



MEMOIRE DE MASTER

Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : MICROBIOLOGIE

Présenté par

BOUKHIAR Saaida

Intitulé du Thème

Evaluation de la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* isolés à partir des sondes urinaires. CHU Tlemcen

Soutenu le : 11 Juin 2013

Devant le Jury composé de :

Dr. REBIAHI S. A.	Maitre de conférences A	Président
Dr. HASSAINE H.	Maitre de conférences A	Promotrice
Mme BOUNELENZA L.	Maitre-assistant chargé de cours	Examinatrice
Pr. BENKALFAT M.	Chef service de Chirurgie. CHU Tlemcen	Invité

Année Universitaire : 2012-2013

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

A decorative flourish consisting of a horizontal line with intricate, symmetrical scrollwork and floral patterns extending downwards from its center.

Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier
M^{me}HASSAINE Hafida maitre de Conférences à
l'Université Abou BekrBelkaid -Tlemcen, qui a
bien voulu accepter de me prendre en charge pour
réaliser ce modeste travail dont le mérite lui revient
grâce à son aide à la fois matérielle et morale, ses
conseils précieux et sa gratitude.*

Je remercie vivement les membres de mon jury :

*Mr REBIAHI Sid-Ahmed maitre de conférences à
l'Université Abou BekrBelkaid -Tlemcen, d'avoir
accepté de présider le jury.*

*M^{me} BOUBLENZA Lamia maitre-assistant chargé de
cours à l'Université Abou BekrBelkaid -
Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Mr BENKALFAT Mokhtar chef service de Chirurgie du
Centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen de nous
honorer et évaluer ce modeste travail*

*Je n'oublierai pas de
remercier...*

Tous les membres du laboratoire LAMAABE

L'équipe «hygiène hospitalière» surtout Wafa&Samia

Dédicaces

*Avec l'aide du tout Puissant, j'ai pu réaliser ce
modeste travail que je dédie :*

*A mes chers parents sur qui j'ai pu compter et me
ressourcer d'affection et de bénédictions durant
toute ma vie.*

*A ma sœur Hanane.
Mes tantes et mes oncles.
A mes cousins (es).*

*A toute la promotion de Microbiologie Tlemcen
2012.2013*

*A tous mes amis(es) qui m'ont beaucoup soutenue
et encouragée même au-delà*

*A ma promotrice adorable Mme HASSAINE
Hafida qui n'a pas cessé de m'encourager.*

A toutes les personnes que j'aime...

A la mémoire de ma sœur Nawel

Saaida

AHL : AcylHomosérines Lactones

AI : Auto-Inducteur

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

DO : Densité Optique

ECBU : Examen CytoBactériologique des Urines

HTA : Hyper Tension Artérielle

IAS : Infection Associée aux Soins

IN : Infection nosocomiale

IND : Indénombrable

IUN : Infection Urinaire Nosocomiale

NE : Non Entérobactérie

P.a : *Pseudomonas aeruginosa*

QS : Quorum Sensing

RCA : Red Congo Agar

TCP :Plaque de Culture de Tissus

UFC : Unité Formant Colonie

Figures

Figure 1 : Observation par microscope électronique prouve la présence des bactéries sur sonde urinaire (Conort et Pariente, 2005).

Figure 2 : Voies de contamination d'une sonde urinaire (Maki, 2001)

Figure 3: Schematisation de biofilm par Zobell, 1943

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

Figure 5 : Prélèvements des sondes urinaires

Figure 6 : Traitement aux Ultrasons

Figure 7 : Méthode d'ensemencement par stries

Figure 8 : Culture sur la gélose Rouge Congo (Hou et al., 2012).

Figure 9 : Technique de formation de biofilm sur microplaque de titration

Figure 10 : Détection et lecture de biofilm par méthode TCP

Figure 11: Contact direct de la sonde urinaire avec la gélose au sang

Figure 12: Cinétique de formation de biofilm sur sonde stérile de type Foley.

Figure 13 : Répartition de l'ensemble des prélèvements (sondes urinaires) selon le service. CHU Tlemcen.

Figure 14 : Culture des microorganismes sur GN (formation de tapis)

Figure 15 : Culture de *Pseudomonas aeruginosa* sur boîte Pétri.

Figure 16: *Pseudomonas aeruginosa* sur Api 20 NE.

Figure 17: Répartition des souches de *P. aeruginosa* isolées des sondes urinaires par le service

Figure 18 : Pourcentage de *P. aeruginosa* isolés chez les deux sexes

Figure 19 : *P. aeruginosa* sur gélose Rouge Congo.

Figure 20 : Evaluation de la formation de biofilm par la méthode TCP

Figure 21 : Diffusion de biofilm sur gélose au sang

Figure 22 : Cinétique de la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* sur sonde urinaire in vitro (suivie de la densité optique en fonction de temps)

Tableaux :

Tableau 1 : Dénombrement des bactéries après traitement aux ultrasons.

Tableau 2 : Résultats des prélèvements effectués au CHU Tlemcen.

Tableau 3: Patients infectés et porteurs de *P. aeruginosa* :

Tableau 4 : Résultats de la production de slime par la méthode RCA.

Introduction	1
Synthèse bibliographique	
I. Généralités sur les infections urinaires nosocomiales	3
1- Infection nosocomiale	3
2- Infections nosocomiales sur dispositifs médicaux	3
3- Infection urinaire nosocomiale	3
II. Infections urinaire à la présence d'une sonde urinaire	4
1- Colonisation de l'arbre urinaire	4
2- Voies de colonisation de la sonde urinaire	5
III. Formation de biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur sonde urinaire	6
1- Biofilm	6
1.1- Historique	6
1.2- Définition de biofilm	6
1.3- Différentes étapes de formation d'un biofilm bactérien	7
1.3.1- Adhésion réversible	7
1.3.2- Adhésion irréversible	7
1.3.3- Formation de microcolonies	7
1.3.4- Maturation du biofilm	7
1.3.5- Dispersion du biofilm	7
1.4- Avantage de vie dans un biofilm	8
2- Formation de biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
2.1- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
2.2- Formation de biofilm par <i>P. aeruginosa</i>	9
3- Régulation de la formation de biofilm	9
3.1- Le Quorum Sensing	9
3.2- Les molécules impliquées dans le quorum sensing	10
3.3- Rôle du quorum sensing	10
3.4- Altération du quorum sensing	10

Matériel et méthodes

1.	Prélèvements	13
2.	Traitement aux Ultrasons	13
3.	Ensemencement des milieux	14
4.	Purification	15
5.	Identification par galerie API 20 NE	15
5.1	Principe	15
5.2	Technique	15
5.3	Lecture	16
6.	Evaluation de la formation de biofilm	16
6.1	Détection de la production de slime sur milieu Rouge Congo Agar (RCA)	17
6.2	Méthode de Plaque de Culture de Tissus (TCP)	18
7.	Diffusion de biofilm sur gélose au sang	20
8.	Cinétique de la formation de biofilm	21

Résultats & Discussion

1.	Fréquence de prélèvements	23
2.	Dénombrement et confirmation de l'IN sur sonde	23
3.	Identification	24
4.	Répartition des résultats	25
5.	Evaluation de la formation de biofilm	28
6.	Diffusion de biofilm sur gélose au sang	30
7.	Cinétique d'adhésion sur sonde urinaire <i>in vitro</i>	31

<i>Conclusion</i>	33
--------------------------	----

<i>Références bibliographiques</i>	35
---	----

<i>Annexe</i>	41
----------------------	----

Introduction

La plupart des micro-organismes (bactéries et champignons) dans la nature favorisent un mode de vie en communautés où se trouvent fixées sur un support plutôt que libre et isolées dans le milieu environnemental.

L'attachement sur une surface est une « stratégie de survie » qui permet à la bactérie de s'installer et de coloniser un environnement.

L'état planctonique (libre) pourrait se réduire au passage de la bactérie d'une surface à l'autre. Après attachement sur un support, les bactéries vont mettre en place et développer une communauté organisée à laquelle **William Costerton** a donné le nom de « **biofilm** » (**Fillox et Vallet, 2003**).

Les biofilms bactériens jouent un rôle majeur dans plus de 80% des infections (**National institutes of Health, 2007**). Soixante pour cent des infections nosocomiales sont attribués à la formation des biofilms sur les dispositifs médicaux implantables. En outre, elles sont nombreuses les maladies réfractaires associées aux biofilms.

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

Pseudomonas aeruginosa représente un des germes qui s'intervient souvent dans ces infections (**Amzian et al., 2010**).

Le but de mon travail consiste à :

Isoler le *Pseudomonas aeruginosa* à partir des sondes urinaires prélevées de patients hospitalisés dans différents services du CHU de Tlemcen.

Évaluer la capacité des souches de *P. aeruginosa* isolées de sondes urinaires à la formation de biofilm *in vitro* par différentes méthodes.

Suivre la cinétique de la formation de biofilm de cette bactérie *in vitro*.

Synthèse bibliographique

I. Généralités sur les infections urinaires nosocomiales

L'hôpital est un des lieux à risque d'infection, le regroupement dans un même lieu des malades atteints des maladies souvent graves d'une part ; et les techniques invasives utilisées pour les soigner d'autre part, de la simple injection à la chirurgie, font de l'hôpital un lieu où le risque de contracter une infection est important. Toute infection contractée à l'hôpital est appelée infection « hospitalière » ou « nosocomiale ». Elle peut toucher les malades, leur famille, ou le personnel.

1- Infection nosocomiale :

Une infection est dite nosocomiale IN si elle apparaît après la sortie de l'établissement et si elle était absente à l'admission à l'hôpital ; un délai d'au moins 48 heures après l'admission (ou un délai supérieur à la période d'incubation lorsque celle-ci est connue) est communément accepté pour distinguer une infection d'acquisition nosocomiale d'une infection communautaire (**Rossignol, 2007**).

2- Infections nosocomiales sur dispositifs médicaux :

L'Organisation Mondiale de la Santé OMS estime qu'entre 5 et 12 % des patients hospitalisés dans le monde développent une infection associée aux soins (IAS) dont plus de 60 % sont associées à l'implantation d'un dispositif médical ou chirurgical (**Espinasse et al., 2010**)

3- Infection urinaire nosocomiale :

L'infection urinaire est un terme consacré par l'usage, il est contestable car il laisse supposer que la maladie se situe seulement au niveau des urines elles-mêmes ce qui n'est pas la réalité, elle s'apparaitre après la 48^{ème} heure d'hospitalisation (**Rakotoarivony et al., 2009**); alors que l'examen cyto bactériologique des urines ECBU chez les patients avec infection urinaire est souvent trompeur (**Djeribi et al., 2012**),

L'infection urinaire (UN) est définie par une multiplication microbienne au sein des voies urinaires, associée à une réaction inflammatoire locale témoignant d'un processus infectieux, les bactéries et les cellules de l'inflammation se retrouvent dans les urines qui sont normalement stériles (**Riegel, 2003 ; Jouanny, 2012**).

Le cathétérisme de l'appareil urinaire est le facteur le plus commun, qui prédispose l'hôte à ces infections (**Mittal et al., 2009**).

Autre que les porteurs de sondes urinaires ; les diabétiques, les blessés médullaires, les porteurs du virus d'immunodéficience humaine ainsi que les patients souffrant de sclérose en plaques sont également des populations à risque d'infection urinaire et de complications, ainsi les femmes sont plus touchées que les hommes (**Thirion et Williamson, 2003**).

Une bactériurie $> 10^5$ UFC (Unité Formant Colonie) par mL est le seuil admis pour conclure la présence d'une IUN chez les patients non sondés alors elle est environ 10^2 chez les patients porteur d'une sonde urinaire (**Pavese, 2003**)

II. Infections urinaire à la présence d'une sonde urinaire :

1- Colonisation de l'arbre urinaire :

La mise en place du dispositif par voie invasive conduit à la colonisation de l'appareil urogénital du patient alors qu'elle doit être stérile.

Une flore hospitalière remplace la flore endogène du patient (**figure 1**), elle est constituée surtout 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 (**Alfandari, 2003**).

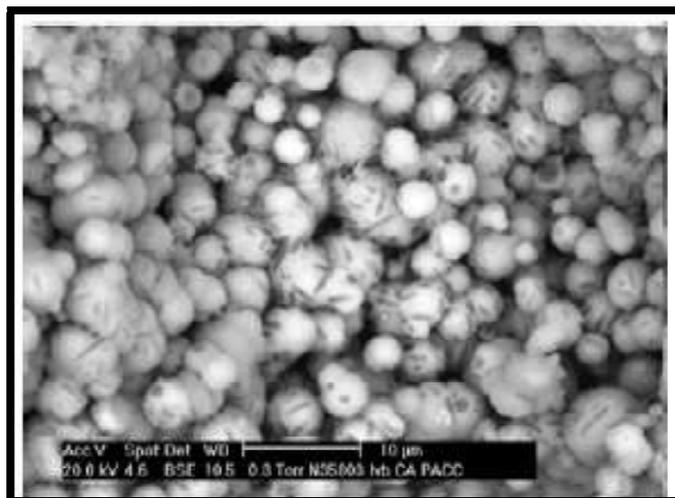


Figure 1 : Observation par microscope électronique prouve la présence des bactéries sur sonde urinaire (**Conort et Pariente, 2005**).

2- Voies de colonisation de la sonde urinaire:

L'arbre urinaire est normalement stérile à l'exception de la partie distale de l'urètre, qui est diverse et reflète à la fois la flore digestive (entérobactéries, streptocoques, anaérobies) ; la flore cutanée (staphylocoques à coagulase négative, corynébactéries) et la flore génitale (lactobacilles chez la femme) (Alfandari, 2003).

Les bactéries peuvent coloniser la vessie de trois façons (figure 2):

- Par la voie extraluminale où des bactéries colonisent l'espace séparant le cathéter de l'épithélium de l'urètre pour y former un biofilm entourant le cathéter, entre la paroi externe de celui-ci et l'épithélium de l'urètre.
- Au moment de l'insertion de la sonde urinaire.
- Par la voie intraluminale, où des bactéries en suspension dans l'urine provenant du sac de drainage, cette voie de contamination est plus fréquente chez l'homme que la femme (Jamil *et al*, 2001).

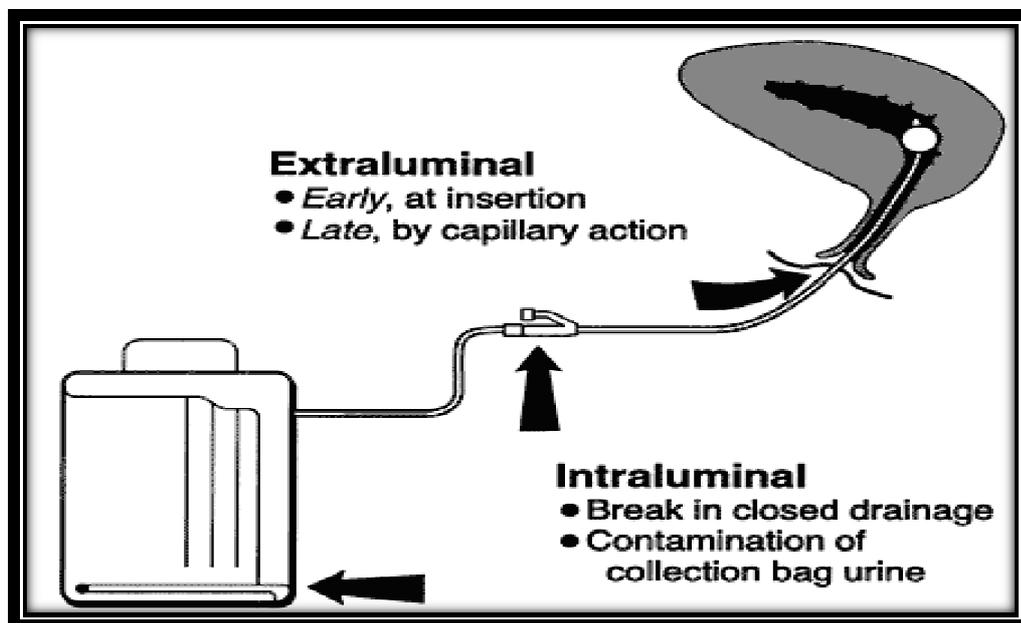


Figure 2 : Voies de contamination d'une sonde urinaire (Maki, 2001)

III. Formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* sur sonde urinaire :

1- Biofilm

1.1- Historique :

On attribue la découverte des biofilms à l'inventeur du microscope Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723) ; qui observa vers 1683 avec cet appareil des communautés de microorganismes au niveau de ses dents (**Donlan, 2002**).

En 1932 ; **Henerici** observa des communautés bactériennes fixées sur ces lames lors l'expérience visant à observer la croissance des algues sur des lames de verre placées dans un aquarium. Il délivrait l'hypothèse que la plupart des bactéries vivant en milieu aqueux ne sont pas sous la forme planctonique, mais plutôt elles sont organisées sous forme de communautés sessiles fixées à une surface (**Henerici, 1932; Trautner et al., 2009**).

Le terme « biofilm » a été utilisé pour la première fois par Zobell en 1943 (**figure 3**).

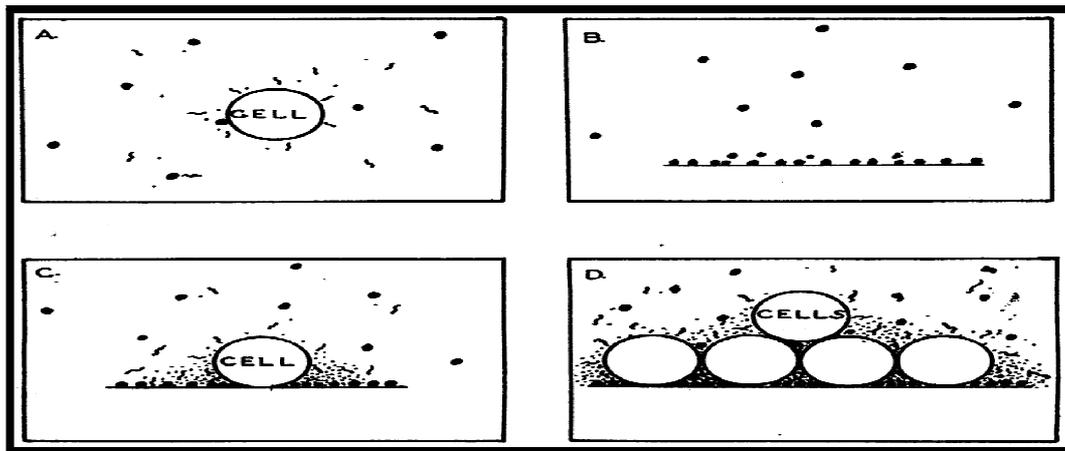


Figure 3 : Schématisation de biofilm par Zobell, 1943

1.2- Définition de biofilm :

Le terme de biofilm désigne une communauté de microorganismes enrobés d'une matrice hydratée, riche en polymères extracellulaires, et en contact avec une surface (**Filloux et Vallet, 2003**). L'organisation, la forme, et la densité de ces assemblages ne sont pas liées au hasard, cette construction est une réponse aux variations des conditions écologiques (**Melchior et al., 2006**). Ce sont des communautés hétérogènes, peuvent se composer d'une

seule espèce de bactéries ou de champignons ou, plus fréquemment, ils peuvent être polymicrobiens(Phillips *et al.*, 2011).

Ce comportement des bactéries apparaît comme une réponse adaptative à un environnement plus ou moins hostile, il conduit à des modification des fonctions métaboliques et de l'expression des facteurs de virulence, ainsi qu'une sensibilité diminuée aux moyens de défense naturels ou non de l'hôte, favorisant ainsi aux bactéries de nombreux avantages (Davey et O'Toole, 2000):

- Protection, grâce à la matrice d'exopolymères du biofilm assurant une homéostasie du milieu,
- Nutrition et coopération métabolique : des canaux aqueux permettent l'échange de nutriments et de métabolites entre les espèces du biofilm et avec l'extérieur,
- Echange de matériel génétique : pour une stabilisation de la structure du biofilm.

1.3- Différentes étapes de formation d'un biofilm bactérien :

On observe plusieurs étapes lors du développement des biofilm :

1.3.1- Adhésion réversible:

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

1.3.2- Adhésion irréversible :

Grace à la sécrétion d'exopolymères par les bactéries favorisant leur fixation à un support et conduisant à des fortes interactions avec des liaisons covalentes entre les bactéries et la surface, grâce à la présence des flagelles, des pilis et des adhésines(Vallet *et al.*, 2001).

1.3.3- Formation de microcolonies :

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

1.3.4- Maturation du biofilm :

Au sein du biofilm mature, les microorganismes sont séparés par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant d'une part d'acheminer l'oxygène et les

nutriments dans les régions enfouies du biofilm et d'autre part d'évacuer les déchets (**Filloux et Vallet, 2003**). le développement de ces microcolonies traduit le stade de maturation du biofilm et la colonisation de nouvelles surface (**Roux et al., 2006**).

1.3.5- Dispersion du biofilm :

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

- Détachement des cellules de la colonie du biofilm
- Translocation des cellules vers un nouvel emplacement
- Fixation des cellules à un substrat dans le nouvel emplacement.

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

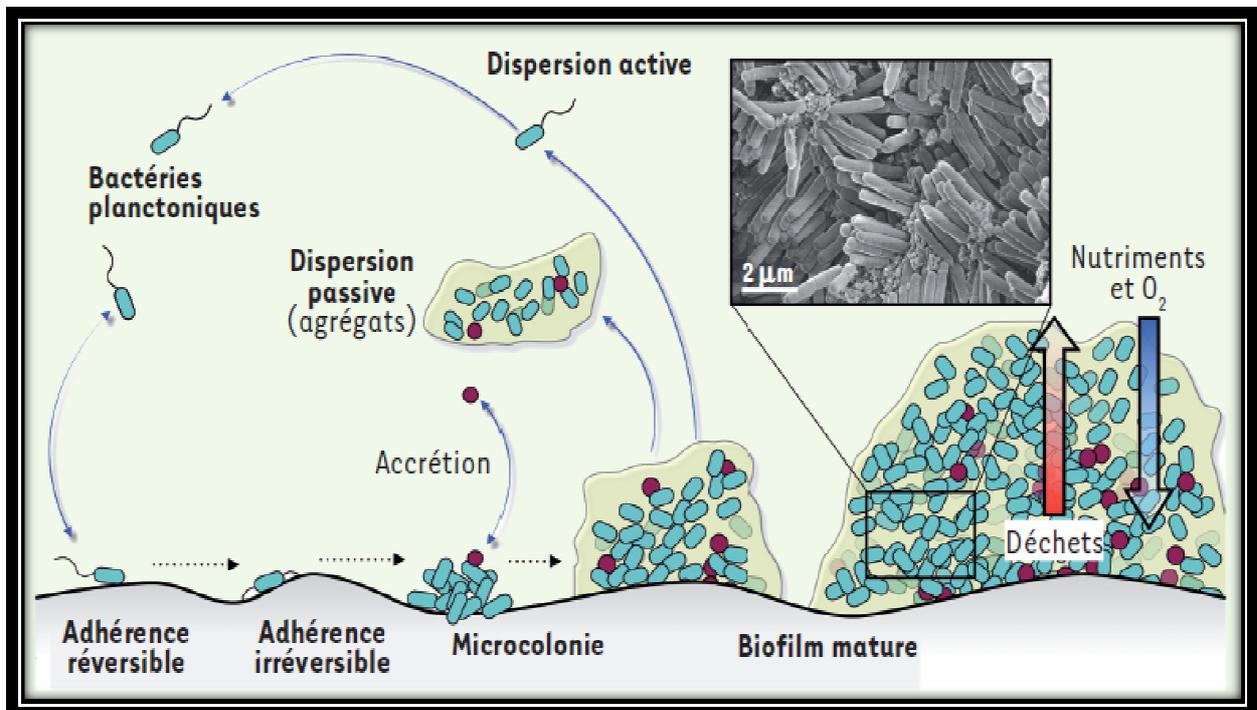


Figure 4 : Représentation schématique du développement d'un biofilm bactérien (**Lebeaux et Ghigo, 2012**).

2- Formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* :

P. aeruginosa a fait l'objet d'études assez complètes et informatives sur les mécanismes moléculaires qui interviennent lors du développement d'un biofilm.

2.1-*Pseudomonas aeruginosa* :

P. aeruginosa est une bactérie à Gram négatif que l'on trouve dans de nombreux environnements comme le sol, l'eau ou la végétation. C'est également un pathogène opportuniste capable d'infecter une multitude d'hôtes comme les nématodes, les insectes, l'homme et même les plantes (**Rahme et al., 2000**)

Chez l'homme, *P. aeruginosa* est la cause majeure d'infections nosocomiales chez les patients immunodéprimés. Parmi les affections les plus courantes, on peut citer les pneumonies, les infections du tractus urinaire, des brûlures, des plaies ou bien encore les septicémies. De plus, *P. aeruginosa* est directement responsable du taux de mortalité élevé et précoce chez les patients atteints de mucoviscidose (**Filloux et Vallet, 2003**).

2.2- Formation de biofilm par *P. aeruginosa* :

Les biofilms formés par *P. aeruginosa* sont caractérisés par un complexe bactérien, très structuré. Ils sont initiés par l'attachement d'une cellule planctonique unique sur une surface (**Vallet et al., 2001**).

La capacité de *P. aeruginosa* à former un biofilm lui confère plusieurs caractéristiques importantes, dont une augmentation importante de la résistance aux antibiotiques (**Brooun et al., 2000**), ainsi que aux mécanismes de défense de l'hôte et par conséquent sont difficiles à éradiquer. Les biofilms contribuent vers la pathogénicité de *P. aeruginosa* et conduisent souvent à des infections persistantes et récurrentes. La croissance de *P. aeruginosa* commence sous la forme de microcolonies, qui fusionnent ensuite pour former des biofilms (**Mittal et al., 2009**).

3- Régulation de la formation de biofilm :

3.1- Le Quorum Sensing :

La formation d'un biofilm est contrôlée par des mécanismes de quorum sensing (QS). Il s'agit de mécanismes de contrôle ayant lieu au sein de cellules, optimisés par des signaux de cellules à cellules, et dépendant de la quantité de cellules présentes : on parle de mécanismes de perception du quorum. Ces mécanismes sont basés sur le principe de masse critique (**Costerton 1999**). Une fois que les signaux atteignent une valeur seuil (valeur critique), des

régulateurs transcriptionnels sont activés et exercent un contrôle sur des gènes spécifiques (Tomlin, Malott et al., 2005).

3.2- Les molécules impliquées dans le quorum sensing :

Les molécules du quorum sensing sont différentes selon les types de bactéries (Irie and Parsek 2008). En général, on trouve des acylhomosérines lactones (AHL) chez la plupart des bactéries Gram négatives. La majorité des bactéries Gram-positives utilisent des peptides auto-inducteurs (AI), dont la taille est très variable (de 5 à 87 acides aminés).

Les molécules du quorum sensing sont dégradées par des enzymes. On obtient par conséquent une ségrégation spatiale des molécules du quorum sensing au sein d'un biofilm (Irie et Parsek, 2008). Le système de communication intercellulaire, le plus connu est retrouvé chez *P. aeruginosa* est utilisé afin de réguler une grande variété de gènes.

3.3- Rôle du quorum sensing

Le quorum sensing régule la physiologie du biofilm en modulant la taille de la population du biofilm. Il initie les phénomènes de dispersion des bactéries planctoniques à partir du biofilm (Irie et Parsek, 2008). Le quorum sensing aurait aussi un rôle dans la détermination de l'épaisseur du biofilm. Il peut réprimer ou stimuler l'expression de certains caractères, comme par exemple la motilité ou certains facteurs de virulence extracellulaires, comme les protéases (Irie et Parsek, 2008).

3.4- Altération du quorum sensing :

L'altération des mécanismes de quorum sensing peut aboutir à d'importantes modifications phénotypiques des micro-organismes du biofilm, par exemple une sensibilité augmentée à des antibiotiques ou à des antiseptiques, ou des anomalies dans le cycle de développement du biofilm, surtout lors des étapes de formation et de dispersion (Irie et Parsek, 2008).

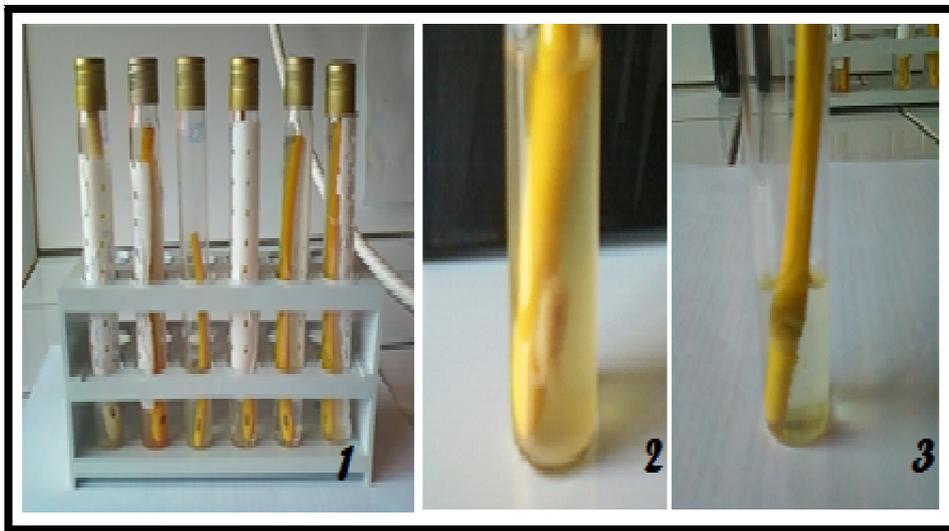
Matériel et Méthodes

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

1. Prélèvements:

Cinquante sondes urinaires ont été prélevées (**Figure 5**) au niveau du CHU de Tlemcen (Tidjani DAMERDJI) durant la période allant du 23/03/2013 au 03/06/2013 dans différents services.

Les sondes urinaires retirées des patients sont coupées à leurs extrémités distales (3 à 5 Cm de longueur environ) à l'aide d'un bistouri stérile et mis directement dans un tube stérile, acheminés directement au laboratoire.



- 1 : Sondes urinaire à analyser.
- 2 : Présence de pus sur la sonde urinaire.
- 3 : Noircissement et détérioration de la sonde urinaire.

Figure 5: Prélèvements (sondes urinaires).

2. Traitement aux Ultrasons :

- **Principe :**

Le traitement aux ultrasons permet de détacher en douceur les biofilms de la surface des dispositifs sous l'effet de micro-courants (Djeribi et al., 2012), sans que les structures cellulaires ne soient détruites (Achermann et al., 2010).

Les microorganismes recueillis dans le liquide de sonication sont ensuite mis en culture.

- **Technique :**

La sonde urinaire est plongée dans un liquide (solution de Ringer stérile ou de l'eau distillé stérile). Dans un bain à ultrasons spécialement conçu pour cette méthode, les sondes sont brièvement soumis à des ultrasons à 100% pendant 3 min afin qu'ils agissent sur l'ensemble de la surface (**Figure 6**).



Figure 6 : Traitement aux Ultrasons.

Une agitation mécanique par le vortex est nécessaire pour homogénéiser le contenu du tube.

3. Ensemencement des milieux:

- **Dénombrement sur Gélose Nutritive :**

Un volume de 25.0 μL est versé sur gélose nutritive à l'aide d'une micropipette, et l'ensemencement de la boîte Pétri se fait par râteau.

- **Isolement sur Mueller-Hinton :**

Un des milieux favorisant la culture de *Pseudomonas aeruginosa* le Mueller-Hinton Agar. Plus à sa composition enrichie ; le développement de *P. aeruginosa* sur Mueller-Hinton rend ce dernier en couleur verte.

L'incubation se fait à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ à l'étuve pendant 18 à 24 heures.

4. Purification:

On procède une purification via un ré-isolement par la méthode des stries (**Figure 7**) afin d'obtenir des souches pures pour entreprendre l'étape d'identification.

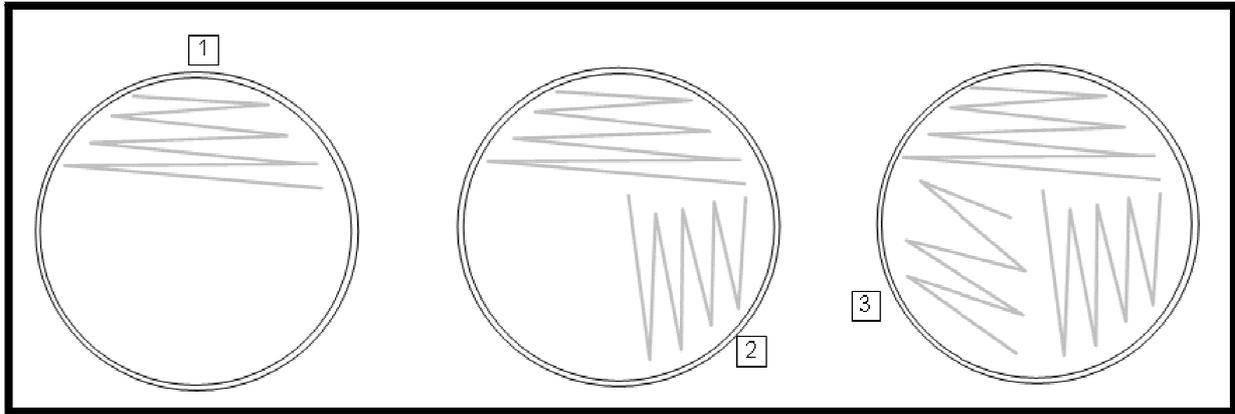


Figure 7 : Méthode d'ensemencement par stries.

5. Identification par galerie API 20 NE :

5.1- Principe :

La galerie API 20 NE (**Bio Mérieux**[®]) se compose d'une galerie constituée de 20 microtubes contenant milieux et substrats sous forme déshydratée.

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

5.2- Technique :

a) Préparation de la galerie :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

b) Préparation de l'inoculum :

- Préparer une suspension bactérienne, dans une ampoule de NaCl 0,85% Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, de turbidité égale à celle de l'étalon 0,5 Mcfarland.

c) Inoculation de la galerie :

- Homogénéiser la suspension bactérienne par une légère agitation.
- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO₃ à PNPG avec la suspension précédente d'une manière d'éviter la formation de bulles.
- Transférer 200 µL par micropipette de la suspension préparée dans une ampoule aux Medium et homogénéiser.
- Remplir les tubes et les cupules des tests GLU à PAC.
- Recouvrir d'huile de paraffine les cupules des trois tests GLU, ADH, URE.
- Incuber à 37± 1°C pendant 18 à 24 heures.

5.3- Lecture et interprétation:

La lecture de la galerie ne doit se faire qu'après réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs. La galerie est donc prête pour lecture soit :

- ✓ Par le tableau d'identification
- ✓ Par le catalogue analytique
- ✓ Par un logiciel d'identification

6. Evaluation de la formation de biofilm :

Il existe différentes méthodes pour détecter la production d'un biofilm. Il s'agit notamment de la plaque de culture en Tissue(TCP) (**Gordon et al., 1985**), la méthode de Tube (TM) (**Christensen et al., 1982**), et la méthode de Rouge-Congo Agar (ARC) (**Freeman et al., 1989**), les dosages bioluminescents, capteurs piézo-électriques (**Zufferey et al., 1987**) et par examen microscopique fluorescent.

Dans le présent travail, les techniques qui sont ont été utilisés pour évaluer la formation de biofilm par une collection de souches identifiées sont : la TCP & RCA.

6.1- Détection de la production de slime sur milieu Rouge Congo Agar (RCA):

La culture sur gélose Rouge Congo est très convenable pour mettre en évidence les souches productrices de slime. Sur ce milieu, les souches exprimant le PIA (Polysaccharide Intracellulaire Adhésif) donnent des colonies noires avec une surface rugueuse contre des colonies de couleur rouge et à surface lisse pour les souches PIA négatif (Chaiebet *et al.*, 2005).

❖ Technique :

Le milieu a été préparé en additionnant 0,8 g de rouge Congo (**Sigma**) et 50 g de saccharose à 1L de Bouillon cœur de cerveau et 10g d'Agar, puis autoclavé à 121°C pendant 15 minutes.

Le milieu est ensemencé avec une anse d'une suspension de souche testée (une colonie dans 20 ml d'eau distillée). La lecture a été faite après une nuit d'incubation à 37 °C et 24 heures supplémentaires à température ambiante (Nasr *et al.*, 2012).

❖ Lecture :

Évaluation de couleur des colonies, selon Satorres et Alcaraz en 2007 ; les souches productrices de slime donnaient des colonies noires à surface ou presque noire contre des colonies rouges, non productrices de slime (Nasr *et al.*, 2012).

Les souches de phénotype variable donnaient des colonies à centre noir et à contour rouge, ou à centre rouge et à contour noir (Touati *et al.*, 2007) (Figure 8).



Figure 8 : Culture sur la gélose Rouge Congo (Hou *et al.*, 2012).

- (A) CRA-positif souche de *S. epidermidis*(colonies noires)
- (B) CRA-positif souche de *S. aureus*(colonies noires)
- (C) CRA-négatif souche de *P. aeruginosa*(colonies rouge)

6.2- Méthode de Plaque de Culture de Tissus (TCP) :

Elle été décrit en 1985 par le groupe de recherche de **Christensen**, qui a pour but d'évaluer semi quantitativement la formation de biofilm.

❖ Technique :

À partir d'une culture pure et jeune (de 24h) on ensemence 5 mL de BHIB et on l'incube à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 18 à 24h(**Tré-Hardy et al., 2007**). Ensuite ; via un densitomètre on ajuste la densité optique (DO) à 0.1 l'équivalent de 10^8 UFC/mL.

On remplit les puits avec de la solution juste après faire les calculs nécessaire en laissant la première ligne pour le BHIB stérile comme témoin (**Figure 9**).

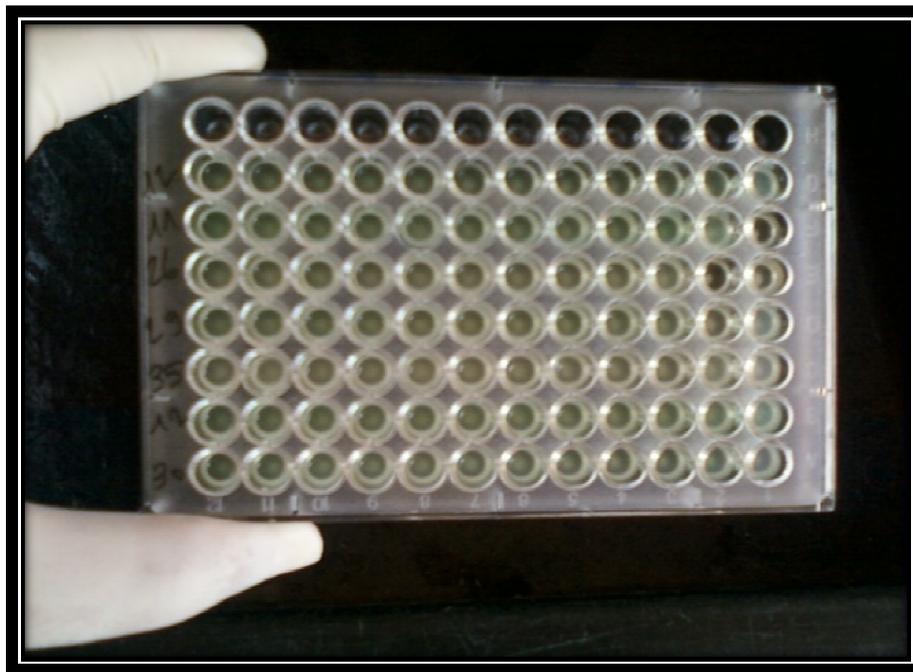


Figure 9 : Technique de formation de biofilm sur microplaque de titration.

la couche de biofilm adhérente dans chaque tube est colorée avec du Crystal violet (0.1%).Les puits sont ensuite laver avec de l'eau distillée stérile et laisser la plaque se sécher toute la nuit à température ambiante(**Christensen et al., 1982 ; Hola et Ruzicka, 2011**).

❖ **Lecture :**

Les puits sont remplis de l'éthanol et le passage par le lecteur ELISA est nécessaire pour donner directement la DO de chaque puits par rapport au témoin (**Figure 10**).

La formation de biofilm est considéré comme positive lorsqu' un film visible borde le mur et le fond du tube.

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

La lecture de la capacité des souches testées à former le biofilm sur microplaque se fait par comparaison de la DO de témoin avec celles des souches(**Hola et Ruzicka, 2011**).

Absent : $OD \leq OD_t$

Faible : $OD_t < OD \leq 2x OD_t$

Modérée : $2x OD_t < OD \leq 4x OD_t$

Fort : $4x OD_t < OD$

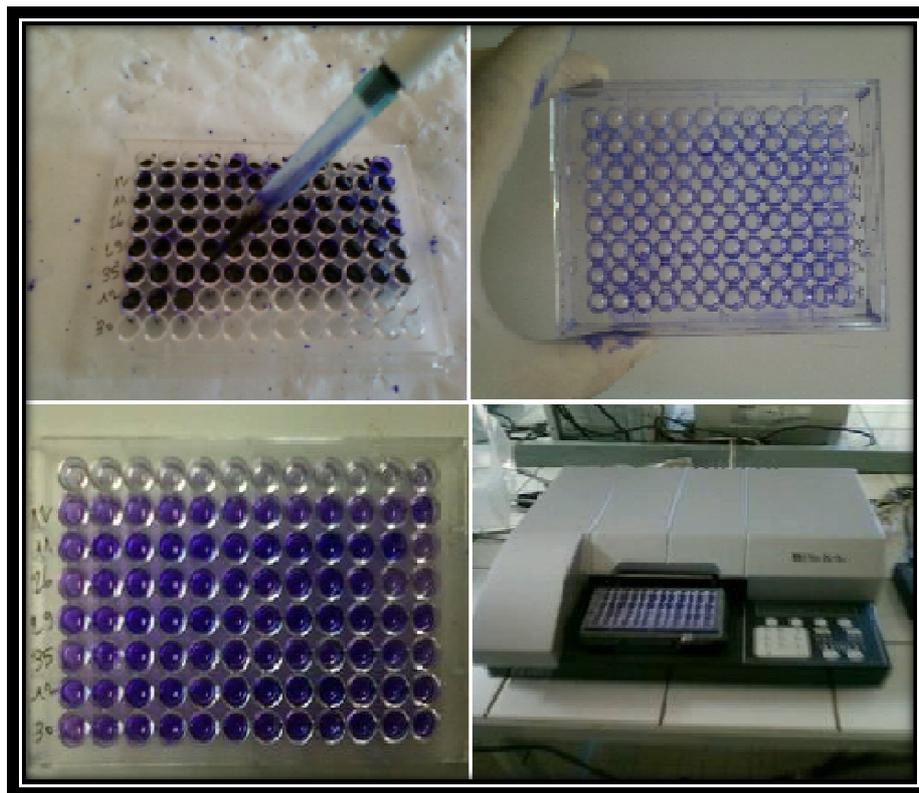


Figure 10: Détection et lecture de biofilm par méthode TCP.

7. Diffusion de biofilm sur gélose au sang :

Les sondes urinaires utilisées aux services d'Urologie, Réanimation et Chirurgie pour plus d'une semaine ont été soigneusement recueillies dans des conditions aseptiques. Les sondes ont été placées individuellement dans des tubes en verre stériles et transportés immédiatement au laboratoire pour analyse.

Le traitement se fait par désinfection de la surface extérieure avec une solution d'hypochlorite de sodium

Après ce traitement, la sonde a été coupée soigneusement de façon aseptique en disques de 3 à 4 mm d'épaisseur (**Figure 11**).

Les disques sont ensuite placés sur la surface de gélose au sang (**Djeribi et al., 2012 ; Storti et al., 2005**). L'incubation se fait à 37 ° C pendant 48-72 heures.

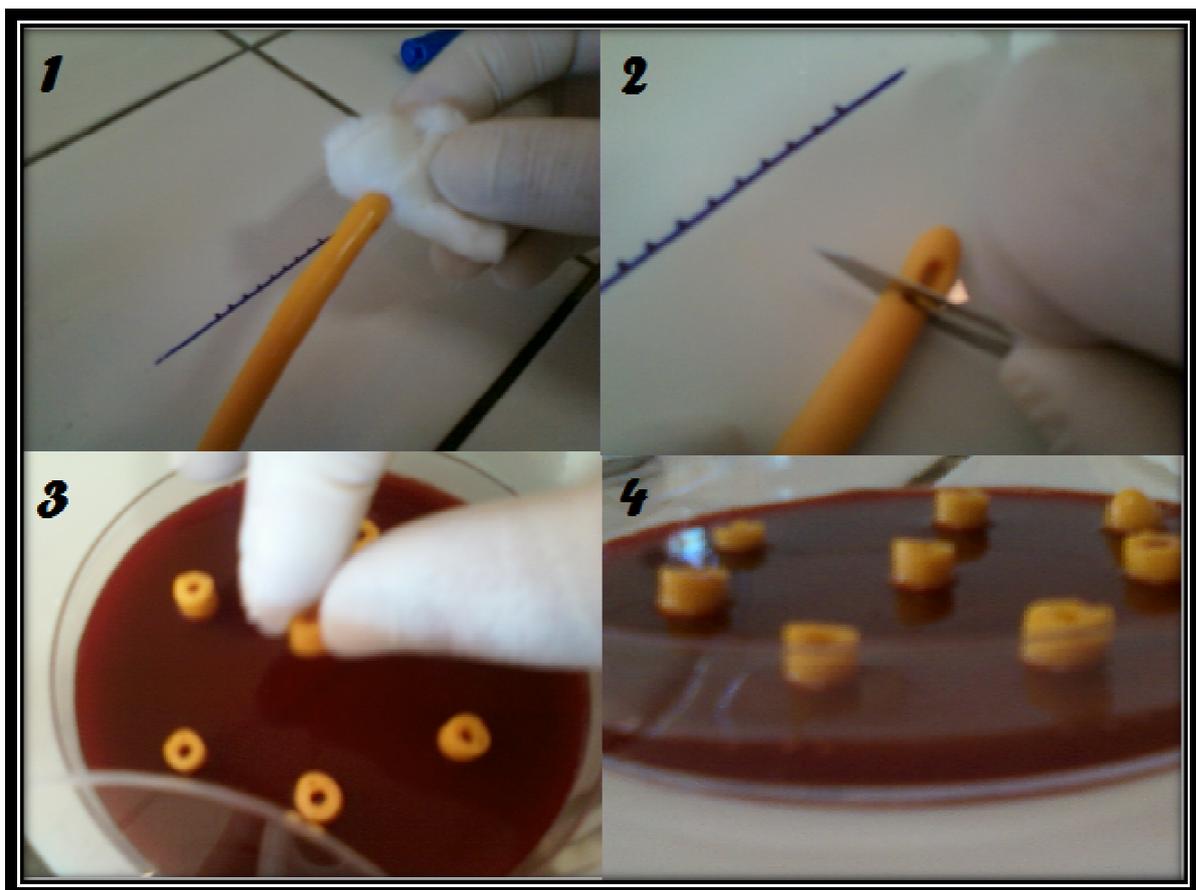


Figure 11: Contact direct de la sonde urinaire avec la gélose au sang

- 1 : Désinfecter la sonde urinaire.
- 2 : Couper en disque la sonde.
- 3, 4 : Déposer les disques sur gélose au sang.

8. Cinétique de la formation de biofilm :

Une sonde urinaire stérile de type Foley a été utilisée pour étudier la cinétique(Djeribi *et al.*, 2012) pendant 15 jours d'incubation.

Le principe de cette technique est de couper la sonde urinaire stérile en disques de 1 cm d'épaisseur.

Contaminer la sonde avec une suspension bactérienne d'une densité optique de 0,1

Incuber à 37°C pendant 15 jours

Suivre la DO tous les 24h(Figure 12).

N.B : la souche qui a été choisie est celle à pouvoir de formation de biofilm élevé par la méthode TCP.



Figure 12: Cinétique de formation de biofilm sur sonde stérile.

Résultats & Discussion

1. Fréquence de prélèvements:

Un total de **48** prélèvements des sondes urinaires a été analysé durant une période d'étude de deux mois. Ces prélèvements ont été collectés à partir de différents services du CHU de Tlemcen (**figure 13**).

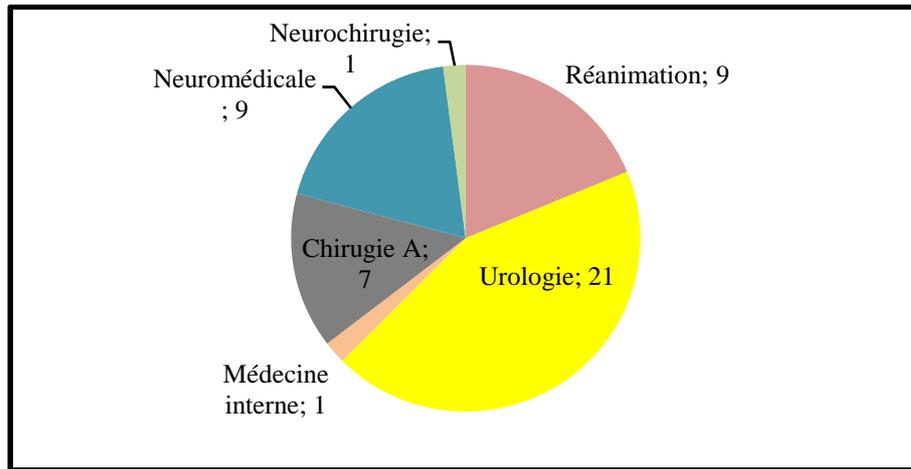


Figure 13 : Répartition de l'ensemble des prélèvements (sondes urinaires) par service. CHU Tlemcen.

Notre travail a été réalisé sur une population de différents âges y compris 33 hommes, 11 femmes et 2 enfants. Le tableau récapitulatif qui regroupe tous les prélèvements est élargi dans l'**Annexe 1**.

2. Dénombrement et confirmation de l'IN sur sonde :

Des cultures indénombrables ont été retrouvées sur des sondes prélevées de patients dans plusieurs services (**Tableau 1**),

Tableau 1 : Dénombrement des bactéries après traitement aux ultrasons.

Prélèvements	Dilutions décimales (UFC/ml)					
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Urologie	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	1.64 * 10 ⁻⁴
Réanimation	Ind	Ind	Ind	4.4 * 10 ⁻⁵		

Ind : indénombrable.

Ces résultats sont en accord avec ceux retrouvés par Pavese, 2003 et Thirion, Williamson, 2003. Une bactériurie $> 10^5$ UFC (Unité Formant Colonie) par ml est le seuil admis pour conclure la présence d'une infection urinaire nosocomiale (IUN) chez les patients non sondés alors elle est environ 10^2 chez les patients porteurs d'une sonde urinaire (Pavese, 2003)



Figure 14 : Culture des microorganismes sur GN (formation de tapis =indénombrable)

3. Identification :

Pseudomonas aeruginosa qui a été identifié présente une culture particulière dans le milieu Muller-Hinton Agar, la couleur ce dernier a viré auvert du à la production du pigment (Figure 15).

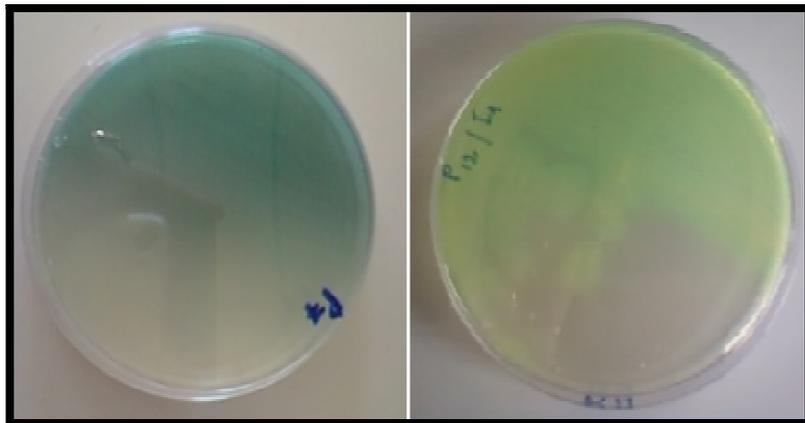


Figure 15 : Culture de *Pseudomonas aeruginosa* sur boîte Pétri.

Nous procédons à l'identification par la galerie Api 20 NE qui est réservée pour les non entérobactéries (**Figure 16**).

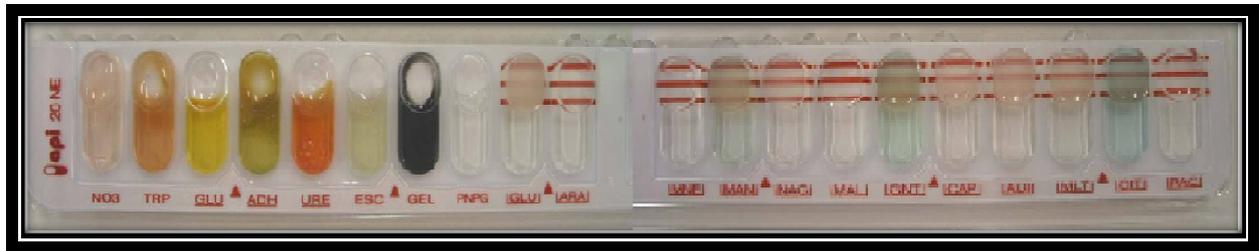


Figure 16: Identification de *Pseudomonas aeruginosa* par la plaque Api 20 NE.

4. Répartition des résultats :

Vingt-neuf sondes urinaires contiennent le *Pseudomonas aeruginosa* (**Tableau 2**) représentent un pourcentage de **60%** ($n= 48$).

Tableau 2 : Résultats des prélèvements effectués au CHU Tlemcen.

Résultats	Prélèvements
Présence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
Total	48

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

Ces infections présentent **40%** des infections nosocomiales, ce qui rend la cause la plus fréquente d'infection nosocomiale selon **Mittal et al., 2009**.

Nos résultats ont été en accord avec **Riegel (2003)** qui a estimé que **20 à 50%** des infections urinaires nosocomiales sont dues à la présence de sonde urinaire.

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

Le sondage des voies urinaires est le facteur majeur, qui prédispose l'hôte à ces infections associé à la sonde urinaire (**Djeribi et al., 2012**).

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

L'étude microbiologique des prélèvements de sondes collectées des patients du service d'Urologie, a révélés 15 souches de *P. aeruginosa* (n=21), 7 patients en service au Réanimation portent le *Pseudomonas aeruginosa* sur un total de 9 (**Figure 17**).

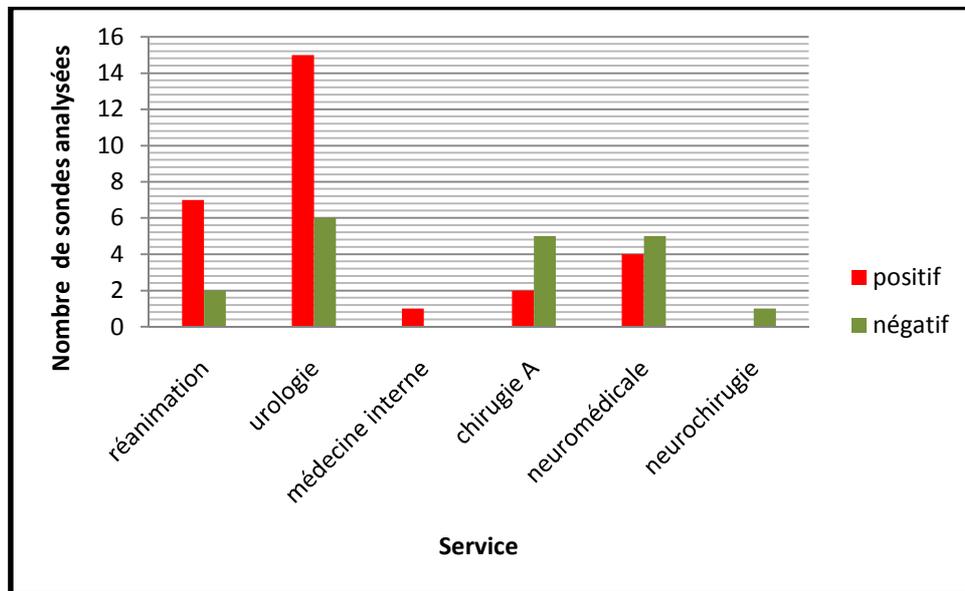


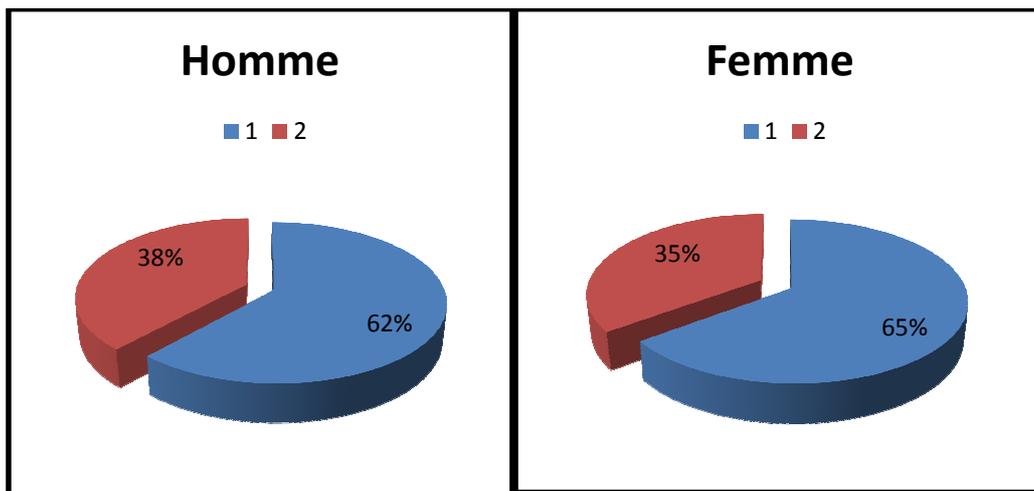
Figure 17 : Répartition des souches de *P. aeruginosa* isolées des sondes urinaires par service.

Selon **Thirion et Williamson (2003)**, les personnes âgées sont les principaux patients touchés ; et le prolongement de la durée du sondage apparaît comme un facteur essentiel dans le risque de développer une infection (**Tambyah P., 2004**).

Le service des soins intensifs représente un point de rencontre entre les patients les plus gravement malades recevant un traitement agressif et des agents pathogènes les plus résistants, qui sont sélectionnés par l'utilisation d'un traitement antimicrobien à large spectre. La plupart des patients qui sont hospitalisés en réanimation reçoivent une sonde urinaire pour surveiller la

production d'urine. Les infections des voies urinaires associées aux cathéters (CAUTI) restent une cause majeure des infections nosocomiales (Leone et al., 2004).

Le pourcentage de présence du *Pseudomonas aeruginosa* sur sondes urinaires est légèrement dominant chez le sexe féminin (65%) par rapport au masculin (62%) contrairement à l'étude de Paves (2003) qui trouve dans son étude que le sexe féminin est le plus touché par l'infection urinaire que le sexe masculin en présence de la sonde urinaire (Figure 18).



1 : présence de *P. aeruginosa*

2 : absence de *P. aeruginosa*

Figure 18 : Pourcentage de *P. aeruginosa* isolés chez les deux sexes

A travers cette étude nous confirmons certains facteurs de risques qui sont susceptibles de provoquer et de maintenir l'IUN sur sonde, ces facteurs sont le diabète (18/29), le HTA (13/29). Ces facteurs ont été confirmés par l'étude de Butreau-Lemaire M. et Botto H. (1997), le Tableau 3 résume (tableau N°)

Tableau 3: Patients infectés et porteurs de *P. aeruginosa* :

Service		Tableau clinique		
		Antécédents	Age	sexe
Urologie	Patient 1	Tumeur de prostate	78	Homme
	Patient 2	HTA, Diabète	90	Homme
	Patient 3	HTA, Diabète, Tumeur de Prostate	84	Homme
Réanimation	Patient 1	AVC	20	Homme
	Patient 2	Mal formation des os	(*) 12	Homme
	Patient 3	AVC	27	Femme
Chirurgie A	Patient 1	Brûlure	30	Femme
Médecine interne	Patient 1	Amputation (gangrène gazeuse)	63	Homme

(*) : Décès du patient (3 mois d’hospitalisation).

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

HTA : Hyper Tension Artérielle

Les sujets brûlés et les sujets qui ont des défenses immunitaires affaiblies sont aussi exposés à l’acquisition du *Pseudomonas aeruginosa* dans les établissements de soins (**Berthelot, 2005**).

5. Evaluation de la formation de biofilm :

Les 29 souches de *P. aeruginosa* isolées ont été testées pour mettre en évidence leur capacité à former le biofilm par deux techniques : méthode de Rouge Congo (RCA) et méthode de Plaque de Culture de Tissu (TCP).

Les résultats sont montrés dans le tableau suivant (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Résultats de la production de slime par la méthode RCA.

Souches	Nombre de souches testés		
	positif	variable	négatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	29
Total	29		

Toutes les souches testées présentent un phénotype négatif dans le milieu Rouge Congo gélosé (**Figure 19**).

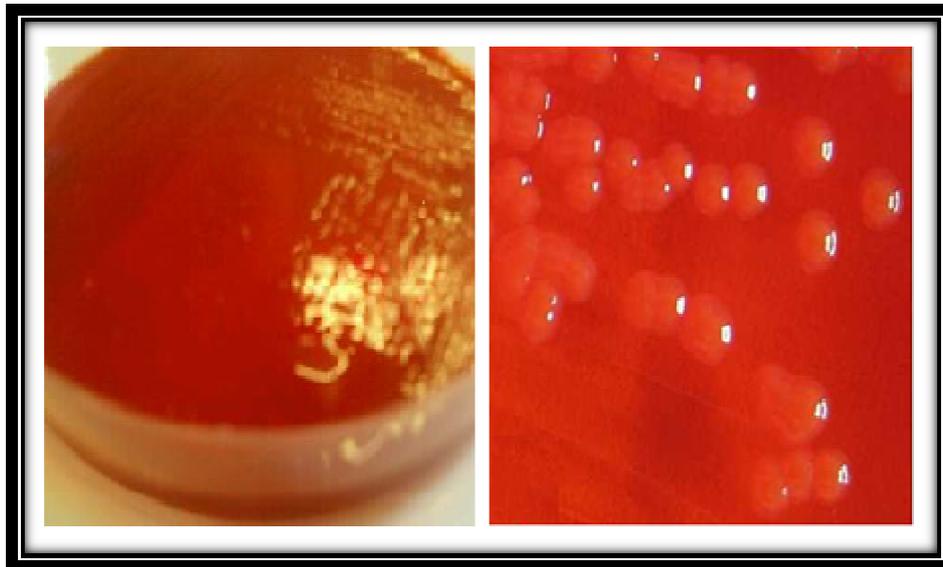


Figure 19 : Culture de *P. aeruginosa* sur gélose Rouge Congo.

Contrairement, la méthode de TCP a donné des résultats plus fiables que celle de RCA (**Figure 20**).

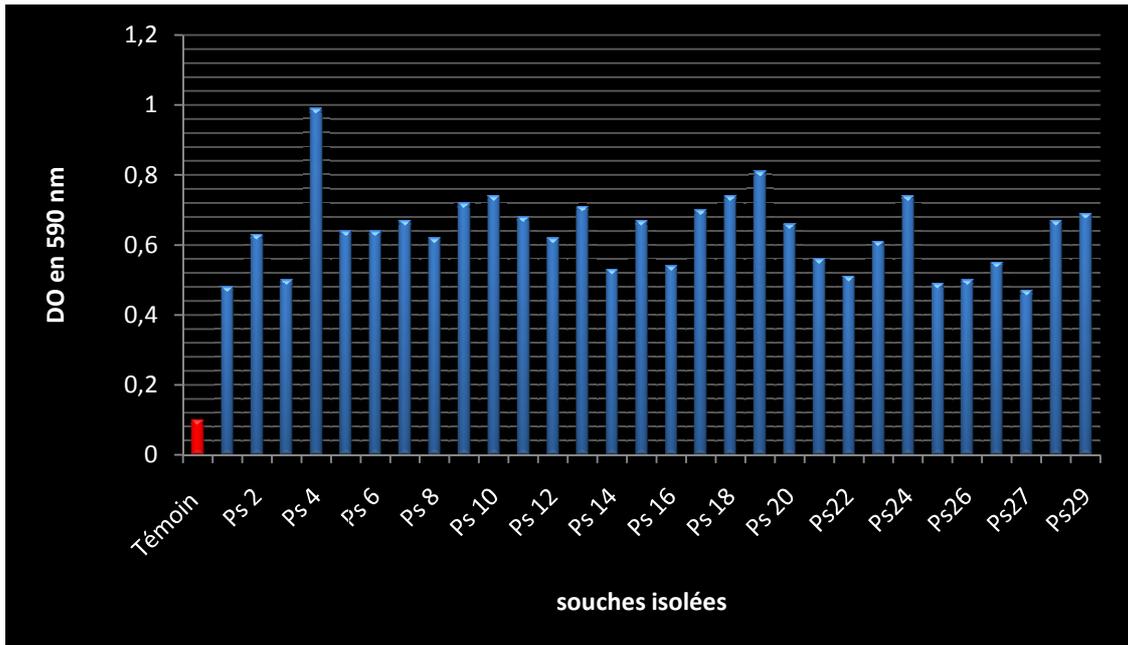


Figure 20 : Evaluation de la formation de biofilm par la méthode TCP

La densité optique (DO) des souches étudiées est 4 fois plus élevée que celle du témoin. Ce qui implique que toutes les souches *Pseudomonas aeruginosa* testées sont de très formatrices de biofilm.

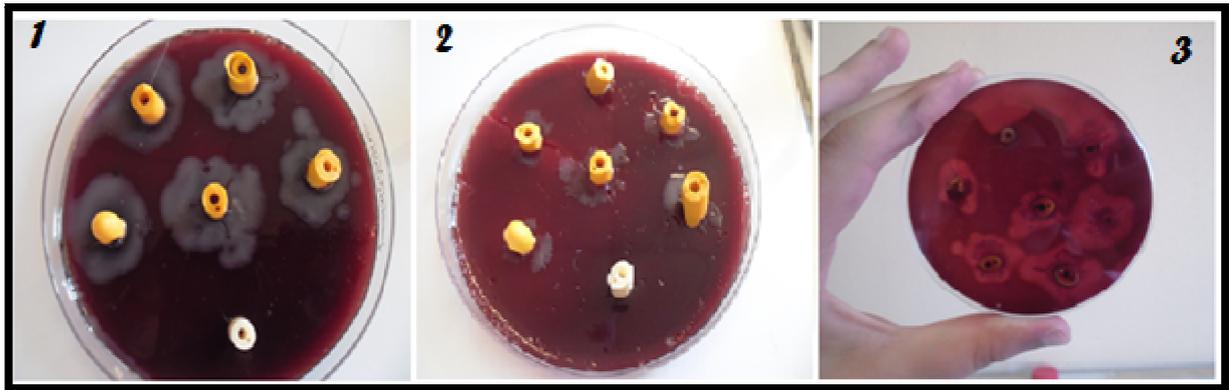
La méthode TCP est la méthode fiable pour quantifier un biofilm *in vitro* que la méthode de RCA (Hou et al., 2012). Dans ce contexte plusieurs travaux ont abouti à ce même résultat, citant Filloux et Vallet en 2003 qui ont essayé d'étudier le biofilm de *Pseudomonas aeruginosa in vitro*.

Coban et al. (2009) a testé la capacité des isolats de *P. aeruginosa* à la formation de biofilm chez des patients atteints de fibrose kystique, la production de biofilm a été détectée par la méthode TCP dans 33,3% des échantillons testés.

L'étude d'Oncel et al. (2010) a révélé que 60% des isolats de *P. aeruginosa* de rhinosinusite chronique produit des biofilms bactériens par la méthode de TCP.

6. Diffusion de biofilm sur gélose au sang :

La gélose au sang utilisé a été préparée à base de Mueller-Hinton Agar. Elle a donné des résultats positifs pour toutes les sondes urinaires testées par cette technique où on constate une bonne diffusion du biofilm au bout de 24 heures (Figure 21).



1 et 3 : Sonde urinaire étudiée prélevée du service d’Urologie

2 : Sonde urinaire étudiée prélevée du service de Chirurgie

Figure 21 : Diffusion de biofilm sur gélose au sang

Selon la technique décrite par **Djeribi et al, (2012)**. Le détachement et la diffusion du biofilm formé à l’intérieur de la sonde urinaire est détecté sur gélose au sang. Les biofilms détachés n’ont pas le même diamètre de diffusion, celles qui ont été collectées à partir des patients du service de Réanimation présentent un diamètre moins important que celui formé par les sondes urinaires collectées à partir des patients du service d’Urologie, sachant que la durée du sondage dépassait les 21 jours dans ce dernier(**Annexe 1**).

7. Cinétique d’adhésion sur sonde urinaire *in vitro* :

Les différentes étapes de formation de biofilm *in vitro* de la souche de *P. aeruginosa* choisie sur une sonde urinaire stérile a été élucidé dans la **figure 22**. En effet, l’étude de cette cinétique d’adhésion montre clairement les différentes étapes de la formation de biofilm.

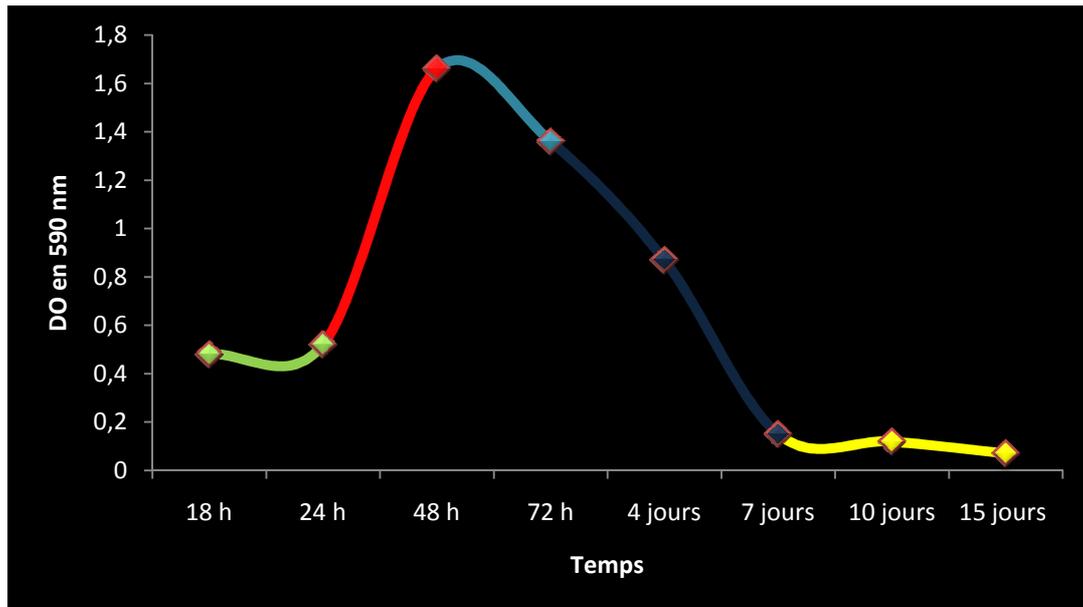


Figure 22 : Cinétique de la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* sur sonde urinaire *in vitro* (suivie de la densité optique en fonction de temps)

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

Pseudomonas aeruginosa a la capacité d'adhérer à une surface inerte (Roux et Chigo, 2006) tel que la sonde urinaire et de former un biofilm dans moins de 24H.

La **Figure 22**, présente les valeurs de la DO et résume les étapes de la formation de biofilm de la souche de *P. aeruginosa* choisie.

Dans les premières heures (18h), l'adhésion était lente ce qui peut correspondre à l'adhésion initiale de la souche avec une entrée en contact avec la surface (DO=0.5), le nombre des bactéries associées à la surface augmente et l'adhésion devient irréversible (Roux et Chigo, 2006). Dans notre cas, la DO augmente et atteint une DO=1.6, le pic de son adhésion se situe vers la 72^{ème} heure d'incubation. Cette étape correspond à la maturation du biofilm.

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

Cette cinétique montre que *Pseudomonas aeruginosa* a la capacité d'adhérer à une surface inerte telle que la sonde urinaire et de former un biofilm dans moins de 24H.

Conclusion

Enfin nous dirons que, La mise en place d'une sonde urinaire perturbe les défenses de l'hôte contre les micro-organismes et rend l'infection possible.

L'espace entre la face externe de la sonde et la muqueuse urétrale est un lieu d'interactions, constituant une porte d'entrée pour les micro-organismes et essentiellement pour le *Pseudomonas aeruginosa*.

Chez le patient sondé deux types de germes sont responsable des IU : le premier type, *Escherichia coli* qui se développe dans l'urine (croissance planctonique) alors que le *Pseudomonas aeruginosa* prolifère sur la surface du cathéter par l'intermédiaire du biofilm.

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées sont des très bonnes formatrices de biofilm ce qui augmente sa pathogénicité et son implantation sur les sondes urinaires et par conséquence des IUN.

La cinétique d'adhésion a révélé que le biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* se forme dès les premières heures de sondage, ainsi l'organisation particulière de ces bactéries en biofilm au niveau des surfaces jouera certainement un rôle primordial en urologie en raison de l'utilisation croissante de matériel prothétique.

Son rôle dans la pérennisation de l'infection prothétique est actuellement reconnu, mais la prévention et le traitement du biofilm en infectiologie urinaire demeurent un problème crucial.

La durée de sondage et maladies chroniques sont des facteurs majeurs dans infections urinaires nosocomiales.

Afin de limiter la colonisation de la sonde urinaire ; 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.

Références bibliographiques

1. **Achermann Y., Vogt M., Leunig M. et al., (2010)**, Improved Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection by Multiplex PCR of Sonication Fluid from Removed Implants, *Journal Of Clinical Microbiology*, 48 (4) : 1208–1214.
2. **Alfandari S., (2003)**, Prévention des infections urinaires nosocomiales : effets de l'infection urinaire nosocomiale sur la durée de séjour, le coût et la mortalité, *Médecine et maladies infectieuses*, 33, 247–254.
3. **Amazian K., Rossello J., Castella A., et al., (2010)**, Prévalence des infections nosocomiales dans 27 hôpitaux de la région méditerranéenne, *Eastern Mediterranean Health Journal*, 16 (10) : 1070-1078.
4. **Berthelot P., (2005)**, Épidémiologie des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderiacepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pathologie Biologie*, 53 : 341–348
5. **Brooun A., Liu S., Lewis K., (2000)**, Dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 44: 640-646.
6. **Butreau-Lemaire M., Botto H., (1997)**, Infections urinaires nosocomiales, *Progrès en Urologie*, 7, 674-682.
7. **Chaieb K., Mahdouani K., Bakhrouf A. (2005)**, Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit, *Journal of Hospital Infection*, 61 : 225–230
8. **Chmielewski et Frank, (2003)**, Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities, *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 2.
9. **Christensen G., Simpson W., Bisno A. et al., (1982)**, Adherence of Slime-Producing Strains of *Staphylococcus epidermidis* to Smooth Surfaces, *Infection And Immunity*. 37 (1) : 318-326
10. **Coban A., Ciftci A, Onuk E. et al., (2009)**, Investigation of biofilm formation and relationship with genotype and antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis [in Turkish]. *Mikrobiyol Bul.* 43: 563–573.
11. **Coloby P., (2007)**, Différents types de sondes urinaires et risques infectieux, Pontoise. In : 101^{ème} congrès français d'urologie, ed : Association Française d'Urologie AFU, disponible sur www.urofrance.net
12. **Conort P., Pariente L., (2005)**, Biomatériaux synthétiques et métaux : application aux prothèses urétrales, *Progrès en Urologie*, 15, 925-941.

13. Davey, M.E., O'Toole, G.O., (2000), Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *MicrobiolMolBiol Revs.* **64** (4), 847-867.
14. Djeribi R., Bouchloukh W., Jouenne T. &Mena B., (2012), Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters, *American Journal of Infection Control*, **40**, 854-859.
15. Donlan R. M., (2002), Biofilms: Microbial life on surfaces, *Emerging Infectious Diseases.* **8** (9).
16. Espinasse F., Page B., Cottard-Boulle B., (2010), Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs, *Revue Francophone des Laboratoires*, **426** : 51- 63.
17. Filloux A., Vallet I., (2003), Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne, *Medecine/Sciences*,**19**, 77-83.
18. Freeman D., Falkiner F., Keane C., (1989), New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci, *J. Clin Pathol.* **42**: 872-874
19. Gordon D. Christensen G. Simpson W., et al., (1985), Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices, *Journal of Clinical Microbiology*, **20** (6) : 996-1006
20. Hassaine H., (2008), Ecologie et lutte contre l'infection hospitalière : thèse Doctorat d'état en Biologie Moléculaire et Cellulaire option Microbiologie. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, 160p.
21. Henerici A., T., (1932), STUDIES OF FRESHWATER BACTERIA I. A DIRECT MICROSCOPIC TECHNIQUE, *Journal of bacteriology*, **25**.
22. Hola V. et Ruzicka F., (2011), The Formation of Poly-Microbial Biofilm on Urinary Catheters, *Urinary Tract Infections*, 153- 172.
23. Hou W., Sun X., Wang Z. et al., (2012), Investigative Ophthalmology & Visual Science, *The Association for Research in Vision and Ophthalmology.* (53) : 9. 5624.5631
24. Irie Y. et Parsek M., (2008). Quorum sensing and microbial biofilm, *Curr Top Microbiol Immunol*, **322**: 67-84.
25. Jamil F., (2001), Towards a catheter free status in neurogenic bladder dysfunction: a review of bladder management options in spinal cord injury (SCI), *Spinal Cord*, **39**: 355- 361.
26. Jouanny P., (2012), 5^{ème} journée « hygiène et prévention des infections » en EHPAD et établissements médico-sociaux en Picardie.

27. **Kaplan J. B., (2010)**, Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses, *Journal of Dental Research*, **89** (3): 205-215.
28. **Lebeaux D., Chigo J., M., (2012)**, Infections associées aux biofilm Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale?, *médecine/sciences*, **28** : 727-739.
29. **Leone M., Garnier F., Avidan M. & Martin C., (2004)**, Catheter-associated urinary tract infections in intensive care units, *Microbes and Infection*, **6**, 1026–1032.
30. **Maki D. G., Tambyah P. A., (2001)**, Engineering out the risk of infection with urinary catheters. *In Emerging Infectious Disease*, **7** (2).
31. **Melchior M. B., Vaarkamp H. & Fink-Gremmels J., (2006)**, Biofilms: A role in recurrent mastitis infections, *The Veterinary Journal*, **171**, 398–407.
32. **Mittal R., Aggarwal S., Sharma S., et al., (2009)**, Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Infection and Public Health*, **2**: 101—111.
33. **Nasr R., AbuShady H., Hussein H., (2012)**, Biofilm formation and presence of icaAD gene in clinical isolates of *staphylococci*, *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. **13** : 269–274
34. **National Institutes of Health. (2007)**, SBIR/STTR Study and control of microbial biofilms (PA-99-084). <http://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-99-084.html>. Published April 21, 1999. Accessed November 2012.
35. **Oncel S., Pinar E., Sener G., et al., (2010)**, Evaluation of bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* (39):52–55.
36. **Pavese P., (2003)**, Infections urinaires nosocomiales : définition, diagnostic, physiopathologie, prévention, traitement, *Médecine et maladies infectieuses*, **33**, 266–274.
37. **Phillips PL., Wolcott RD., Fletcher J. & Schultz GS, (2011)**, Biofilms made easy, *Wound International*, **1** (3).
38. **Rahme LG, Ausubel FM, Cao H, et al., (2000)**, Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**: 8815-8121.
39. **Rakotorivony S. T., Mriel A., Razafimpanarivo M. et al., (2009)**, Profil bactériologique des infections urinaires nosocomiales en réanimation chirurgicale de deux CHU à Antananarivo, *Revue d'Anesthésie-Réanimation et de Médecine d'Urgence*, **1** : (3), 15-17.

40. **Riegel P., (2003)**, Aspects bactériologiques des infections urinaires nosocomiales. *Médecine et maladies infectieuses*, **33**, 255–265.
41. **Rossignol G., (2007)**, Contribution à l'étude de facteurs de virulence d'une souche hospitalière de *Pseudomonas fluorescens* : Activité hémolytique et variation phénotypique, thèse Doctorat en Biologie option microbiologie: Université de Rouen, pp 265.
42. **Roux A., Chigo J., M., (2006)**, Les biofilms bactériens, *Bull. Acad. Vét.*, 261-268.
43. **Satorres S., Alcaráz A., (2007)**, Prevalence of *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients and hospital staff, *Cent Eur J Public Health*, **15** (2): 87–90
44. **Stanley N., R., Britton A., R., Grossman A., D. & Lazazzera B., A., (2003)**, Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays, *Journal of Bacteriology*, **185** (6): 1951-1957.
45. **Stepanovic S., Dragana Vukovic D., Dakic I. et al., (2000)**, A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation, *Journal of Microbiological Methods*, **40** : 175–179
46. **Storti A., Pizzolitto A. et Pizzolitto E., (2005)**, Detection of mixed microbial biofilms on central venous catheters removed from intensive care unit patients,
47. **Tambyah P., A., (2004)**, Catheter-associated urinary tract infections: diagnosis and prophylaxis, *International Journal of Antimicrobial Agents*, (**24**):44–48
48. **Thirion J. G., Williamson D., (2003)**, Les infections urinaires : une approche clinique, *Pharmactuel*, **36** (5).
49. **Tielen P., Narten M., Rosin N., et al., (2011)**, Genotypic and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urinary tract infections, *International Journal of Medical Microbiology*, **301**: 282–292.
50. **Tomlin, K. L., R. Malott J. et al., (2005)**. Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilm, *Appl Environ Microbiol* **71**(9): 5208-5218.
51. **Touati A., Achour W., Abbassi et al., (2007)**, Détection des gènes *ica* et de la production de slime parmi des souches de *Staphylococcus epidermidis* isolées d'infections liées aux cathéters chez des patients neutropéniques, *Pathologie Biologie*, **55** : 277–282

52. **Trautner B., W., Darouiche R., O., (2009)**, Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection, *Am J Infect Control*, **32** (3), 177–183.
53. **Tré-Hardy M., Vanderbist F., Traore H., (2008)**, In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures.
54. **Vallet I., Olson J. W., Lory S., Lazdunski A. & Filloux A., (2001)**, The chaperone usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation, *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, **98** (12), 6911–6916.
55. **Zobell C. E., (1943)**, The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *J Bacteriol*, **46**:39-56.
56. **Zufferey J., Rime B., Francioli P., et al., (1988)**, Simple Method for Rapid Diagnosis of Catheter-Associated Infection by Direct Acridine Orange Staining of Catheter Tips, *Journal of Clinical Microbiology*, **26** (2) : 175-177

Annexe

Annexe 1 :Tableau récapitulatif des patients

Prélèvement	Service	Sexe	Age (ans)	Durée de sondage (jours)
P1	Réanimation	E	16	1
P2	Réanimation	E	12	3
P3	Médecine interne	H	63	6
P4	Urologie	H	85	21
P5	Urologie	H	90	21
P6	Urologie	H	87	21
P7	Urologie	H	78	21
P8	Urologie	H	72	21
P9	Urologie	H	64	21
P10	Urologie	H	90	21
P11	Réanimation	H	20	4
P12	Urologie	H	65	21
P13	Urologie	H	84	21
P14	Réanimation	H	20	3
P15	Neurochirurgie	H	50	48
P16	Urologie	H	52	21
P17	Chirurgie A	H	60	3
P18	Chirurgie A	H	32	4
P19	Chirurgie A	H	55	4
P20	Urologie	H	82	21
P21	Urologie	H	68	21
P22	Urologie	H	80	21
P23	Neurmédicale	F	64	7
P24	Neurmédicale	H	80	6
P25	Neurmédicale	F	71	10
P26	Urologie	H	85	21
P27	Neurmédicale	F	68	15
P28	Urologie	H	75	21
P29	Urologie	H	73	21
P30	Neurmédicale	F	60	10
P31	Neurmédicale	F	93	7
P32	Urologie	H	81	21
P33	Neurmédicale	F	62	8
P34	Chirurgie A	H	35	3
P35	Chirurgie A	F	30	3
P36	Réanimation	H	40	3
P37	Urologie	H	70	21
P38	Urologie	H	76	21
P39	Urologie	H	90	21
P40	Urologie	H	65	21
P41	Neurmédicale	H	84	5
P42	Réanimation	H	45	3
P43	Neurmédicale	F	42	9
P44	Réanimation	F	40	3
P45	Chirurgie A	H	35	3
P46	Chirurgie A	F	35	4
P47	Réanimation	F	27	3
P48	Réanimation	H	28	3

تلخيص

الشريط الحيوي هو مجموعة من الكائنات الحية الدقيقة التي تنمو على السطح. قد يتشكل هذا الشريط على الأنسجة الحية مثلما يتشكل أيضا على الأجهزة الطبية. والغرض من هذا الدراسة هو اختبار قدرة الزائفة الزنجارية المعزولة عن القسطرة البولية من المستشفى الجامعي - تلمسان - على تشكيل شريط حيوي بواسطة طريقتين و .
من مجموع 48 قسطرة بولية، 29 منها تحتوي على الزائفة الزنجارية. جميع السلالات التي تم تحصيلها تعتبر منتجة قوية للأشرطة الحيوية. القسطرة البولية المزروعة لعدة أيام أظهرت انتشار مهم في أجار الدم، ويتم تشكيل الشريط الحيوي مخبريا في ظرف أقل من 24 ساعة ولا يتبعثر إلا بعد الساعة الخمسين.
الكلمات المفتاحية : الزائفة الزنجارية، الشريط الحيوي ، قسطرة بولية ، التهابات بولية مستشفائية.

Résumé

Un biofilm est une communauté de micro-organismes qui s'adhèrent à la surface. Ce biofilm peut se former sur des tissus vivants comme il se forme sur des dispositifs médicaux. Le but de cette étude est de tester la capacité de *Pseudomonas aeruginosa* isolées à partir des sondes urinaires du CHU Tlemcen à former un biofilm par deux méthodes. Méthode de Plaque de Culture de Tissus (TCP) et la méthode de Rouge Congo Agar (RCA). Sur les 48 sondes urinaires étudiées ; 29 contiennent le *Pseudomonas aeruginosa*. Toutes les souches collectées sont des fortes productrices de biofilm. Les sondes urinaires implantées pour plusieurs jours donnent une diffusion importante dans la gélose au sang, et la formation de biofilm *in vitro* se fait dans moins de 24 heures et ne se disperse qu'après la 50^{ème} heure.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, sonde urinaire, infection urinaire nosocomiale

Abstract

A biofilm is a community of microorganisms that adhere to the surface. This biofilm may form on living tissue as it forms on medical devices. The purpose of this study is to test the ability of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary catheters -Tlemcen University Hospital- to form a biofilm by two methods. Method of Tissue Culture Plate (TCP) and the method of Red Congo Agar (RCA). Of the 48 urinary catheters studied, 29 contained *Pseudomonas aeruginosa*. All collected strains are strong producers of biofilm. Urinary catheters implanted for several days provide an important distribution in blood agar and biofilm formation *in vitro* is done in less than 24 hours and not dispersed until the 50th hour.

keywords : *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, urinary catheter, urinary catheter tract infection.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ