- Ito A., Taniuchi A., May T., Kawata K., Okabe S. (2009).** Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. *Applied and environmental microbiology*. 75(12):4093-4100.
- Izard D., Ferragut C., Gavini F., Kersters K., DeLey J., Leclerc H. (1981).** *Klebsiella terrigena*, a new specie from soil and water. *International journal of systematic bacteriology*. 31:116-127.
- Jackson R.T., Harris L.F., Alford R.H. (1978).** Sodium clavulanate potentiation of cephalosporin activity against clinical isolates of cephalothin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 14:118-25
- Jacobsen S. M., Stickler D. J., Mobley H. L. T., Shirtliff M. E. (2008).** Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clinical microbiology reviews*: 21(1): 26-59.
- Jagnow J, Clegg S. (2003).** *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. *Microbiology*. 149:2397-2405
- Jain A, Agarwal A. (2009).** Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *Journal of Microbiology and Methods*. 76: 88–92.
- Jana TK., Srivastava AK., Csery K., Arora DK. (2000).** Influence of growth and environmental conditions on cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas fluorescens* in non-specific adhesion. *Journal of Bacteriology*. 184: 1140-1154.
- Johnson J. G, Clegg S. (2010).** Role of MrkJ, a phosphodiesterase, in type 3 fimbrial expression and biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of bacteriology*. 192(15): 3944-3950.

## Références bibliographiques

---

- Katsikogianni M., Missirlis Y.F., Harris L., Douglas J. (2004).** Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *European cells and materials*. 8: 37-57.
- Klausen M., Gjermansen M., Kreft J.U., Tolker-Nielsen T. (2006).** Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilm. *FEMS Microbiology Letters*. 261: 1-11.
- Knobloch JK., Horstkotte MA., Rhode H., Mack D. (2002).** Evaluation of different detection methods for biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology*. 19: 101-106.
- Koerner R.J. (1997).** Contribution of endotracheal tubes to the pathogenesis of ventilator-associated pneumonia. *Journal of Hospital Infection*. 35:83–89
- Krepesky N., Rocha Ferreira R.B., Ferreira Nunes A.P., Casado Lins U.G., Costa E., Silva Filho F., De Mattos-Guaraldi A.L., Netto-dosSantos K.R. (2003).** Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates. *Current Microbiology*. 46: 280-286.
- Kuchma S.L., Connolly J.P., O'Toole G.A. (2005).** A three-component regulatory system. *Lancet*. 358(9276): 135-138.
- Langstraat J., Bohse M., Clegg S. (2001).** Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. *Infection and Immunity*. 69:5805-5812.
- Lappin-Scott H.M, Costerton J.W. (1995).** Microbial biofilms. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Le Magrex E., Brisset L., Jacquelin L. F., Carquin J., Bonnaveiro N., Choisy C. (1994).** Susceptibility to antibacterials and compared metabolism of suspended bacteria versus embedded bacteria in biofilms. *Colloids Surf. B- Biointerfaces*. 2: 89-95.
- Lemozy J. D., Sirot C., Chanal C., Huc R., Labia H., Dabernat Sirot J. (1995).** First lenses. *Current Eye Research*. 12: 1067-1071.
- Léone M., Arnaud S., Boisson C., Blanc-Bimar M. C., Martin C. (2000).** Epidémiologie et prophylaxie." *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation*. Vol. 19. No. 1. Elsevier Masson.
- Lewis K. (2008).** Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Current topics in microbiology and immunology*. 322: 107-131.
- Liu W. K., Tebbs S. E., Byrne P. O., Elliott T. S. (2000).** The effects of electric current on bacteria colonising intravenous catheters. *Journal of Infection*. 27(3): 261-9.

## Références bibliographiques

---

- Mah T. F, O'Toole G. A. (2001).** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiology*. 9(1): 34-9.
- Martínez J., Martínez L., Rosenblueth M., Silva J., Martínez-Romero E. (2004).** How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy?: The case of *Klebsiella*. *International Microbiology*. 7(4): 261-268.
- Martinez LR, Casadevall A. (2007).** *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on *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.
- Marty L, Jarlier V. (1998).** Surveillance of multiresistant bacteria: justification, role of the laboratory, indicators, and recent French data. *Pathology Biology* (Paris). 46:217-26.
- Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay DJ., Fatma T., Rattan A. (2006).** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 24: 25-29
- Mc Landsborough L., Rodriguez A., Pérez-Conesa D., Weiss J. (2006).** Biofilms: At the interface between biophysics and microbiology. *FOBI* 1: 94-114.
- McBride J.S. (2001).** Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annual Review of Microbiology*. 55: 49-75.
- Melzer M., Petersen I., Cheasty T. (2008).** Biofilm-forming *Klebsiella pneumoniae* strains have greater likelihood of producing extended-spectrum b-lactamases. *The Hospital Infection Society*. 369-371
- Mittelman MW. (1996).** Adhesion to biomaterials. Bacterial adhesion. *Molecular and ecological diversity*. 89- 127.
- Mizuta K., Ohta M., Mori M., Hasegawa T., Nakashima I., Kato N. (1983).** Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: relationship to their capsular (K) types. *Infection and Immunity*. 40(1): 56-61.
- Murphy C.N, Clegg S. (2012).** *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. *Future Microbiology*. 7(8): 991-1002.
- Nasr SA., AbuShady H M., Hussein HS. (2012).** Biofilm formation and presence of *ica* AD gene in clinical isolates of staphylococci. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 1110-8630.

## Références bibliographiques

---

- Nedjai S., Barguigua A., Djahmi N., Jamali L., Zerouali K., Dekhil M., Timinouni M. (2012).** Prevalence and characterization of extended spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. *Médecine et maladies infectieuses*. 42(1): 20-29.
- Neu T.R. (1996).** Significance of bacterial surface active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiology Review*. 60: 151-166
- O'Toole G.A., Kolter R. (1998).** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*. 30: 295-304.
- O'Toole G. A., Kaplan HB., Kolter R. (2000).** Biofilm formation as microbial development. *The Annual Review of Microbiology*. 54: 49- 79
- Ofek I, Beachey EH. (1978).** Mannose binding and epithelial cell adherence of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 22(1):247-254.
- Ofek I, Sharon N. (1988).** Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. *Infection and Immunity*. 56(3):539-547.
- Oli A. K., Raju S., Nagaveni S., Kelmani Chandrakanth R. (2012).** Biofilm formation by Multidrug resistant *Enterococcus faecalis* (MDEF) originated from clinical samples. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 2(2).
- Orskov I., Svenson S. B., Makela P. H. (1985).** Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infection and Immunity*. 48:486–491.
- Parsek MR, Fuqua C. (2004).** Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface- associated microbial life. *Journal of Bacteriology*. 186: 4427-4440
- Paterson D.L., Mulazimoglu L., Casellas J.M., Ko W.C., Goossens H., Von Gottberg A., Mohapatra S., Trenholme G.M., Klugman K.P., McCormack J.G., Yu V.L. (2000).** Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum betalactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*. 30:473-478.
- Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Casellas JM, Mulazimoglu L, Klugman KP., Victor L. Y. (2001).** Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *Journal of clinical microbiology*. 39:2206–2212
- Philippon A. (2013).** Les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE). *Immuno-analyse and Biologie Spécialisée*. 28(5): 287-296.

## Références bibliographiques

---

- Philippon A, Arlet G. (2006).**  $\beta$ -Lactamases de bacilles à Gram négatif: le mouvement perpétuel! *Annales de biologie clinique* (Vol. 64, No. 1, pp. 37-51).
- Pitout JD, Nordmann P, Laupland K, Poirel L. (2005).** Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended spectrum betalactamases (ESBL) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56:52–9.
- Pitout JD., Gregson DB., Church DL., Elsayed S., Lampland KB. (2005).** Community-wide outbreaks of clonally related CTX-M-14 beta-lactamase producing *Escherichia coli* strains in the Calgary health region. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 2844-2849.
- Pitout JD, Laupland K. (2008).** Extended spectrum betalactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infectious Disease*. 8: 159–166.
- Podschun R., Sievers D., Fischer A., Ullmann U. (1993).** Serotypes, hemagglutinins, siderophore synthesis, and serum resistance of *Klebsiella* isolates causing human urinary tract infections. *Journal of Infectious Diseases*. 168(6): 1415-1421.
- Podschun R, Ullmann U. (1998).** *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Journal of Clinical Microbiology*. 11(4):589-603.
- Quinn JP, Miyashiro D, Sahm D, Flamm R, Bush K. (1989).** Novel plasmid-mediated beta lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 33:1451–4156.
- Raad I, Costerton W., Sabharwal U., Sadlowski M., Anaissie E., Bodey G. P. (1993).** Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. *Journal of Infectious Diseases*. 168(2): 400-407.
- Reifsteck F., Wee S., Wilkinson B.J. (1987).** Hydrophobicity-hydrophilicity of staphylococci. *Journal of Medical Microbiology*. 24: 65-73.
- Rello J., Sonora R., Jubert P., Artigas A., Rue M., Valles J. (1996).** Pneumonia in intubated patients: role of respiratory airway care. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 154:111–115.
- Romero EDV, Padilla TP, Hernandez AH, Grande RP, Vazquez MF, Garcia IG, et Muñoz Bellido J. L. (2007).** Prevalence of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. producing multiple extended-spectrum b-lactamases. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 59:433–437.

## Références bibliographiques

---

- Romero L, Lopez L, Bano JR, Martinoz M, Pascual A. (2005).** Long term study of frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing ESBLs. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 11:625–631
- Rosenberg M., Gutnick G., Rosenberg E. (1980).** Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*. 9:29-33.
- Rosenberg M. (1984).** Bacterial adherence to hydrocarbons : a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*. 22:289-295.
- Rosenberg M, Kjelleberg S. (1986).** Hydrophobic interactions role in bacterial adhesion. *Advances in Microbial Ecology*. 9 :353–393.
- Rosenblueth M., Martínez L., Silva J., Martínez-Romero E. (2004).** *Klebsiella variicola*, A Novel Species with Clinical and Plant-Associated Isolates. *Systematic and applied microbiology*. 27(1): 27-35.
- Saitou K., Furuhashi K., Kawakami Y., Fukuyama M. (2009).** Biofilm formation abilities and disinfectant resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cockroaches captured in hospitals. *Biocontrol Science*. 14: 65-68.
- Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.d., Costerton J.W., Davies D.G. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*. 184: 1140-1154
- Sauer K., Cullen M.C., Rickard A.H., Zef L.A.H., Davies D.G., Gilbert P. (2004).** Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *Journal of Bacteriology*. 186: 7312-7326.
- Schembri M. A., Blom J., Krogfelt K. A., Klemm, P. (2005).** Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*. 73(8): 4626-4633.
- Schilling, J.D., M.A. Mulvey, et S.J. Hultgren. (2001).** Structure and function of *Escherichia coli* type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections. *Journal of Infectious Diseases*. 183 Suppl 1:S36-40.
- 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. *Infection and Immunity*. 62:4186-91.
- Shah PS., Cannon JP., Sullivan CL., Nemchausky B., Pachucki CT. (2005).** Controlling antimicrobial use and decreasing microbiological laboratory tests for urinary tract infections in spinal-cord-injury patients with chronic indwelling catheters. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 62(1):74-77.

## Références bibliographiques

---

- Simoës M. (2011).** Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms. *Current medicinal chemistry*. 18(14): 2129-2145.
- Singla S., Harjai K., Chhibber S. (2012).** Susceptibility of different phases of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* to three different antibiotics. *The Journal of antibiotics*.
- 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 20:323-334.
- Sirot D., Chanal C., Labia R., Meyran M., Sirot J., Cluzel R. (1989).** Comparative study of five plasmid-mediated ceftazidimases isolated in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 24:509-21.
- Sirot D. (1995).** Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 36 Suppl A: 19-34.
- Smith J.N, Ahmer B.M. (2003).** Detection of other microbial species by *Salmonella*: expression of the SdiA regulon. *Journal of Bacteriology*. 185:1357-1366.
- Smoot L. M, Pierson M. D. (1998).** Influence of environmental stress on the kinetics and strength of attachment of *Listeria monocytogenes* Scott A to Buna-N rubber and stainless steel. *Journal of food protection*. 61:1286–1292.
- Sottile FD., Marrie TJ., Prough DS. (1986).** Nosocomial pulmonary infection: possible etiologic significance of bacterial adhesion to endotracheal tubes. *Critical Care Medicine* 14:265–70
- Spenceley H., Dow C.S., Holah J.T. (1992).** Development of mixed culture biofilms on stainless steel. In: Melo, L.F., Bott T.R., Fletcher, M., Capdeville, B. (Eds.), *Biofilms-Science and Technology*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp. 395–402.
- Spiers A.J., Bohannon J., Gehrig S.M., Rainey P.B. (2003).** Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Molecular Microbiology*. 50: 15-27.
- Spormann AM. (2008).** Physiology of microbes in biofilms stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 5208- 5218
- Stanley N.R., Lazazzera B.A., Britton R.A., Grossman A.D. (2003).** Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarray. *Journal of Bacteriology*. 185: 1951-1957.

## Références bibliographiques

---

- Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B.S., Vabic-Vlahovic M. (2000).** A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 40: 175–179.
- Stewart P. S, J. W. Costerton. (2001).** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 358(9276): 135-8.
- Stickler DJ. (1996).** Bacterial biofilms and the encrustation of urethral catheters. *Biofouling*. 94: 293-305.
- Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W. (2002).** Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*. 56:187-209.
- Suci PA., Mittelman MW., Yu FP., Geesey GG. (1994).** Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 38: 2125-2133.
- Sutherland I. W. (2001).** The biofilm matrix an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*. 9: 222–227.
- Taj Y., Essa F., Aziz F. Kazmi S. U. (2012).** Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of infection in developing countries*. 6(5).
- Tambyah PA., Halvorson K., Maki DG. (1999).** A prospective study of the pathogenesis of catheter- associated urinary tract infection. *Mayo Clinic Proceedings*. 74: 131-6.
- Tarkkanen A. M., Allen B. L., Williams P. H., Kauppi M., Haahtela K., Siitonen A., Orskov I., Orskov F., Clegg S., Korhonen T. K. (1992).** Fimbriation, capsulation, and iron-scavenging systems of *Klebsiella* strains associated with human urinary tract infection. *Infection and Immunity*. 60:1187–1192.
- 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. *Infection and Immunity*. 65:1546-9.
- Tenke P., Jackel M., Nagy E. (2004).** Prevention and Treatment of Catheter-Associated Infections: Myth or Reality? *EAU Update Series*. 2:106-115.
- Tomlin K. L., Malott R. J., Ramage G., Storey D. G., Sokol P. A., Ceri H. (2005).** Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Applied and environmental microbiology*. 71(9): 5208-5218.
- Van Loosdrecht M.C.M., Lyklema J., Norde W., Schraa G., Zehnder A.J.B. (1987).** Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*. 8:1898-1901

## Références bibliographiques

---

- Van Oss C. J., Good R. J., Chaudhury M. K. (1986).** The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in hydrophobic interactions between biopolymers and low energy surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*. 11:378-390.
- Verma V., Harjai K., Chhibber S. (2010).** Structural changes induced by a lytic bacteriophage make ciprofloxacin effective against older biofilm of *Klebsiella pneumoniae*. *Biofouling*. 26(6): 729-737.
- Williams I., Venables W. A., Lloyd D., Paul F., Critchley I. (1997).** The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 143 ( Pt 7): 2407-13.
- Wingender J., Neu T. R., Flemming H.C. (1999).** Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function. *Springer-Verlag*, NY, ISBN 3-540-65720-7.
- Woodford N., Ward ME., Kaufmann ME. (2004).** Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54:735-743.
- Würker M., Beuth J., Ko H. L., Przondo-Mordarska A., Pulverer G. (1990).** Type of fimbriation determines adherence of *Klebsiella* bacteria to human epithelial cells. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 274(2): 239-245.
- Wyndaele JJ., Madersbacher H., Kovindha A. (2001).** Conservative treatment of the neuropathic bladder in spinal cord injured patients. *Spinal Cord*. 39(6):294-300.
- Yang J., Wilksch J. J., Tan J. W., Hocking D. M., Webb C. T., Lithgow T., Strugnell R. A. (2013).** Transcriptional Activation of the mrkA Promoter of the *Klebsiella pneumoniae* Type 3 Fimbrial Operon by the c-di-GMP-Dependent MrkH Protein. *PLoS one*. 8(11):79038.
- Ziebuhr W., Lobner I., Krimmer V., Hacker J. (2001).** Methods to detect and analyse phenotypic variation in biofilm-forming. *Methods in Enzymology*. 336: 195-203.
- Zogheib E, Dupont H. (2005).** Entérobactéries multirésistantes. Conférences d'actualisation de la SFAR:153–155.

## *Liste des travaux et publications*

### *Publication internationale*

**Bellifa, S.,** Hassaine, H., Balestrino, D., Charbonnel, N., M'hamedi, I., Terki, I. K., M, Lchachi., W, Didi & 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.

### *Communications*

**Samia Bellifa, Hafida Hassaine, Imane M'hamedi, Ibtissem Kara Terki, Merieme Lachachi. 2011.** Détection du biofilm de *Klebsiella pneumoniae* productrice de BLSE isolée à partir des dispositifs médicaux CHU Tlemcen. Colloque international : Gestion des biofilm enjeux industriel. Romainville. Paris

**Samia Bellifa, Hafida Hassaine, Imane M'hamedi, Ibtissem Kara Terki, Merieme Lachachi. 2011.** Etat de résistance des souches de *Klebsiella pneumoniae* productrice de BLSE, isolée des dispositifs médicaux et sa capacité de former un biofilm. Colloque international sur « la problématique de l'émergence de bactéries multirésistantes aux antibiotiques et nouvelles approches thérapeutiques. Meknès. Maroc.

**Samia Bellifa, Hassaine H , M'hamedi I, Kara Terki I, Lachachi M, Didouh N . 2012.** Evaluation of different detection methods of biofilm formation by *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary catheter. Colloque international Biofilm 5 Conference. Paris.

**Samia Bellifa, Hafida Hassaine, Imane M'hamedi, Ibtissem Kara Terki, Merieme Lachachi, Wafae Didi. 2013.** Formation of biofilm in microfermentor by *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical devices at the university hospital of Tlemcen. 4<sup>th</sup> International Woekschop on Biotechnology. Tlemcen. Algeria.

**Samia Bellifa, Hafida Hassaine, Imane M'hamedi, Ibtissem Kara Terki, Merieme Lachachi. 2011.** Etat de résistance des souches de *Klebsiella pneumoniae* productrice de

BLSE, isolées des dispositifs médicaux et sa capacité de former un biofilm. 3<sup>ème</sup> congrès : Société algérienne de Biologie Clinique. Alger.

**Samia Bellifa, Hafida Hassaine, Imane M'hamedi, Ibtissem Kara Terki, Merieme Lachachi. 2012.** Evaluation de la formation du biofilm de Klebsiella pneumoniae isolée des dispositifs médicaux au niveau du CHU Tlemcen. 5<sup>ème</sup> journée national d'hygiène hospitalière et de lutte contre les infections nosocomiales. Alger.

**Samia Bellifa, Hafida Hassaine, Imane M'hamedi, Ibtissem Kara Terki, Merieme Lachachi, Wafae Didi. 2013.** Détection des pili de type 3 de Klebsiella pneumoniae isolée des sondes urinaires CHU Tlemcen. Journée Virus et Cancer. Tlemcen. Algérie



# *Annexe 1*

Les patients	DM	Sexe	<i>K. pneumoniae</i> /BLSE							
			5J	7J	10J	12J	14J	15 J	21J	30J
Patient 1	SU <sub>1</sub> +SU <sub>2</sub> SI	Femme			<i>Kp</i> BLSE-					<i>Kp</i> BLSE+
Patient 2	SU SI	Femme								
Patient 3	SU SI	Homme	<i>Kp</i>							
Patient 4	SU <sub>1</sub> +SU <sub>2</sub> SI	Homme		<i>Kp</i> BLSE-						<i>Kp</i> BLSE+
Patient 5	SU SI	Homme								
Patient 6	SU SI	Homme								
Patient 7	SU SI	Femme	<i>Kp</i>							
Patient 8	SU <sub>1</sub> +SU <sub>2</sub> SI	Femme		<i>Kp</i> BLSE-						<i>Kp</i> BLSE+
Patient 9	SU <sub>1</sub> +SU <sub>2</sub> SI	Homme		<i>Kp</i> BLSE-						<i>Kp</i> BLSE+
Patient 10	SU <sub>1</sub> +SU <sub>2</sub> SI	Homme		<i>Kp</i> BLSE+						<i>Kp</i> BLSE+
Patient 11	SU <sub>1</sub> +SU <sub>2</sub> SI	Femme								
Patient 12	SU <sub>1</sub> +SU <sub>2</sub> SI	Femme		<i>Kp</i> BLSE+				<i>Kp</i> BLSE+		
Patient 13	SU <sub>1</sub> +SU <sub>2</sub> SI	Homme		<i>Kp</i> BLSE-				<i>Kp</i> BLSE+		
Patient 14	SU SI	Homme				<i>Kp</i> BLSE				
Patient 15	SU SI	Homme				<i>Kp</i> BLSE				
Patient 16	SU SI	Homme				<i>Kp</i> BLSE				
Patient 17	SU <sub>1</sub> +SU <sub>2</sub> SI	Femme		<i>Kp</i> BLSE-				<i>Kp</i> BLSE+		
Patient 18	SU SI	Femme				<i>Kp</i> BLSE				
Patient 19	SU <sub>1</sub> +SU <sub>2</sub> SI	Homme		<i>Kp</i> BLSE-				<i>Kp</i> BLSE+		
Patient 20	SU	Homme				<i>Kp</i> BLSE				

	SI									
Patient 21	SU SET					<i>Kp</i> BLSE				
Patient 22	SU SET					<i>Kp</i> BLSE				
Patient 23	SU <sub>1</sub> +SU <sub>2</sub> SET	Femme		<i>Kp</i> BLSE-			<i>Kp</i> BLSE+			
Patient 24	SU SET	Femme								
Patient 25	SU <sub>1</sub> +SU <sub>2</sub> SET	Homme		<i>Kp</i> BLSE-			<i>Kp</i> BLSE+			
Patient 26	SU SET	Homme						<i>Kp</i> BLSE		
Patient 27	SU SET	Homme						<i>Kp</i> BLSE		
Patient 28	SU <sub>1</sub> +SU <sub>2</sub> SET	Homme		<i>Kp</i> BLSE-			<i>Kp</i> BLSE+			
Patient 29	SU <sub>1</sub> +SU <sub>2</sub> SET	Femme		<i>Kp</i> BLSE+			<i>Kp</i> BLSE+			
Patient 30	SU SET	Femme								
Patient 31	SU <sub>1</sub> +SU <sub>2</sub> SET	Homme								
Patient 32	SU SET	Homme					<i>Kp</i> BLSE			
Patient 33	SU <sub>1</sub> +SU <sub>2</sub> SET						<i>Kp</i> BLSE			
Patient 34	SU SET	Femme					<i>Kp</i> BLSE			
Patient 35	SU SET	Femme					<i>Kp</i> BLSE			
Patient 36	SU <sub>1</sub> +SU <sub>2</sub> SET	Homme			<i>Kp</i> BLSE-		<i>Kp</i> BLSE+			
Patient 37	SU <sub>1</sub> +SU <sub>2</sub> SET	Homme			<i>Kp</i> BLSE-		<i>Kp</i> BLSE+			
Patient 38	SU <sub>1</sub> +SU <sub>2</sub> SET	Homme			<i>Kp</i> BLSE-		<i>Kp</i> BLSE+			
Patient 39	SU <sub>1</sub> +SU <sub>2</sub> SET	Femme			<i>Kp</i> BLSE-		<i>Kp</i> BLSE+			
Patient 40	SU <sub>1</sub> +SU <sub>2</sub> SET	Femme			<i>Kp</i> BLSE-		<i>Kp</i> BLSE+			

Patient 41	SU <sub>1</sub> +SU <sub>2</sub>	Homme		<i>Kp</i> BLSE						
Patient 42	SU	Homme								
Patient 43	SU	Femme								
Patient 44	SU	Femme								
Patient 45	SU	Homme								
Patient 46	SU	Femme								
Patient 47	SU	Femme	<i>Kp</i>							
Patient 48	SU	Homme						<i>Kp</i> BLSE		
Patient 49	SU	Homme						<i>Kp</i> BLSE		
Patient 50	SU	Homme		<i>Kp</i> BLSE						
Patient 51	SU	Homme					<i>Kp</i> BLSE			
Patient 52	SU	Femme								
Patient 53	SU	Femme		<i>Kp</i> BLSE						
Patient 54	SU	Homme								
Patient 55	SU	Homme								
Patient 56	SU	Femme		<i>Kp</i> BLSE						
Patient 57	SU	Femme								
Patient 58	SU	Femme								
Patient 59	SU	Homme								<i>Kp</i> BLSE
Patient 60	SU	Homme								
Patient 61	SU	Homme								
Patient 62	SU	Homme								
Patient 63	SU	Femme								
Patient 64	SU	Femme					<i>Kp</i> BLSE			
Patient 65	SU	Homme								
Patient 66	SU	Homme								
Patient 67	SU	Femme								
Patient 68	SU	Femme								<i>Kp</i> BLSE
Patient 69	SU	Homme								
Patient 70	SU	Homme								
Patient 71	SU	Homme								
Patient 72	SU	Homme			<i>Kp</i> BLSE					
Patient 73	SU	Femme								
Patient 74	SU	Femme					<i>Kp</i> BLSE			
Patient 75	SU	Homme								
Patient 76	SU	Homme								

Patient 77	SU	Femme								
Patient 78	SU	Femme					<i>Kp</i> BLSE			
Patient 79	SU	Homme								
Patient 80	SU	Homme								
Patient 81	SU	Homme								
Patient 82	SU	Homme								
Patient 83	SU	Femme					<i>Kp</i>			
Patient 84	SU	Femme								
Patient 85	SU	Homme								
Patient 86	SU	Homme								
Patient 87	SU	Femme								
Patient 88	SU	Femme					<i>Kp</i> BLSE			
Patient 89	SU	Homme								
Patient 90	SU	Homme								
Patient 91	SU	Homme								
Patient 92	SU	Homme					<i>Kp</i>			
Patient 93	SU	Femme								
Patient 94	SU	Femme								
Patient 95	SU	Homme								
Patient 96	SU	Homme								
Patient 97	SU	Femme								
Patient 98	SU	Femme								
Patient 99	SU	Homme					<i>Kp</i>			
Patient 100	SU	Homme					<i>Kp</i> BLSE			
Patient 101	SU	Homme								
Patient 102	SU	Homme								
Patient 103	SU	Femme								
Patient 104	SU	Femme								<i>Kp</i> BLSE
Patient 105	SU	Homme								
Patient 106	SU	Homme								
Patient 107	SU	Femme								
Patient 108	SU	Femme								
Patient 109	SU	Homme								
Patient 110	SU	Homme								
Patient 111	SU	Homme								
Patient 112	SU	Homme					<i>Kp</i> BLSE			
Patient 113	SET	Femme	<i>Kp</i>							
Patient 114	SET	Femme								
Patient 115	SET	Homme								
Patient 116	SET	Homme						<i>Kp</i> BLSE		

Patient117	SET	Femme								
Patient 118	SET	Femme								
Patient 119	SET	Homme	<i>Kp</i>							
Patient 120	SI	Homme								
Patient 121	SI	Homme								
Patient 122	SI	Homme							<i>Kp</i> BLSE	
Patient 123	SI	Femme								
Patient 124	SI	Femme								
Patient 125	SI	Homme								
Patient 126	SI	Homme								
Patient 127	SI	Femme	<i>Kp</i>							
Patient 128	SI	Femme								
Patient 129	SI	Homme								
Patient 130	SET	Homme		<i>Kp</i>						
Patient 131	SET	Homme								
Patient 132	SET	Homme								
Patient133	SET	Femme								
Patient 134	SET	Femme		<i>Kp</i>						
Patient 135	SET	Homme								
Patient 136	SET	Homme								
Patient 137	SET	Femme								
Patient 138	SET	Femme								
Patient 139	SET	Homme		<i>Kp</i>						
Patient 140	SET	Homme								
Patient 141	SET	Homme								
Patient 142	SET	Homme								
Patient 142	SET	Femme								
Patient 143	SET	Femme								
Patient 144	SET	Homme								
Patient 145	SET	Homme								
Patient 146	SET	Femme								
Patient 147	SET	Femme				<i>Kp</i> BLSE				
Patient 148	SET	Homme								
Patient 149	SET	Homme								
Patient 150	SET	Homme								
Patient 151	SET	Homme								
Patient 152	SET	Femme								
Patient 153	SET	Femme								
Patient 154	SET	Homme								
Patient 156	SET	Homme								
Patient 157	SET	Femme								
Patient 158	SET	Femme								
Patient 159	SET	Homme						<i>Kp</i>		

Patient 160	SET	Homme			<i>Kp</i>					
Patient 161	SET	Homme								
Patient 162	SET	Homme								
Patient 163	SET	Femme					<i>Kp</i>			
Patient 164	SET	Femme		<i>Kp</i>						
Patient 165	SET	Homme								
Patient 166	SET	Homme								
Patient 167	SET	Femme								
Patient 168	SET	Femme								
Patient 169	SET	Homme								
Patient 170	SET	Homme			<i>Kp</i>					
Patient 171	SET	Homme								
Patient 172	SET	Homme								
Patient 173	SET	Femme		<i>Kp</i>						
Patient 174	SET	Femme								
Patient 175	SET	Homme								
Patient 176	SET	Homme								
Patient 177	SET	Femme								
Patient 178	SET	Femme								
Patient 179	SET	Homme					<i>Kp</i>			
Patient 180	SET	Homme								
Patient 181	SET	Homme		<i>Kp</i>						
Patient 182	SET	Homme								
Patient 183	SET	Femme							<i>Kp</i>	
Patient 184	SET	Femme								
Patient 185	SET	Homme								
Patient 186	SET	Homme								
Patient 187	SET	Femme								
Patient 188	SET	Femme								
Patient 189	SET	Homme		<i>Kp</i>						
Patient 190	SET	Homme								
Patient 191	SET	Homme								
Patient 192	SET	Homme					<i>Kp</i>			
Patient 193	SET	Femme								
Patient 194	SET	Femme								
Patient 195	SET	Homme							<i>Kp</i>	
Patient 196	SET	Homme								
Patient 197	SET	Femme								
Patient 198	SET	Femme								
Patient 199	SET	Homme								
Patient 200	SET	Homme								
Patient 201	SET	Homme								
Patient 202	SET	Homme		<i>Kp</i> BLSE						
Patient 203	SET	Femme								

Patient 204	SET	Femme						<i>Kp</i> BLSE		
Patient 205	SET	Homme								
Patient 206	SET	Homme		<i>Kp</i>						
Patient 207	SET	Femme			<i>Kp</i> BLSE					
Patient 208	SET	Femme								
Patient 209	SET	Homme								
Patient 210	SET	Homme			<i>Kp</i> BLSE					
Patient 211	SET	Homme								
Patient 212	SET	Homme								
Patient 213	SET	Femme							<i>Kp</i> BLSE	
Patient 214	SET	Femme					<i>Kp</i>			
Patient 215	SI	Homme								
Patient 216	SI	Homme								
Patient 217	SI	Femme								
Patient 218	SI	Femme						<i>Kp</i>		
Patient 219	SI	Homme								
Patient 220	SI	Homme			<i>Kp</i> BLSE					
Patient 221	SI	Homme								
Patient 222	SI	Homme	<i>Kp</i>							
Patient 223	SI	Femme								
Patient 224	SI	Femme					<i>Kp</i>			
Patient 225	SI	Homme								
Patient 226	SI	Homme								
Patient 227	SI	Femme								
Patient 228	SI	Femme		<i>Kp</i>						
Patient 229	SI	Homme								
Patient 230	SI	Homme								
Patient 231	SI	Homme	<i>Kp</i>							
Patient 232	SI	Homme								
Patient 233	SI	Femme								
Patient 234	SI	Femme								
Patient 235	SI	Homme							<i>Kp</i>	
Patient 236	SI	Homme								
Patient 237	SI	Femme								
Patient 238	SI	Femme						<i>Kp</i> BLSE		
Patient 239	SI	Homme								
Patient 240	SI	Homme								
Patient 241	SI	Homme							<i>Kp</i> BLSE	
Patient 242	SI	Homme			<i>Kp</i> BLSE					
Patient 243	SI	Femme		<i>Kp</i>						

Patient 244	SI	Femme								
Patient 245	SI	Homme								
Patient 246	SI	Homme								
Patient 247	SI	Femme					<i>Kp</i> BLSE			
Patient 248	SI	Femme								
Patient 249	SI	Homme								
Patient 250	SI	Homme								
Patient 251	SI	Homme					<i>Kp</i> BLSE			
Patient 252	SI	Homme								
Patient 253	SI	Femme		<i>Kp</i>						
Patient 254	SI	Femme								
Patient 255	SI	Homme								
Patient 256	SI	Homme								
Patient 257	SI	Femme								
Patient 258	SI	Femme						<i>Kp</i>		
Patient 259	SI	Homme								
Patient 260	SI	Homme		<i>Kp</i>						

# *Annexe 2*

## Milieu 63B1 : Solutions Mères

- 1- **Sulfate d'Ammonium**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  à **20%**:
  - 200g de Sulfate d'Ammonium
  - Qsp 1litre  $\text{H}_2\text{O}$  bidistillée
  - Stérilisation  $120^\circ\text{C}$ , 20 minutes
- 2- **Sulfate de Magnésium**  $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  à **10%** :
  - 100g de Magnésium  $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$
  - Qsp 1litre  $\text{H}_2\text{O}$  bidistillée
  - Stérilisation  $120^\circ\text{C}$ , 20 minutes
- 3- **Sulfate de Fer**  $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  à **1‰** :
  - 0,500g de Sulfate de Fer,  $7\text{H}_2\text{O}$
  - Qsp 1litre  $\text{H}_2\text{O}$  bidistillée
  - Stérilisation  $120^\circ\text{C}$ , 20 minutes
- 4- **Thiamine** (Vitamine B1)  $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{CLN}_4\text{OS.HCL}$  à **0,5‰** :
  - 0,500g de Thiamine
  - Qsp 1litre  $\text{H}_2\text{O}$  bidistillée
  - Stérilisation  $120^\circ\text{C}$ , 20 minutes
- 5- **Potassium Hydroxyde** (pastilles)  $\text{KOH}$  à **4M** :
  - 224,44g de Potassium Hydroxyde
  - Qsp 1litre  $\text{H}_2\text{O}$  bidistillée
- 6- Potassium Dihydrogénophosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 
  - Tel quel est en poudre

## Milieu 63B1/ 10litres pour Bonbonne

### A- Préparation pour 10 litres de milieu 63B1

Dans un bécher de 2 litres :

- Potassium Dihydrogénophosphate 163g

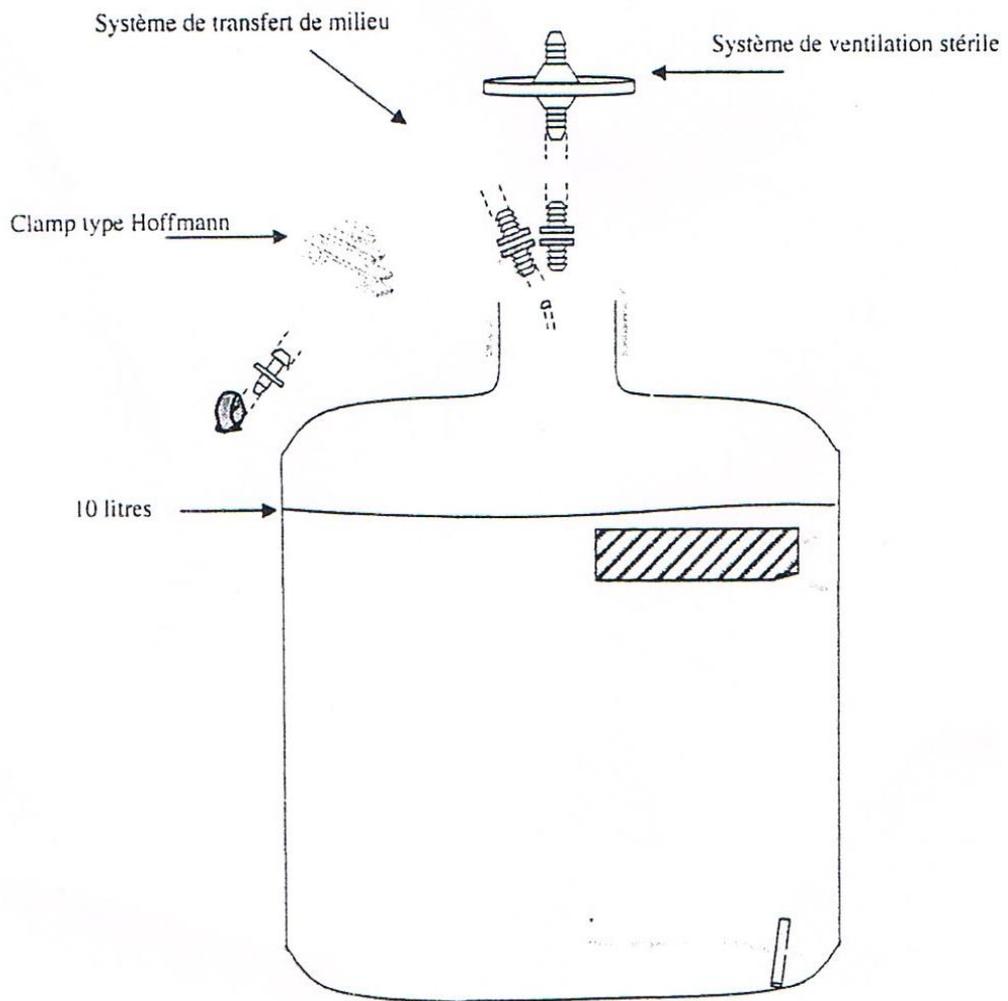
- Sulfate d'Ammonium (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à **20%** stérile 100ml
- Sulfate de Magnésium à 10% stérile 10ml
- Sulfate de Fer à 1‰ stérile 5ml
- Thiamine à 0,5‰ 20ml

Ajouter environ 1,5 litre H<sub>2</sub>O bidistillée

Ajuster à pH = 7,0

### **Préparation Bonbonne**

1. Verser le contenu du bécher dans la bonbonne
2. Ajouter H<sub>2</sub>O bidistillée qsp 10 litres
3. Visser fermement le bouchon (avec ses 6 systèmes de transfert de milieu et 1 ventilation stérile par filtre)
4. Clamper avec pinces clamp type Hoffman chacun des 6 tuyaux de transfert (éviter une perte de milieu durant l'autoclavage)
5. Protéger les clapets de sortie de stérilisation par de l'aluminium (stérilité)
6. Placer un marqueur de stérilisation sur la bonbonne
7. Stériliser 20minutes à 120°C



Représentation schématique d'une bonbonne (Protocole laboratoire )

**Luria Bertani liquide (LB)**

Tryptone	10g
Extrait de levure	05g
NaCl	05g
Eau distillée (qsp) 1 L	

**Le tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) à 0,1M, pH= 7,2± 2**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,29 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1,19 g
NaCl	4,93 g
Dans un litre d'eau distillée. Eau distillée (qsp) 1 L	

Pour la préparation d'un tampon **TBE** (1x) pH 8,0 :

<b>TRIS</b>	10,78 g
<b>Acide borique</b>	5,50 g
<b>EDTA</b>	0,58 g

## الملخص

*Klebsiella pneumoniae* هي واحدة من الأسباب الرئيسية من العدوى المكتسبة من المجتمع والمستشفيات. هذه الجرثومة هي المسؤولة عن الالتهابات الحادة والمزمنة ، ومعظمها بسبب قدرتها على التمسك و الالتصاق على الأجهزة الطبية المزروعة و قدرتها على تشكيل الشريط الحيوي.

تشكيل الشريط الحيوي هي عملية حيوية متعددة الخطوات ، من التصاق الأول للبكتيريا على الأجهزة الطبية المزروعة لغاية نضج التراكبات . الهدف من هذا العمل هو دراسة التفاعل بين العزلات العيادية ل *Klebsiella pneumoniae* والأسطح الغير الحيوية و بعض العوامل المؤثرة في تشكيل الشريط الحيوي.

خلال سنتين تم عزل 115 سلالات من *Klebsiella pneumoniae* من الأجهزة الطبية من المستشفى الجامعي لتلمسان ومعظمها كان على مستوى عال من المقاومة لالسيفالوسبورين من الجيل الأول، الثاني و حتى الثالث .وفقا للتقنيات الثلاث المدروسة ( TCP ، TP ، RCA ) ،سلالات *Klebsiella pneumoniae* المعزولة من القسطرة البولية أثبتت أنها الخلايا الأكثر تشكيلا للشريط الحيوي من اللواتي تم عزلها من الأجهزة الطبية الأخرى.

24 سلالة من مجموع 115، أظهرت فرقا ملحوظا في الحساسية تجاه المضادات الحيوية بين فئات العوايق و الفئات المشكلة للشريط الحيوي حيث كان الفرق مرتفع من 10 إلى 20.

جميع الخلايا كانت محبة للماء و خاصة الالتصاق كانت مرتفعة من 2 إلى 10 أضعاف في PVC أكثر من الركييزة الزجاجية. ألجين MrkD (تم الكشف عنه بواسطة PCR ) المسؤول عن تشكيل الشريط الحيوي كان متواجدا في 22 سلالة وهو ما قد يفسر خاصية الالتصاق و بالتالي القدرة الإمراضية. الكلمات المفتاحية :

الشريط الحيوي، *Klebsiella pneumoniae*، الأجهزة الطبية.

## Résumé

*Klebsiella pneumoniae* est l'une des causes majeures des infections communautaires et nosocomiales. Ce germe est responsable des infections aiguës et chroniques dont la plupart sont dues à sa capacité à adhérer sur les implants médicaux et à former un biofilm. Le développement de biofilm est un processus dynamique à plusieurs étapes, de l'adhésion initiale des bactéries au support à la maturation des agrégats. L'objectif de ce travail est d'étudier l'interaction entre des souches cliniques de *K. pneumoniae* et des surfaces abiotiques (dispositifs médicaux) et quelques facteurs influençant la formation du biofilm. Sur une période de 2 ans, 115 souches de *K. pneumoniae* ont été isolées des dispositifs médicaux au CHU Tlemcen, dont la plupart présentaient un haut niveau de résistance vis-à-vis les céphalosporines de 1<sup>re</sup>, 2<sup>nd</sup> et 3<sup>rd</sup> génération. Selon les 3 techniques étudiées (TCP, TP, RCA) les souches de *K.pneumoniae* isolées des sondes urinaires se sont révélées de très bonnes formatrices du biofilm à celles isolées d'autres dispositifs médicaux. 24 sur 115 souches isolées ont présentaient une nette différence de sensibilité aux antibiotiques entre les populations planctoniques et populations en biofilm ou elles étaient 10-20 plus élevée. Toutes avaient un caractère hydrophile et une adhésion 2 à 10 fois plus importante sur support en PVC par rapport un support en verre. Le gène MrkD (détecté par la technique PCR) responsable de la formation du biofilm été présent chez 22 souches de *K. pneumoniae* ce qui peut expliquer leur adhésion et en conséquence leur pathogénicité.

### Mots clés

Biofilm, *Klebsiella pneumoniae*, dispositifs médicaux.

## Abstract

*Klebsiella pneumoniae* is a major cause of community-acquired and nosocomial infections. This germ is responsible for acute and chronic infections, most of which are due to its ability to adhere to medical implants and form a biofilm. Biofilm development is a dynamic multi-step process, from the initial adhesion of bacteria to support the maturation of aggregates. The objective of this work is to study the interaction between clinical isolates of *K. pneumoniae* and abiotic surfaces (medical devices) and some factors influencing biofilm formation. Over a period of 2 years, 115 strains of *K. pneumoniae* were isolated from medical devices CHU Tlemcen, most of which had a high level of resistance to cephalosporins 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> generation. According to the 3 techniques studied (TCP, TP, RCA) strains of *K. pneumoniae* isolated from urinary catheters have proved very good forming the biofilm to those isolated from other medical devices. 24 of 115 isolated strains showed a clear difference in antibiotic susceptibility between planktonic populations and biofilm populations they were 10-20 times higher. All strains presented a highly hydrophilic character and adhesion 2-10 times greater in PVC with respect a glass support. The MrkD gene (detected by PCR) responsible for biofilm formation was found in 22 strains of *K. pneumoniae* which may explain their adhesion and therefore their pathogenicity.

### Keywords

Biofilm, *Klebsiella pneumoniae*, medical devices.

