

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Centre Universitaire Salhi Ahmed – NAAMA
Institut des Sciences et de Technologie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



En vue de l'obtention du **diplôme de MASTER Académique**

En : science biologique

Spécialité : microbiologie appliquée

Présenté Par : BENDJABALLAH Fatima Zahra et ZIANE Asma

Intitulé

Evaluation de la formation du biofilm par *Klebsiella pneumoniae* isolées des différents cathéters.

Soutenu, devant le jury composé de :

Président :	Mr GHERIB Mohammed	M.C.A	CUN Naâma
Encadreur :	Mme LAGHA Nouria	M.C.A	CUN Naâma
Examinatrice :	Mme DEROUICHE Salima	M.A.B	CUN Naâma

Session : (juillet 2021)

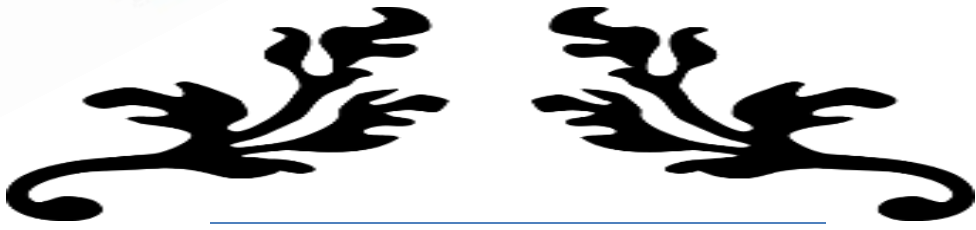
Promotion : 2020 / 2021

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

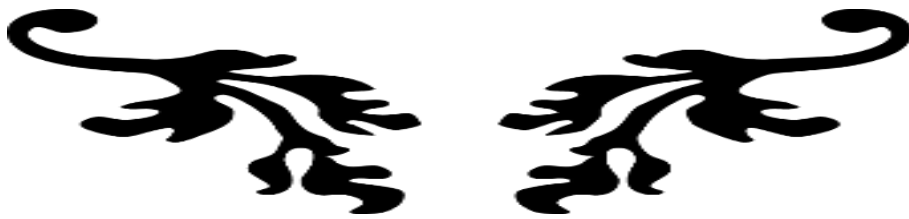
قَالُوا سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا
عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

صدق الله العظيم

سورة البقرة آية (32)



Remerciements





Avant de commencer la présentation de ce travail, nous remercions tout d'abord NOTRE BON DIEU du fond du cœur qui nous a donné du courage, de la volonté et du savoir pour réaliser ce modeste travail.

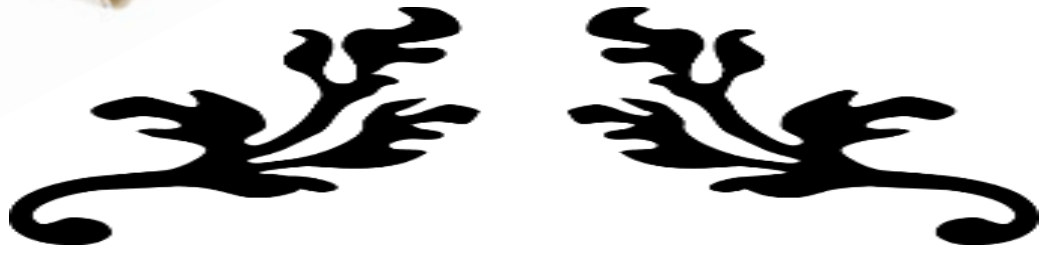
Nos remerciements s'adressent particulièrement au Madame LAGHA NOURIA, pour son encadrement de qualité, sa motivation professionnelle, ses conseils et critiques constructives, ses corrections, sa gentillesse et sa patience ainsi pour le temps qu'il a consacré à la réalisation de ce travail.

Nous souhaitons aussi remercier tous les membres du jury présents ce jour. Un grand remerciement a notre cher président, Mr GHERIB MOHAMMED Pour d'être accepté à présider notre travail. Et notre chère examinatrice Mme DEROUICHE SALIMA Pour d'être acceptée aussi à examiner notre travail, ainsi qu'à tous les enseignants du département des sciences de la nature et de la vie.

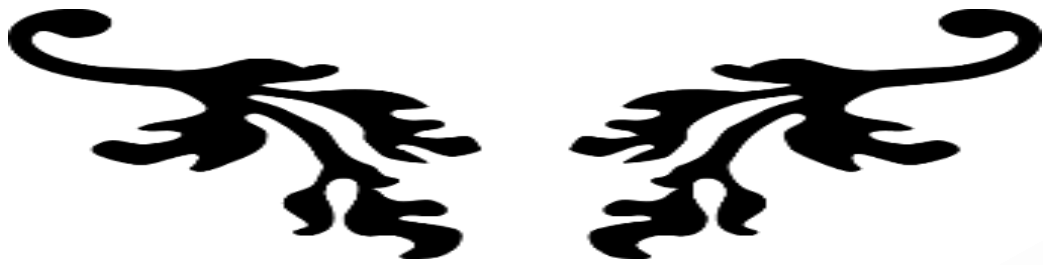
Nous souhaitons également exprimer nos remerciements à tous les enseignants qui m'ont accompagné tous le long de mon parcours et qui m'ont appris tout ce que je sais aujourd'hui.

Enfin, mes remerciements vont vers toutes les personnes qui, de près ou de loin m'ont apporté leur soutien, leur conseil et leur contribution dans l'édification de ce mémoire.





Dedicaces





Je dédie cet humble travail.....✍

✿ A ma très chère mère ✿

Qui m'entourait d'amour et d'affection et qui fait tout pour ma réussite. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

✿ A mon très cher père ✿

Qui m'a aidé à devenir ce que je suis aujourd'hui, que Dieu tout puissant te garde et te procure santé, bonheur et longue vie.

✿ A mon très cher frère Djamel ✿

En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour toi. Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.

✿ A ma chère grand-mère et mon cher grand-père ✿

Je te dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur et de santé.

✿ A toute ma famille: oncles, tantes, cousins et cousines ✿

Avec toute mon affection et mon respect.

✿ À toute la famille Ziane et la famille Cheikh ✿

🌸 Mon binôme Fatima 🌸

Je la remercie pour le courage qu'elle m'a donné et tous les moments que nous avons
passés ensemble.

🌸 Sans oublier mes amis et mes collègues de promotion. 🌸





Je dédie cet humble travail.....✍

✿ A Mes Très Chers Parents ✿

Aucun mot ne saurait exprimer ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance envers les deux personnes les plus chères à mon cœur ! Si mes expressions pourraient avoir quelque pouvoir, j'en serais profondément heureuse. Je vous dois ce que je suis. Vos prières et vos sacrifices m'ont comblé tout au long de mon existence. Que cette thèse soit au niveau de vos attentes, présente pour vous l'estime et le respect que je voue, et qu'elle soit le témoignage de la fierté et l'estime que je ressens. Puisse dieu tout puissant vous procurer santé, bonheur et prospérité.

✿ A ma chère grand-mère ✿

Je te dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur et de santé.

✿ A Mes chères sœurs (Halima et Asma) et à mes chers frères (Mohammed, Miloud, Hamza, Omar, Djalil, Smail, Youcef et Aboubaker) ✿

Je vous remercie pour votre soutien et encouragement, en vous souhaitant un brillant avenir et beaucoup de bonheur.

✿ A toute ma famille: oncles, tantes, cousins et cousines ✿

Avec toute mon affection et mon respect.

✿ À toute la famille Bendjaballah et la famille Boussag ✿

✿ A mon fiancé ✿

Pour sa patience, sa compréhension.

✿ A mes chères copines : Zineb, Sara, Latifa, Lamya, Amina, Lamya, Omayma, Abir, Kawther, Wafaa et Amel pour tous les bons moments ainsi que les moments de désespoir que nous avons partagé.

✿ Mon binôme Asma ✿

Je la remercie pour le courage qu'elle m'a donné et tous les moments que nous avons passés ensemble.

✿ Sans oublier mes amis et mes collègues de promotion. ✿



Table des matières

Remerciements.....	I
Dédicaces.....	II
Liste des abréviations.....	X
Liste des figures	XIII
Liste des tableaux.....	XVI
Résumé.....	XVII

Introduction Générale.....	1
-----------------------------------	----------

Première partie : Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Les infections associées aux dispositifs médicaux : cathéters.....	3
1-Les dispositifs médicaux	3
2- Les cathéters.....	4
2-1- Les types de cathéters à risque de complication infectieuse le plus utilisé!.....	4
2-1-1-Cathéters veineux centraux	4
2-1-2-Les cathéters veineux périphériques	5
3- Pathogénèse de l'infection sur cathéter	5
3-1-Les vois de contamination	5
3-1-1-Contamination extraluminale	6
3-1-2-La contamination endoluminale	6
3-1-3-Contamination hématogène	6
3-2-Colonisation de cathéters	7
3-3- L'infection « clinique » sur cathéter	8

3-4- L'infection « bactériémie » sur cathéter	8
4- Les facteurs de risque de l'infection liée au cathéter	9
5- Germes en cause	10
Chapitre II : <i>Klebsiella pneumoniae</i>.....	11
1- Généralité :	11
1-1- Taxonomie.....	11
1-2- Habitat et pouvoir pathogène.....	11
1-3- Caractères bactériologique	11
1-3-1- Caractères morphologique.....	11
1-3-2- Caractères cultureux.....	12
1-4- Caractères biochimique.....	12
1-5- Structure de la surface de <i>K. pneumoniae</i>	13
1-5-1- La capsule.....	13
1-5-2- Le lipopolysaccharide (LPS).....	14
1-5-3- Les adhésines (Fimbriae)	14
1-5-3-1- Fimbriae de type 1	14
1-5-3-2- Fimbriae de type 3	14
1-6- Pouvoir pathogène de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
Chapitre III : Les antibiotiques	16
1- Définition	16
2- Classification	16
3- Mode d'action	16
4- Résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux antibiotiques.....	17

4-1-Résistance naturelle.....	17
4-2- Résistance acquise	17
Chapitre IV : les biofilms et mécanisme d'adhésion sur les cathéters.....	18
I-Les biofilm bactérienne.....	18
1-Historique.....	18
2- Définition	19
3-Morphologie et composition des biofilms	19
4-Étapes de la formation d'un biofilm	20
4-1-Adhésion réversible.....	20
4-2- Adhésion irréversible	20
4-3- Formation de microcolonie.....	21
4-4-Maturation de biofilm.....	21
4-5- Dispersion de biofilm.....	21
5-Facteurs favorisant la formation d'un biofilm	22
5-1-Caractéristiques de la surface	22
5-2-Caractéristiques du milieu	22
5-3- Propriétés des cellules	22
6-Biofilms et implants médicaux	23
6-1-Biofilms associés aux cathéters vasculaires.....	23
7-Le biofilm face aux antibiotiques	24
8- Régulation de la formation des biofilms	24
8-1-Le quorum sensing.....	24
8-1-1-Definition	24

8-1-2-Les molécules du quorum sensing	25
---	----

Deuxième partie : Matériel et Méthodes

1-Prélèvements	26
2-Ensemencement.....	26
3- Isolement et purification.....	27
4-Identification.....	27
4-1- Tests préliminaires.....	27
4-1-1- Examen macroscopique.....	27
4-1-2- Examen microscopique (Coloration de Gram).....	27
4-2-Identification par la Galerie Api 20 E.....	28
5- Détection de la capsule	32
6-Antibiogramme.....	32
7-Evaluation de la formation de biofilm in vitro.....	34
7-1 Méthode de plaque de culture de tissus (TCP).....	34
7-2- La méthode tube (TM).....	35
7-3 La méthode du Rouge Congo Agar.....	36

Troisième partie : Résultats et Discussion

Résultats

1-Prélèvements	38
2-Caractères bactériologiques des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	39
2-1-Aspect macroscopique.....	39
2-2- Aspect microscopique.....	40
2-3- Caractères biochimiques.....	40

3- Détection de la présence de la capsule des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	41
4- Résistances aux antibiotiques : (Antibiogramme).....	41
5-Evaluation de la formation du biofilm in vitro par trois techniques.....	45
Discussion.....	51
Conclusion générale.....	54
Références bibliographiques.....	55
Annexes	

Liste des abréviations

ATB : Antibiotique

AHL : Acylhomosérines lactones

ADH: Décarboxylation de l'acide aminé arginine par l'arginine d'hydrolase

AMY: Amygdaline

ARA: Arabinose

AMX: Amoxicilline

AMC : Amoxicilline- acide clavulanique

AN : Acide nalidixique

AK : Amikacine

AMU : Aix-Marseille Université

BLSE : Bêta-lactamase à spectre étendu

BGP : Gélose lactosée au Pourpre de Bromocrésol

BHIB : Brain Heart Infusion Broth

CVC : Cathéter Veineux Central

CVP : Cathéter Veineux Périphérique

CSLM : Microscope confocal laser à balayage

C3G : Céphalosporines de 3ème génération

CIT : Citrate de Simmons

CAZ : Ceftazidime

CTX : Cefotaxime

C: Colistine

CF: Céfalotine

CIP : Ciprofloxacine

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

DM: Dispositifs médicaux

DAPI: Di Aminido Phenyl Indol

DO : Densité optique

DOi : Densité optique initiale

Dot : Densité optique témoin

EPS: Extracellular Polymeric Substance

GEL : Gélatinase

GLU : Glucose

GN : Gentamycine

H₂S : D'hydrogène sulfuré

IAS : Infection Associée aux Soins

ILC : Infections Liées aux Cathéters

IND : Indologène

INO : Inositol

IMP : Imipenème

KT : Cathéter

KTVC : Cathéter Veineux Central

LPS : Le lipopolysaccharide

LDC: Décarboxylations de l'acide aminé lysine par la lysine décarboxylase

LAMAABE : Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédical et l'Environnement

LMGE : Laboratoire Microorganismes : Génome Environnement

MAN: Mannitol

MEL: Mélibiose

ONPG: orthonitrophényl- β -galactoside

ODC: Décarboxylations de l'acide aminé ornithine par l'ornithine décarboxylase

OFX: Ofloxacin

PIA: Polysaccharide Intercellular Adhesion

QS: Quorum sensing

RHA: Rhamnose

RCA: Rouge Congo Agar

SOR: Sorbitol

SAC: Saccharose

TS: Gélose Trypticase-Soja

TDA : Tryptophane désaminase

TB : Tobramycine

TET : Tétracycline

TCP : Plaque de culture de tissus

TM : Méthode tube

URE : Uréase

UFC : Unité formatrice de colonie

V.L.A. F : Violet. Lugol. Alcool. Fischine

Liste des figures :

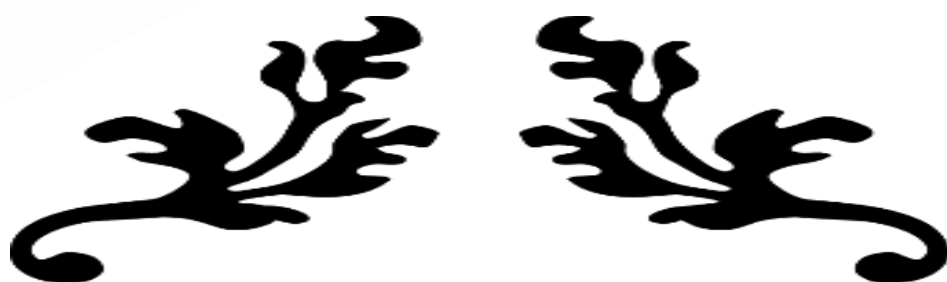
Figure 1 : Les dispositifs médicaux.....	3
Figure 2 : Infections liées aux cathéters (locale).....	4
Figure 3 : CVC inséré au niveau de la voie Sous-clavière (service d'anesthésie- Réanimation de l'hôpital militaire Avicenne)	5
Figure 4 : Cathéter veineux central.....	5
Figure 5 et 6 : Configuration générale du cathéter CVP.....	5
Figure 7 : Les voies de contamination des cathéters.....	6
Figure 8 : Mécanismes de l'infection liée aux cathéters.....	7
Figure 9 : La colonisation du cathéter.....	7
Figure 10 : Le passage de colonisation à infection.....	8
Figure 11 : Les facteurs de risque de l'infection.....	9
Figure 12 : Les germes en cause qui se trouvent dans CVP et CVC	10
Figure 13 : Habitat de <i>K. pneumoniae</i>	11
Figure 14 : <i>K. pneumoniae</i>	11
Figure 15 : La forme bacille de <i>K. pneumoniae</i>	12
Figure 16 : La culture de <i>K. pneumoniae</i>	12
Figure 17 : Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de <i>Klebsiella sp</i>	13
Figure 18 : Structure fibrillaire couvrant la surface bactérienne	14
Figure 19 : Les infections causée par <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
Figure 20 : Mode d'action des antibiotiques.....	17
Figure 21 : Biofilms de la plaque dentaire.....	18
Figure 22 : Observation de biofilm mono-espèce en microscopie électronique à balayage.....	18

Figure 23 : Observation microscopique d'un biofilm bactérien.....	19
Figure 24 : Structure d'un biofilm.....	20
Figure 25 : Développement et structure d'un biofilm bactérien.....	22
Figure 26 : Colonies des <i>Klebsseilla pneumoniae</i> ensemencées sur gélose Mac Conkey.....	26
Figure 27 : Technique de coloration de Gram.....	28
Figure 28 : Préparation de l'inoculum.....	30
Figure 29 : Technique d'ensemencement de la galerie Api 20 E	31
Figure 30: Lecture de la galerie API 20 E.....	31
Figure 31 : Identification de la souche.....	32
Figure 32 : Antibiogramme.....	33
Figure 33 : Technique de formation de biofilm sur microplaque.....	35
Figure 34 : Remplissage des puits par l'éthanol.....	36
Figure 35 : Comparaison des prélèvements du 4 études.....	39
Figure 36 : Observation macroscopique de <i>K. pneumoniae</i> sur le milieu Mac Conkey.....	40
Figure 37 et 38 : Examen microscopique après coloration de Gram.....	40
Figure 39 : Identification de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (galerie API20 E).....	41
Figure 40 : Détection de la capsule par l'encre de chine.....	41
Figure 41: Résultats d'antibiogramme d'une souche de <i>K. pneumoniae</i> isolée du service de réanimation.....	42
Figure 42: Image montrant l'effet des disques d'antibiotiques sur suspension de <i>Klebsella pneumoniae</i>	43
Figure 43: Effet des disques d'antibiotiques sur <i>Klebsiella pneumoniae</i>	43
Figure 44: Fréquence de résistance aux antibiotiques des souches <i>K. pneumoniae</i> isolées des dispositifs médicaux étudiés (CHU Tlemcen).....	44

Figure 45: Evaluation de la résistance des souches <i>Klebsiella pneumoniae</i> vis-à-vis les antibiotiques des trois études.....	44
Figure 46 : Evaluation de la production de biofilm par la méthode TCP.....	45
Figure 47 : Evaluation de la production de biofilm par la méthode TM.....	46
Figure 48: Phénotype de production de slime chez <i>K. pneumoniae</i> sur milieu RCA.....	46
Figure 49 : Evaluation de la formation de biofilm par la méthode tube (TM).....	47
Figure 50 : Evaluation de la formation de biofilm par ma méthode des tubes.....	48
Figure 51 : Résultat de la formation de biofilm par la méthode de TCP.....	48
Figure 52 : Résultats de la production de biofilm chez <i>K. pneumoniae</i> par la méthode TCP des deux études.....	49
Figure 53 : Résultats de la production de biofilm chez <i>K. pneumoniae</i> par la méthode TM des trois études.....	50

Liste des tableaux :

Tableau N°1 : Micro-organismes impliqués dans les ILC	10
Tableau N°2 : Caractères biochimique de <i>K. pneumoniae</i>	13
Tableau N°3 : Pathogénicité de l'espèce	15
Tableau N°4 : Liste de micro-organismes isolés à partir de biofilms formés sur des cathéters veineux centraux.....	23
Tableau N°5 : Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative.....	34
Tableau N°6 : Caractéristiques et pathologies rencontrées chez les différents patients.....	38
Tableau N°7: Résultats de la formation du biofilm par les deux techniques TM, TCP et RCA.....	47



Résumés



المخلص :

Klebsiella pneumoniae هي واحدة من الاسباب الرئيسية من العدوى المكتسبة من المجتمع و المستشفيات. هذه الجرثومة هي المسؤولة عن الالتهابات الحادة والمزمنة ، وذلك بسبب قدرتها على التمسك و الالتصاق على الاجهزة الطبية المزروعة و قدرتها على تشكيل الشريط الحيوي.

تشكيل الشريط الحيوي هي عملية حيوية متعددة الخطوات ، من الالتصاق الاول للبكتيريا على الاجهزة الطبية المزروعة لغاية نضج التراكمات.

الهدف من مذكرتنا قائم على مقارنة نتائج الدراسات المختلفة التي أجريت في الجزائر والتي درست خصائص سلالات *Klebsiella pneumoniae* المعزولة من الأجهزة الطبية وتفاعلاتها مع الأسطح الغير حيوية (القسطرة) و بعض العوامل المؤثرة في تشكيل الشريط الحيوي.

حسب الابحاث العلمية أثبتت سلالات *Klebsiella pneumoniae* المعزولة من المجسات البولية أنها مُكونات غشاء حيوي جيد جدًا مقارنة بتلك المعزولة من الأجهزة الطبية الأخرى (القسطرة) ، وأظهرت هذه السلالات المعزولة اختلافًا واضحًا في الحساسية للمضادات الحيوية بين مجموعات العوالق والسكان في الأغشية الحيوية.

الكلمات المفتاحية :

الشريط الحيوي، *Klebsiella pneumoniae* ، الاجهزة الطبية (القسطرة).

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 notre mémoire est basé sur une comparaison des résultats des différentes études réalisées en Algérie qui ont étudié les caractéristiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées des dispositifs médicaux et leurs interactions avec des surfaces abiotiques (cathéters) et quelques facteurs influençant la formation du biofilm. Selon des recherches scientifiques, 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 (cathéters), ces souches isolées ont présenté une nette différence de sensibilité aux antibiotiques entre les populations planctoniques et populations en biofilm.

Mots- clés :

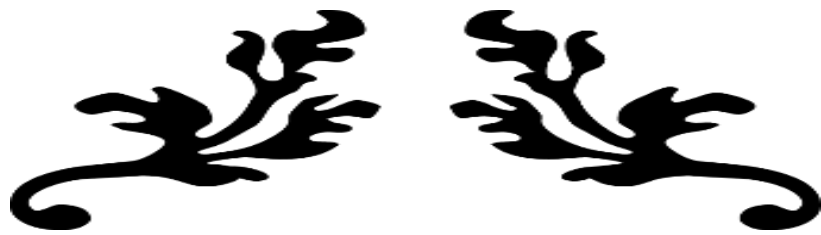
Biofilm, *Klebsiella pneumoniae*, dispositifs médicaux (cathéters).

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 our study is based on a comparison of the results of the various studies carried out in Algeria that studied the characteristics of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from medical devices and their interactions with abiotic surfaces (catheters) and some factors influencing biofilm formation. According to scientific research, strains of *K. pneumoniae* isolated from urinary catheters have proved very good forming the biofilm to those isolated from other medical devices (catheters). This Isolated strains showed a clear difference in antibiotic susceptibility between planktonic populations and biofilm populations.

Keywords:

Biofilm, *Klebsiella pneumoniae*, medical devices (catheters).



Introduction



Actuellement les dispositifs médicaux sont indispensables à la médecine et, durant leur prise en charge, la plupart des malades hospitalisés sont exposés à l'un ou l'autre de ces actes. Cependant, l'implantation temporaire d'un cathéter vasculaire, d'une sonde vésicale ou d'une sonde endotrachéale est associée à un risque infectieux non négligeable puisqu'on estime que 60 % des infections associées aux soins auraient pour origine un dispositif invasif. La physiopathologie de ces infections est étroitement liée à la constitution d'un biofilm sur ces corps étrangers (**Florence et al., 2010**).

Le biofilm a été directement associé aux infections liées aux dispositifs médicaux puisque ce mode de vie assure la survie des bactéries pathogènes dans l'environnement hospitalier en lui procurant une protection contre l'action des agents antimicrobiens ainsi que les défenses immunitaires du patient (**Marti et al., 2011**).

Certains facteurs spécifiques déterminent la susceptibilité d'un dispositif médical à la colonisation bactérienne et à la formation de biofilm tel que la durée d'utilisation, la présence d'un film de conditionnement, le débit et la composition du milieu à l'intérieur ou à la surface du dispositif et le matériau de constitution de ce dernier (**Donlan, 2001**). La structure, l'hydrophobicité de la surface du dispositif ainsi que les espèces bactériennes impliquées constituent les facteurs les plus importants. En effet, les biofilms présents à la surface des dispositifs médicaux implantables peuvent être composés de bactéries Gram positives ou Gram négatives. Ces bactéries peuvent provenir de la peau ou des muqueuses du patient pendant l'implantation ou parfois même, à partir des mains de l'équipe médicale (**M'hamedi, 2015**).

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 multi-résistantes 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 (**Bellifa, 2014**).

Les klebsielles sont les souches les plus fréquemment isolées des infections urinaires. Parmi elles, *Klebsiella pneumoniae* naturellement présentes à faible concentration dans l'environnement, peut favoriser la formation de biofilm. Ce type de bactérie se diffuse dans

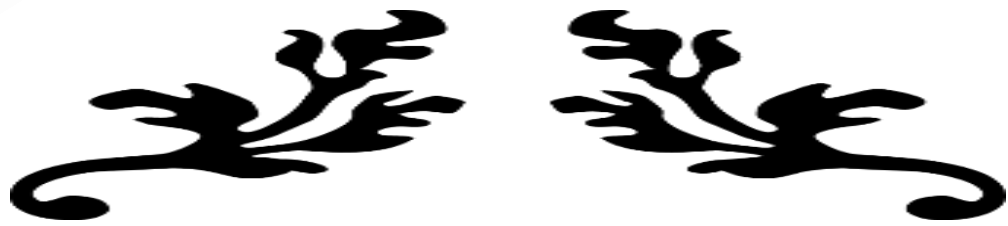
l'environnement hospitalier via des objectifs souillés. Elles sont souvent classées pour agent à l'origine d'infection urinaires nosocomiales (**Balestrino, 2006**).

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.

Dans ce contexte et en tenant compte du pouvoir pathogène de *Klebsiella pneumoniae*, cette présente mémoire est une synthèse des résultats des études vise dans un premier temps à montrer l'implication de ce germe dans les infections associées aux dispositifs médicaux et à évaluer sa capacité à former un biofilm. Dans un deuxième temps

Ce travail est réparti en trois parties principales, à savoir :

- ✓ Une synthèse bibliographique
- ✓ Le matériel et méthodes utilisés
- ✓ Les résultats obtenus des 4 études choisies ainsi qu'une discussion et en fin une conclusion.



Première Partie :

Synthèse Bibliographique



Chapitre I : Les infections associées aux dispositifs médicaux : cathéters

1-Les dispositifs médicaux :

Tout instrument, appareil, équipement, matière, produit, à l'exception des produits d'origine humaine, ou autre article utilisé seul ou en association, y compris les accessoires et logiciels intervenant dans son fonctionnement, destiné à être utilisé chez l'homme à des fins médicales, exemple : Consommables de soins: seringue, cathéter, compresse, poche de sang, masque chirurgical, gants médicaux... ; Instrumentation: scalpel, pince, trocart... ; Implants passifs: prothèse de hanche... ; Équipements biomédicaux: respirateur, bistouri électrique, lit médicalisé, échographe... **(Figure N°01) (Ramiro, 2006).**

Les infections associées aux soins (IAS), reconnues à travers le monde comme un problème de santé publique, sont à l'origine d'un accroissement significatif de la mortalité, de la morbidité et du coût de prise en charge des patients,

Les IAS observées en réanimation sont directement ou indirectement associées aux techniques utilisées et nécessitant notamment la mise en place de dispositifs invasifs (cathéter vasculaire, sonde vésicale, intubation trachéale, etc.) **(Chouchene et al., 2015).**

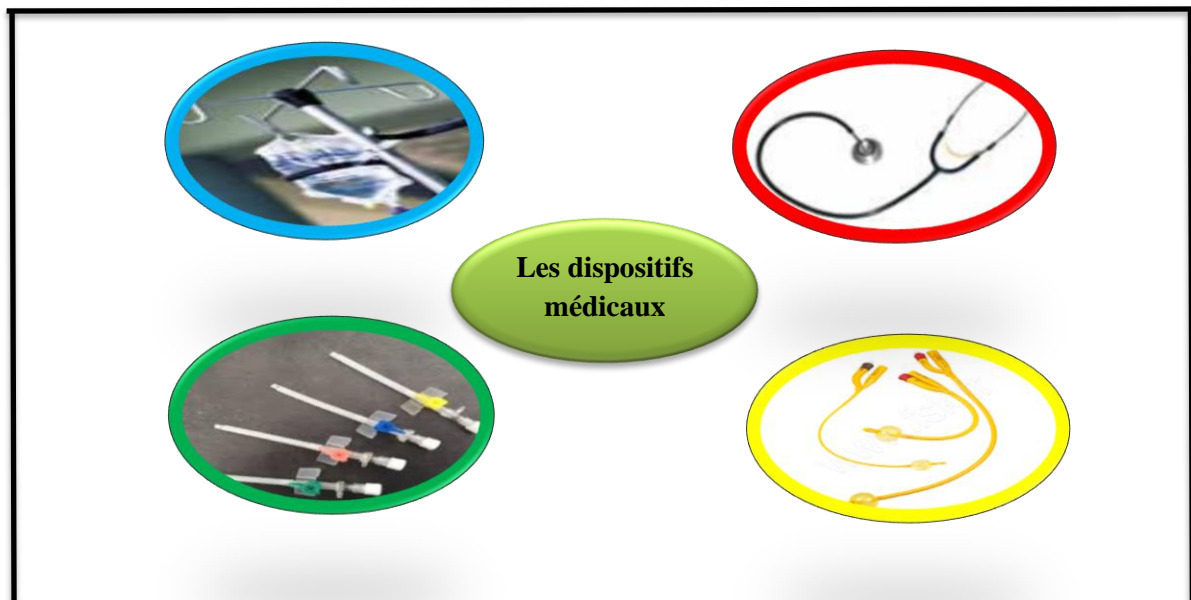


Figure N°1 : Les dispositifs médicaux (Ramiro, 2006)

2- Les cathéters :

Un cathéter est à l'origine d'une brèche dans le revêtement cutané, constituant une porte d'entrée à l'invasion bactérienne (**Figure N°2**).

La contamination, par les flores cutanées, à partir du point d'insertion (contamination externe ou extraluminale) peut-être initiale (lors de la pose) ou secondaire (lors de manipulations à risque infectieux effectuées au niveau de l'émergence du cathéter ou du septum d'un site) (**Michèle et al., 2001**).

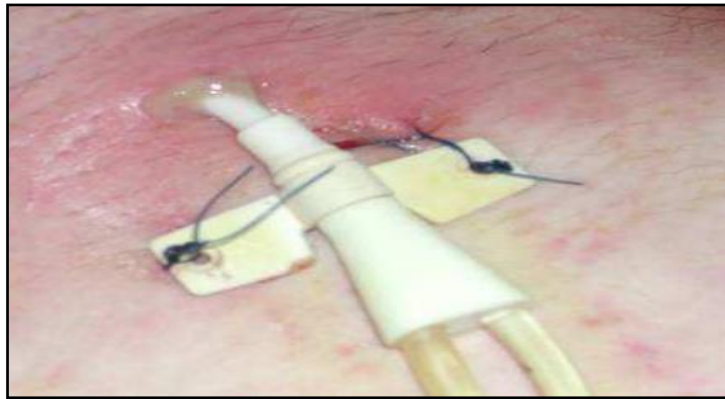


Figure N°2 : Infections liées aux cathéters (locale) (**Elodie, 2016**).

2-1- Les types de cathéters à risque de complication infectieuse le plus utilisé!

2-1-1-Cathéters veineux centraux :

Un cathéter veineux central (CVC) est un tube mince et flexible (cathéter) qu'on met dans une grosse veine au-dessus du cœur. On peut l'insérer dans une veine du cou, du thorax ou du bras. On l'appelle aussi voie veineuse centrale ou voie centrale. Certains cathéters sont munis de 2 ou 3 tubes : on les appelle cathéters à double ou à triple lumière. Cela vous permet de recevoir plus d'un traitement à la fois. Selon le type de cathéter, on peut le laisser en place pendant des semaines, des mois ou des années (**Figure N°3et N°4**) (**Société canadienne du cancer, 2021**).

La bactériémie/ fongémie liée au CVC est définie par : l'association d'une bactériémie/fongémie survenant dans les 48h encadrant le retrait du CVC (**Elodie, 2016**).

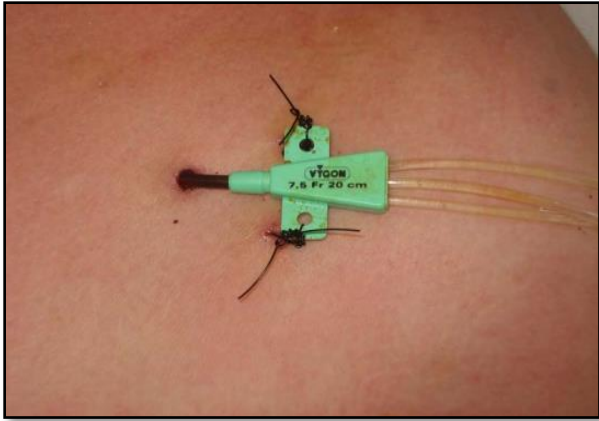


Figure N°3 : CVC inséré au niveau de la voie Sous-clavière (service d'anesthésie- Réanimation De l'hôpital militaire Avicenne) (**Er-Rahmany, 2010**).

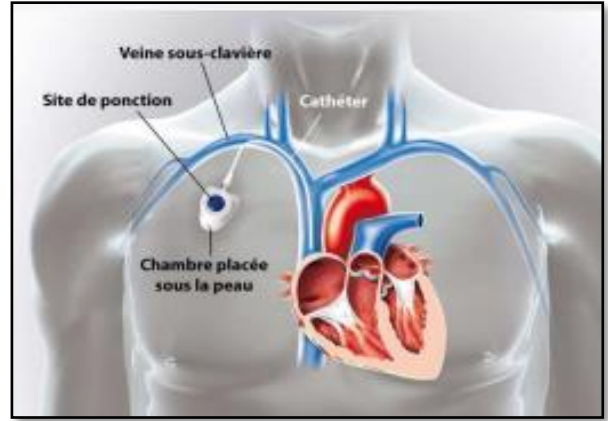


Figure N°4 : Cathéter veineux central (**Elodie, 2016**).

2-1-2-Les cathéters veineux périphériques :

Les cathéters veineux périphériques(CVP) sont des dispositifs médicaux stériles introduits dans une veine superficielle par voie percutanée. Utilisés dans un but diagnostique ou thérapeutique (**Figure N°5et N°6**) (**Emilson, 2012**).

La bactériémie/ fongémie liée au CVP est définie par : l'association d'une bactériémie/fongémie survenant dans les 48h encadrant le retrait du CVP (**Elodie, 2016**).



Figure N°5 et N°6: Configuration générale du cathéter CVP (**Emilson, 2012**).

3- Pathogénèse de l'infection sur cathéter :

3-1-Les voies de contamination :

Trois sources potentielles peuvent entraîner une colonisation de l'extrémité endovasculaire d'un cathéter (**Figure N°7 et N°8**) :

3-1-1-Contamination extraluminale :

La contamination du cathéter par voie cutanée la plus fréquente, et prédomine pour les cathéters de courte durée (moins de 10-20 jours). Elle survient soit lors de la pose et alors évitable par une asepsie rigoureuse, ou lors de la colonisation secondaire du site d'insertion par migration des germes le long du trajet sous-cutané du cathéter au niveau de sa surface externe (**Er-Rahmany, 2010**).

3-1-2-La contamination endoluminale :

Peut-être secondaire aux manipulations septiques des raccords par les mains du personnel soignant. A partir du raccord, les microorganismes migrent le long de la surface interne du cathéter jusque dans sa portion intra vasculaire. La colonisation du cathéter liée à la perfusion de liquides contaminés est exceptionnelle. La contamination endoluminale devient prépondérante pour les cathéters laissés en place plus de plus de trois semaines (nutrition parentérale, oncohématologie) (**Er-Rahmany, 2010**).

3-1-3-Contamination hématogène :

La contamination par voie hématogène à l'occasion d'une bactériémie est rare (**Er-Rahmany, 2010**).

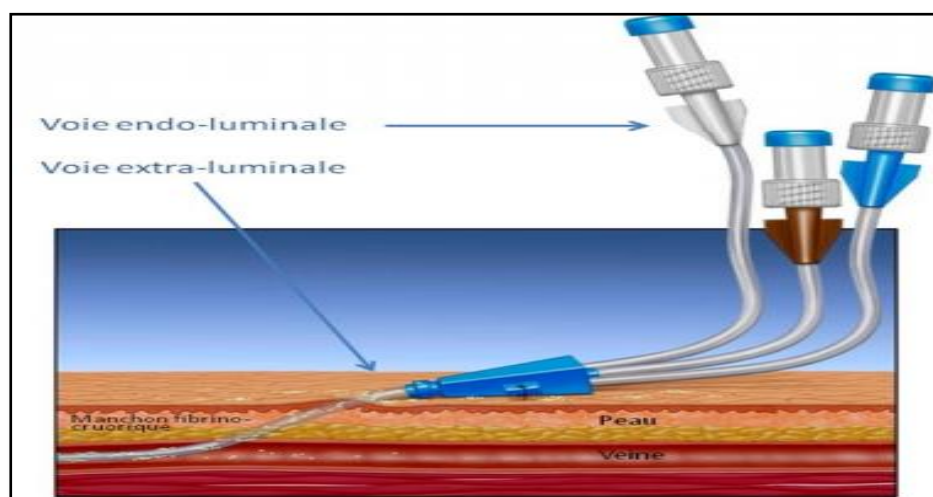


Figure N°7 : Les voies de contamination des cathéters (Mimoz, 2013).

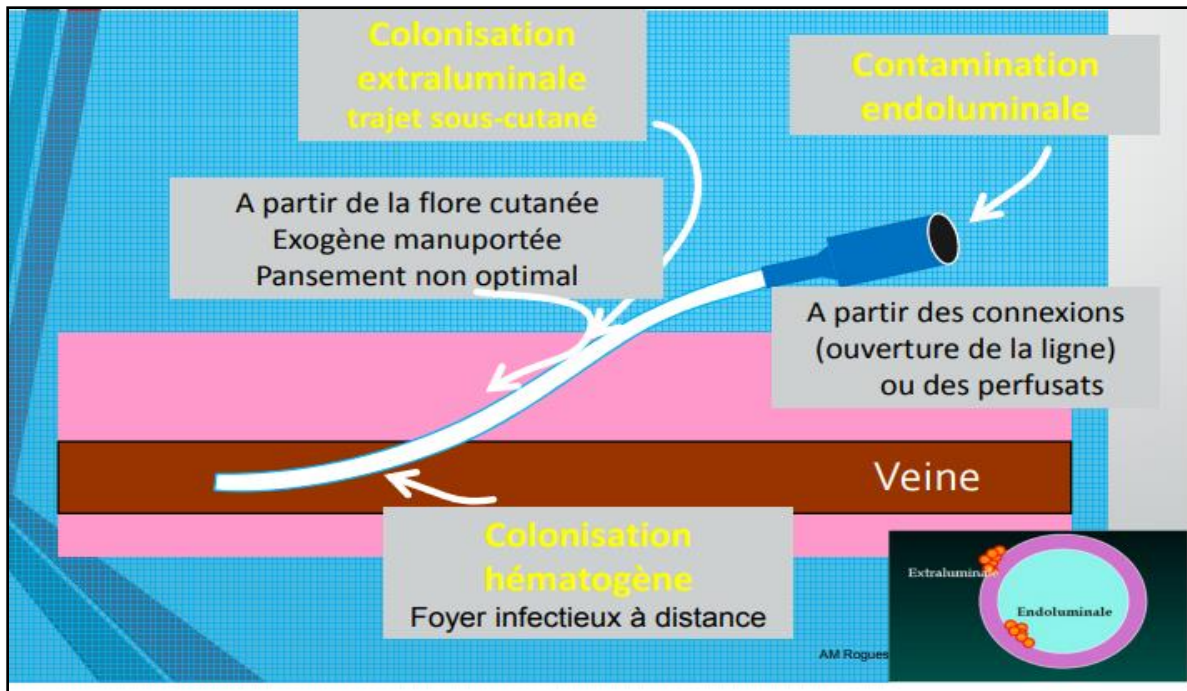


Figure N°8 : Mécanismes de l'infection liée aux cathéters (Elodie, 2016).

3-2-Colonisation de cathéters :

Le contact entre le sang et le cathéter entraîne la formation d'un manchon fibreux qui tapisse rapidement sa portion intravasculaire. Ce manchon contient des protéines qui favorisent l'adhérence bactérienne. Les mécanismes d'adhésion spécifiques des bactéries à ces protéines ne sont que partiellement connus et ils sont multiples et différents d'une bactérie à l'autre. Enfin, certaines bactéries possèdent la capacité d'adhérer de manière non spécifique et de s'enchâsser dans une substance polysaccharidique ou slime (FigureN°10). Le passage de colonisation à infection est fonction du germe et de sa pathogénicité, de la gravité de la pathologie sous-jacente, de l'état de nutrition et du niveau d'immunodépression du patient (Er-Rahmany, 2010).



Figure N°9 : La colonisation du cathéter (Bally et Refutin, 2020).

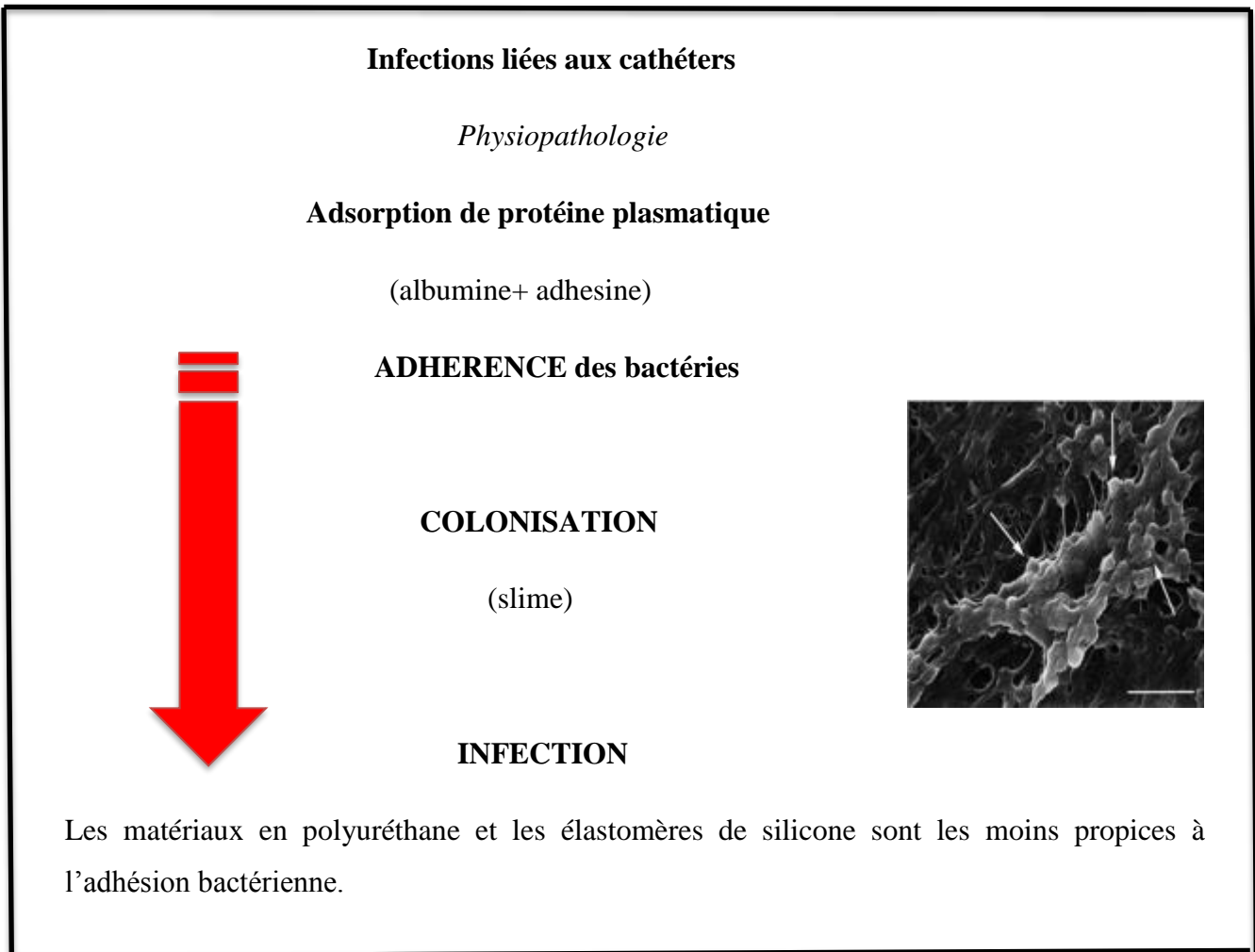


Figure N°10 : Le passage de colonisation à infection (Elodie, 2016).

3-3- L'infection « clinique » sur cathéter :

Se définit soit par une culture positive de l'extrémité du cathéter, en présence de signes locaux ou généraux d'infection, avec résolution au moins partielle des symptômes lors de l'ablation du cathéter, soit par la simple présence de signes locaux d'infection (suppuration au point de ponction, thrombophlébite, infection du trajet et tunnellisation avec aspect de cellulite le long du trajet sous-cutané du cathéter) même si la culture de l'extrémité du cathéter est (ou n'est pas) significative (Samou et Hamel, 2005).

3-4- L'infection « bactériémie » sur cathéter :

Elle est probable en présence d'un sepsis associé à une ou plusieurs hémocultures positives à germes cutanés (*Staphylococcus aureus*, ou *Candida sp*), en l'absence d'une autre source

évidente que le cathéter. Elle est certaine en présence d'un sepsis sans foyer infectieux individualisé associé à l'un des 4 critères suivants permettant d'incriminer le cathéter :

- infection de l'orifice d'insertion du cathéter, due au même germe que celui isolé des hémocultures,
- sepsis résistant au traitement antibiotique, mais cédant dans les 48 heures suivant le retrait du cathéter,
- culture quantitative positive du cathéter, avec isolement du même germe dans les hémocultures quantitatives comparatives positives avec un nombre de bactéries dans le prélèvement issu d'un cathéter au moins 10 fois supérieur à celui du prélèvement issu d'une veine périphérique (Samou et Hamel, 2005).

4-Les facteurs de risque de l'infection liée au cathéter :

Ils peuvent être liés à l'environnement, aux patients, le site d'insertion des KT, la durée de cathétérisation, les techniques de prise en charge et tous les facteurs concourant à une diminution de l'immunité cellulaire et humorale prédisposent certainement aux infections de KT de dialyse. D'autres facteurs de risque potentiels sont classiquement rapportés pour les infections sur KTVC tels que le nombre de lumière et la nature du matériau des cathéters : silicone, polyuréthane..., KT recouvert ou non d'antimicrobiens (Aïssata, 2007).

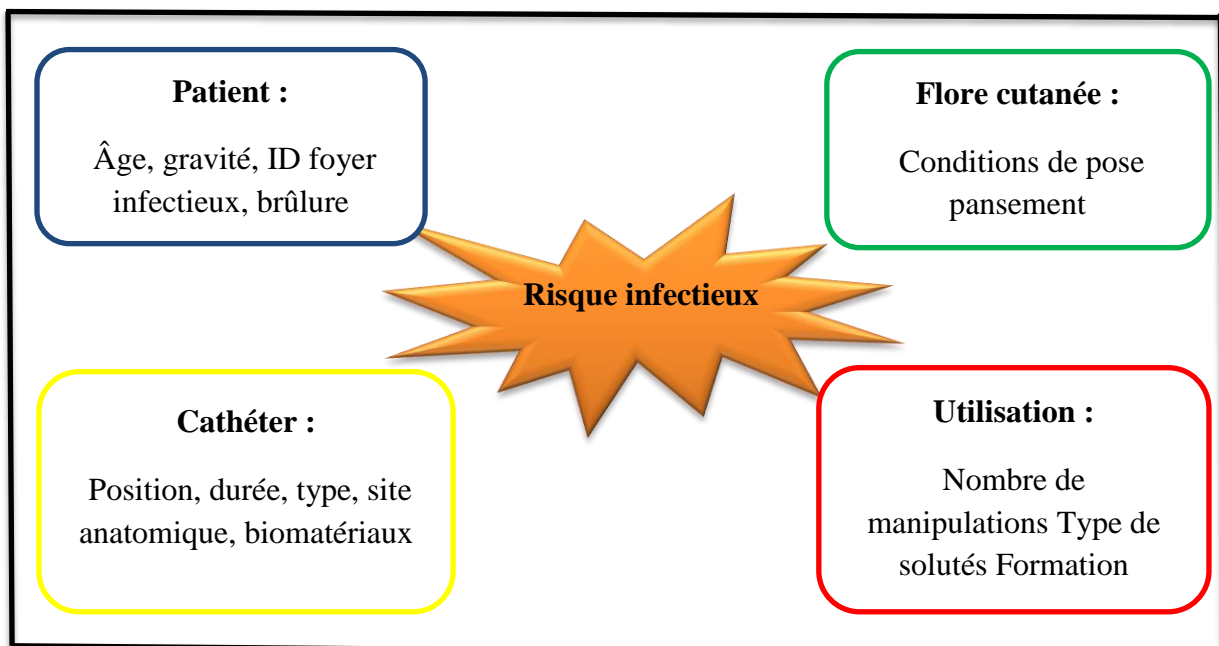


Figure N°11 : Les facteurs de risque de l'infection (Elodie, 2016).

5-Germes en cause :

Les micro-organismes les plus souvent rencontrés appartiennent à la flore cutanée résidente (*Staphylocoque* à coagulase négative, et *Staphylococcus aureus*) ou de substitution (*Enterococcus sp.*, *Entérobactéries*, *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Candida sp.*) du patient ou du personnel soignant. Ces bactéries sont volontiers productrices de « slime » (substance polysaccharidique qui favorise l’adhérence à la surface des matériaux inertes), ce qui augmente leur capacité à coloniser les cathéters et, une fois implantées à résister aux antibiotiques et à la phagocytose. Durant la dernière décennie, les bacilles à Gram négatif ont pris une importance grandissante et représentent actuellement près de la moitié des microorganismes en cause (Mimoz, 2013).

Tableau N°1 : Micro-organismes impliqués dans les ILC (Aïssata,2007).

Micro-organismes	Fréquence
<i>Staphylococcus</i> à coagulase – négative	30 – 40 %
<i>S. aureus</i>	5 – 10 %
<i>Enterococcus SPP</i>	4 – 6 %
<i>P. aeruginosa</i>	3 – 6 %
<i>Candida SPP</i>	2 – 5 %
<i>Enterobacter SPP</i>	1 – 4 %
<i>Acinetobacter SPP</i>	1 – 2 %
<i>Serratia SPP</i>	< 1 %

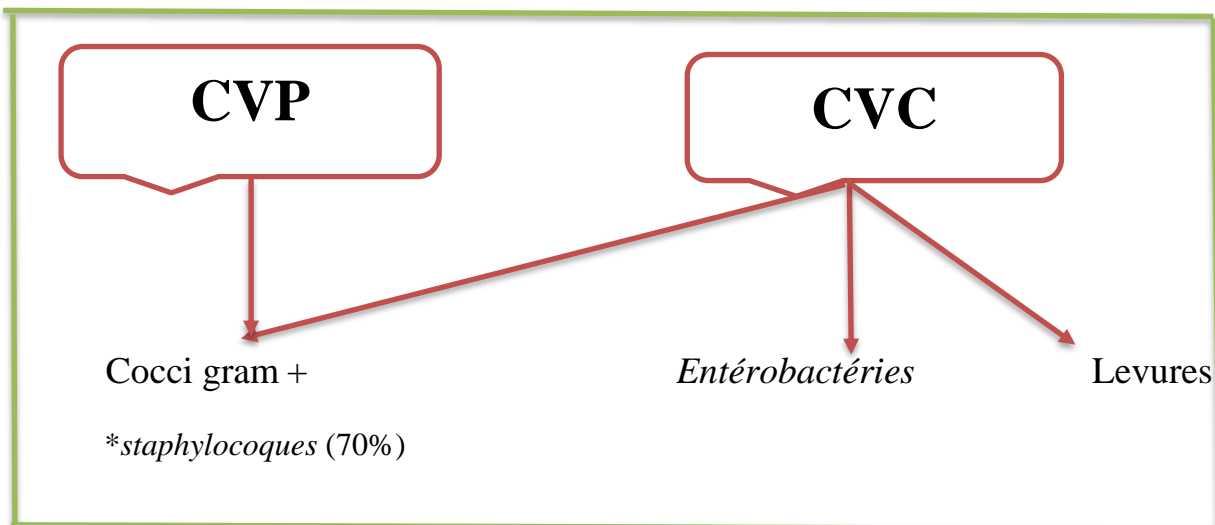


Figure N°12: Les germes en cause qui se trouvent dans CVP et CVC (Elodie, 2016).

Chapitre II : *Klebsiella pneumoniae*

1-Généralité :

1-1-Taxonomie :

Le genre *Klebsiella* appartient à la famille des Enterobacteriaceae, l'ordre Enterobacteriales, le phylum proteobacteria, et le domaine des Bacteria (Yang et al., 2011).

A l'origine, l'importance médicale du genre *Klebsiella* le conduisit à être subdivisé en quatre espèces correspondantes aux maladies engendrées : *K. pneumoniae*, *K. Ozaenae*, *K. rhinoscleromatis*, *K. oxytoca* (Jean et al., 2000).

1-2- Habitat et pouvoir pathogène:

Klebsiella pneumoniae se trouvent partout dans la nature (germes ubiquistes) et participent à la fixation de l'azote dans le sol. On les trouve également dans le tube digestif et dans la flore respiratoire des mammifères y compris l'homme (FigureN°13).

Klebsiella pneumoniae (FigureN°14) est la principale souche humaine, responsable d'infections urinaires, respiratoires ou intestinales. Elle est également l'un des principaux germes des infections nosocomiales. La transmission est le plus souvent fécale-orale, d'où l'importance des mesures d'hygiène et notamment du lavage des mains (Carip et al., 2015).



Figure N°13 : Habitat de *K. pneumoniae*
(Google image)

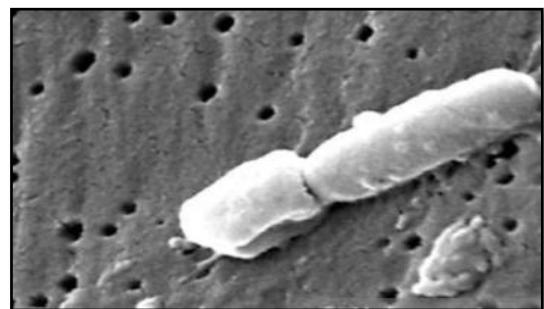


Figure N°14 : *K. pneumoniae*
(Carip et al., 2015).

1-3- Caractères bactériologique :

1-3-1-Caractères morphologique :

Le genre *Klebsiella* rassemble des bacilles à Gram négatif de 0.3 à 1.0µm de diamètre sur 0.6 à 6 µm de longueur, se présentant de manière isolée, ou groupés par deux ou en courtes chaînes (**Figure N°15**) et présentant les caractères généraux de la famille des Enterobacteriaceae (**Sekhri, 2011**)

K. pneumoniae toujours immobile et très souvent capsulé poussant sur milieu ordinaire en atmosphère aéro-anaérobie (**Kassis-Chikhani, 2012**).

1-3-2- Caractères cultureux :

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 (**Figure N°16**) (**Illiaquer, 2010**).

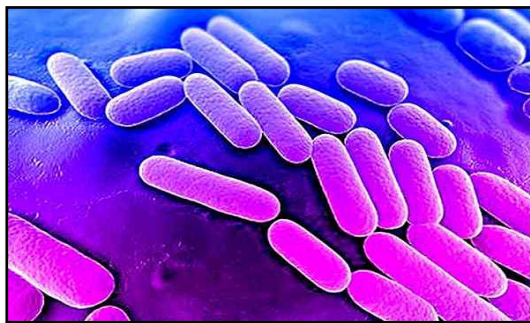


Figure N°15 : La forme bacille de *K. pneumoniae* (**Grosjean et al., 2017**).



Figure N°16: La culture de *K. pneumoniae* (**Grosjean et al., 2017**).

1-4- Caractères biochimique :

K. pneumoniae présente les caractères généraux des entérobactéries : c'est une bactérie aéroanaérobie facultative, fermentant le glucose avec production de gaz, oxydase négative, catalase positive. L'identification phénotypique du genre *Klebsiella* repose essentiellement sur Les caractères biochimiques différentiels illustrés dans le **tableau N°2** (**Belbel, 2013**).

Tableau N°2 : Caractères biochimique de *K. pneumoniae* (Grosjean et al., 2017).

	H ₂ S	Indol	VP	Citracte	Urée	LDC	ODC
<i>Citrobacter freundii</i>	+	-	-	+	-	-	V
<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	-	+	+
<i>Citrobacter koseri</i>	-	+	-	+	V		+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+	+	+	+	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	+	+	+	+	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	+	+	-	-	+
<i>Enterobacter autres</i>	-	-	+	+	-	V	V

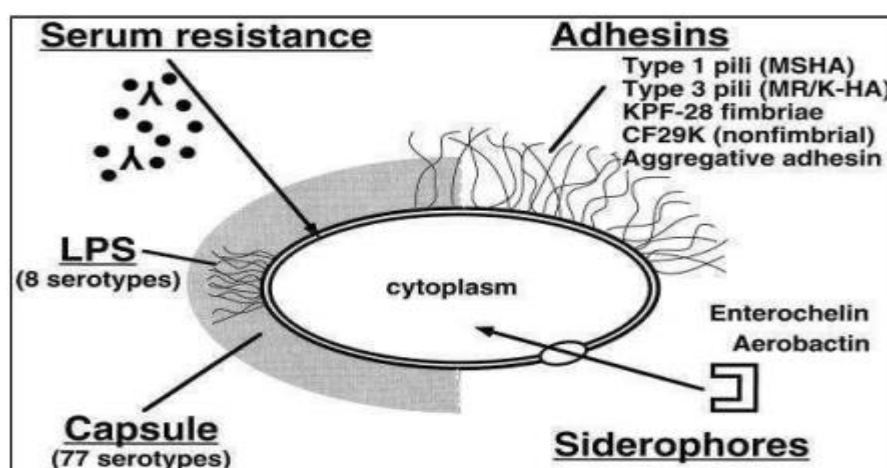
1-5-Structure de la surface de *K. pneumoniae* :

Figure N°17 : Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de *Klebsiella sp.* (Podschun et Ullmann, 1998).

1-5-1- 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 (Mizuta et al., 1983). Elle confère à *Klebsiella pneumoniae* un fort pouvoir invasif en protégeant les bactéries de la phagocytose. C'est une véritable enveloppe de nature polysaccharidique présentant un antigène K (Hennequin et al., 2007). Les antigènes

capsulaires K déterminent 77 sérotypes (Bellifa, 2014). Divers modèles expérimentaux montrent qu'il existe une relation entre la taille de la capsule et l'intensité du pouvoir pathogène et que les types capsulaires K1, K2, K4, et K5 sont les plus pathogènes (Sekhri, 2011).

1-5-2-Le lipopolysaccharide (LPS) :

Le LPS, est formé de plusieurs composés : le lipide A de structure oligosaccharidique, et l'antigène "O". L'antigène "O", composé le plus externe du LPS, est formé d'unités répétées de polymères d'oligosaccharides. Le lipide A correspond à l'endotoxine des bactéries à Gram négatif et participe au pouvoir pathogène. Sa libération massive dans la circulation au cours des bactériémies conduit au choc endotoxinique. Le rôle principal du LPS in vivo est de protéger *K. pneumoniae* du pouvoir bactéricide du sérum (Belbel, 2013)

1-5-3- Les adhésines (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 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 (Bellifa, 2014) :

1-5-3-1-Fimbriae de type 1 : sont essentiels à l'attachement initial stable de plusieurs souches de *K. pneumoniae* sur les surfaces inertes. Chez *K. pneumoniae* ces fimbriae sont également impliqués dans la formation des biofilms (Schembri et al., 2005).

1-5-3-2-Fimbriae de type 3 : impliqués dans l'adhésion de *K. pneumoniae* à différents types cellulaires, par exemple aux épithéliums urinaire et respiratoire. Néanmoins, du fait que ces structures semblent faciliter l'adhésion à des supports inertes et avoir un rôle dans la formation de biofilm, elles pourraient participer à la physiopathologie des infections urinaires sur sonde (Kassis-Chikhani, 2012).

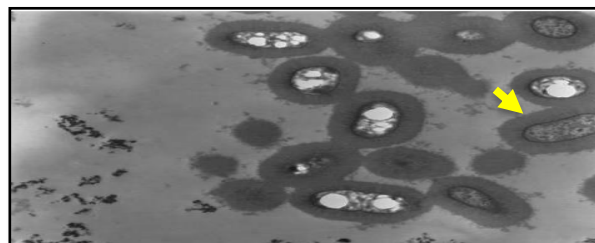


Figure N°18: Structure fibrillaire couvrant la surface bactérienne (Podschun et Ullmann, 1998).

1-6- Pouvoir pathogène de *Klebsiella pneumoniae* :

Klebsiella pneumoniae est un germe opportuniste, responsable d'infections diverses : infections suppuratives, urinaires, respiratoires (**Figure N°19**), biliaires qui peuvent être à l'origine de bactériémie et surtout de septicémie de pronostic sévère, principalement chez les malades immunodéprimés, cancéreux, brûlés, cirrhotiques, diabétiques, chez les vieillards, nourrissons, nouveau-nés et prématurés. Il est responsable de plus de 10% des infections nosocomiales (**Lagha, 2015**).

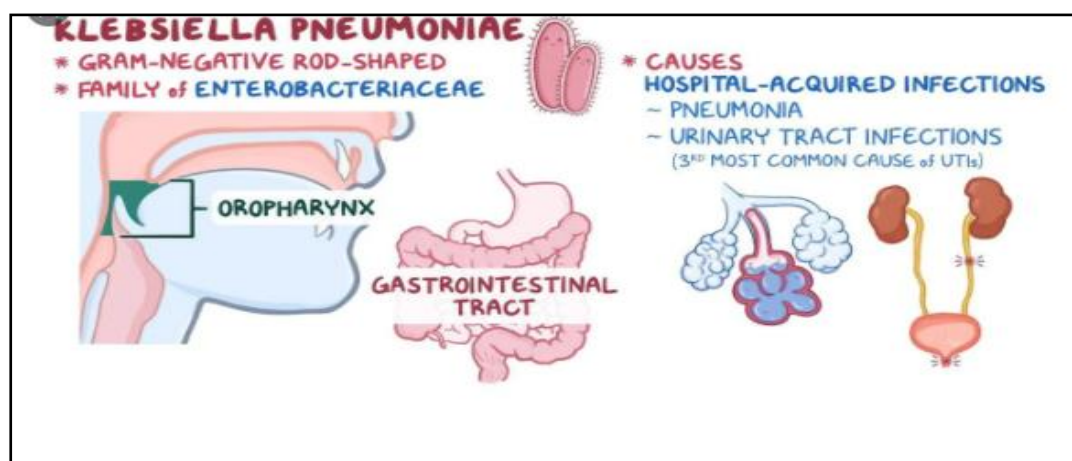


Figure N°19 : Les infections causées par *Klebsiella pneumoniae* (**Google image**).

Tableau N°03 : Pathogénicité de l'espèce (**Arnaud et al., 2018**).

Agent étiologique	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Types d'infection	Infections opportunistes chez les malades hospitalisés (infection broncho-pulmonaires, urinaires, bactériémies, infections méningées post-traumatiques ou post-chirurgicales)
Réservoir	Eau, sol, poussière. Commensale du tube digestif de l'homme et des animaux. Les différents dispositifs médicaux...
Modes de transmission	Manuportée
Population à risque	Patients hospitalisés, chez les malades immunodéprimés, cancéreux,....

Chapitre III : Les antibiotiques

1-Définition :

Les antibiotiques sont des substances antimicrobiennes d'origine biologique, qui agissent à faible concentration sur les microorganismes en bloquant des étapes métaboliques indispensables à leur survie ou à leur croissance. Ce mode d'action ne se traduit pas forcément par la mort de l'agent infectieux, mais la multiplication en est toujours interrompue. Dans ce cas, l'organisme a le temps d'édifier sa réponse et ce sont les mécanismes de défense qui éliminent le germe (**Michel, 1981**).

2-Classification :

La classification des antibiotiques repose sur leur structure chimique et leurs mécanismes d'action, lesquels conditionnent leur spectre d'activité :

*Mode d'action : Les antibiotiques peuvent agir sur : la paroi, la membrane cytoplasmique, la synthèse des acides nucléiques et la synthèse des protéines.

* Spectre d'activité : (spectre étroit ou large).

* Origine : élaboré par un organisme naturel ou produit par synthèse.

* Nature chimique : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle β -lactamase) (**Yala et al., 2001**).

3- Mode d'action :

Les antibiotiques agissent à l'échelon moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie.

Ils agissent par :

- **Toxicité sélective au niveau de la :**

- Synthèse de la paroi bactérienne, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, acides nucléiques

- **Inhibition compétitive** : dans ce cas l'antibiotique est un analogue structural, il interfère avec une fonction essentielle à la bactérie (**Webographie**).

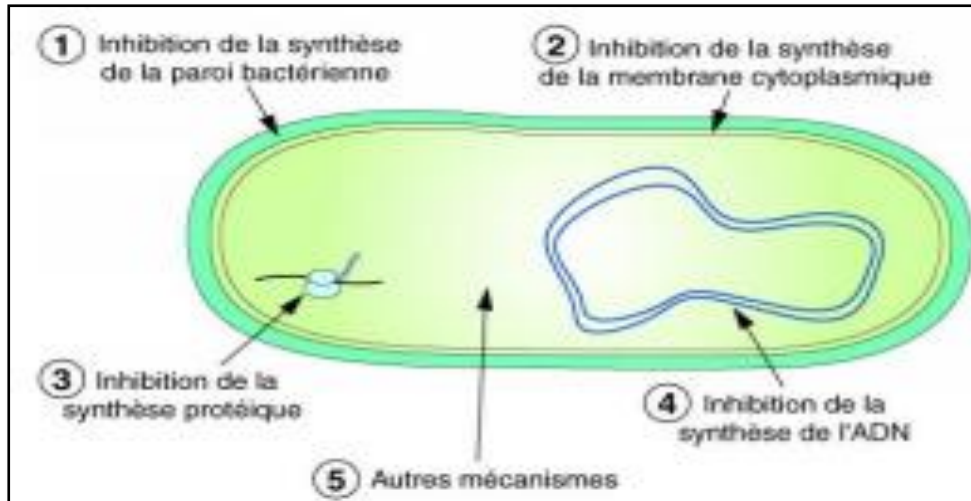


Figure N°20 : Mode d'action des antibiotiques (www.bacteriologie.net).

4-Résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques :

4-1-Résistance naturelle :

K. pneumoniae possède naturellement un gène codant pour une pénicillinase chromosomique qui lui confère une résistance à bas niveau aux pénicillines. Cette pénicillinase est sensible à l'action des inhibiteurs (acide clavulanique, tazobactam). Ainsi, le phénotype sauvage de *K. pneumoniae* est sensible aux associations amoxicilline (ou ticarcilline) + acide clavulanique et piperacilline + tazobactam ainsi qu'à l'ensemble des céphalosporines. Elle est également sensible aux céfamycines, à l'aztréonam et aux carbapénèmes (**Courvalin et al., 2006**). Concernant les autres antibiotiques, *K. pneumoniae* est sensible aux aminosides, aux fluoroquinolones, à la fosfomycine et au cotrimoxazole.

4-2- Résistance acquise :

K. pneumoniae a toujours joué un rôle majeur dans l'apparition et/ou la dissémination des mécanismes de résistance, en particulier vis-à-vis des β -lactamines. Ainsi, dans les années 1970, ces bactéries ont été pionnières pour les résistances aux aminosides (**Christensen et Korner, 1972**). A partir des années 1980, *K. pneumoniae* a largement contribué à la dissémination hospitalière des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) qui leur confèrent une résistance aux céphalosporines de 3ème génération (C3G) (**Paterson et Bonomo, 2005**). Lorsque l'on fait un bilan des nouvelles β -lactamases décrites depuis 1983, *K. pneumoniae* est dans 80% des cas l'hôte chez qui ont été découvertes ces nouvelles enzymes (de type TEM, SHV, CTX-M ou de la classe C) (**Sirota, 1995**).

Chapitre IV : les biofilms et mécanisme d'adhésion sur les cathéters

I-Les biofilm bactérienne :

1-Historique :

C'est au XVIIe siècle qu'Antonie van Leeuwenhoek découvrit les biofilms en observant la présence de micro-organismes (« animalcules ») dans des prélèvements effectués à la surface des dents (**Figure N°21**). En 1933, lors d'études de la croissance des algues, Henrici observa des communautés microbiennes fixées sur des lames en verre. Il émit alors l'hypothèse que la plupart des bactéries étaient capables de s'organiser sous forme de communautés sessiles fixées à une surface. En 1970, l'étude des biofilms connut un véritable essor grâce aux techniques de microscopie électronique à transmission et à balayage et l'utilisation de colorants des polysaccharides (rouge de ruthénium) (**Figure N°22**). En 1973, Characklis démontra que ces matrices d'exopolymères conféraient aux biofilms une certaine ténacité et résistance vis-à-vis des désinfectants. Enfin c'est en 1978 que fut menée la première étude des communautés microbiennes des cours d'eau ; Costerton et son équipe proposèrent pour la première fois le terme de « biofilm ». Considéré comme un mode de vie naturel utilisé par une grande majorité de micro-organismes (**Rosyne, 2016**).



Figure N°21 : Biofilms de la plaque dentaire (**Rosyne, 2016**).

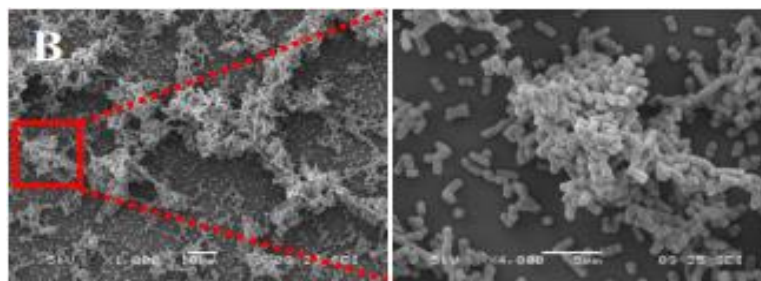


Figure 22 : Observation de biofilm mono-espèce en microscopie électronique à balayage.

Biofilms de 4h à *klebsiella pneumoniae* (souche clinique) (b) formés sur lamelle de Thermanox, en conditions statiques (**Rosyne, 2016**).

2- Définition :

Les biofilms bactériens sont généralement définis comme des agrégats de cellules bactériennes attachés à une surface et enrobés d'une matrice polymérique (**Figure N°23**). Les bactéries peuvent tout aussi bien adhérer à une surface biotique (ex : cellules de la muqueuse) qu'à une surface abiotique (ex : plancher ou équipement à la ferme, à l'abattoir ou à l'usine de transformation) (**Yannick et al., 2014**).

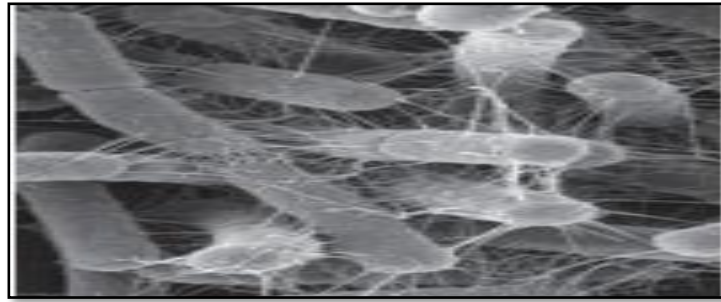


Figure N° 23 : Observation microscopique d'un biofilm bactérien (**David et Jean, 2012**).

3-Morphologie et composition des biofilms :

L'utilisation de la microscopie optique, puis confocale, a permis de montrer que le biofilm est composé d'agrégats de microorganismes, séparés par des espaces libres, dépourvus de bactéries et parcourus par des courants aqueux ; véritables « canaux », ceux-ci y assurent la circulation de fluides et permettent à la fois l'apport de nutriments aux bactéries et l'élimination de leurs produits de dégradation. Ainsi, le biofilm n'est-il pas un milieu homogène, mais un environnement structuré qui présente souvent une architecture complexe, très variable d'un biofilm à l'autre selon les microorganismes qui le composent et les conditions environnementales (**Roux et Ghigo, 2006**).

L'étude par CSLM de biofilms très variés, des biofilms monospécifique de laboratoire aux biofilms des écosystèmes naturels, révèle une organisation plus ou moins universelle. Un biofilm peut être subdivisé en deux composantes, la partie proprement microbienne, représentant ordinairement au plus 10-15% de la masse, et la partie appelée matrice, ou EPS (Extracellular Polymeric Substance), représentant au moins 85-90% de la masse totale. La structure d'un biofilm peut-être extrêmement variable en fonction de la concentration et de la nature de ses composants. La matrice peut former des structures diverses, les plus fréquentes étant de type tours ou champignons (**Figure N°24**), avec des canaux permettant la circulation de l'eau (**Paolozzi et Liebart, 2015**).

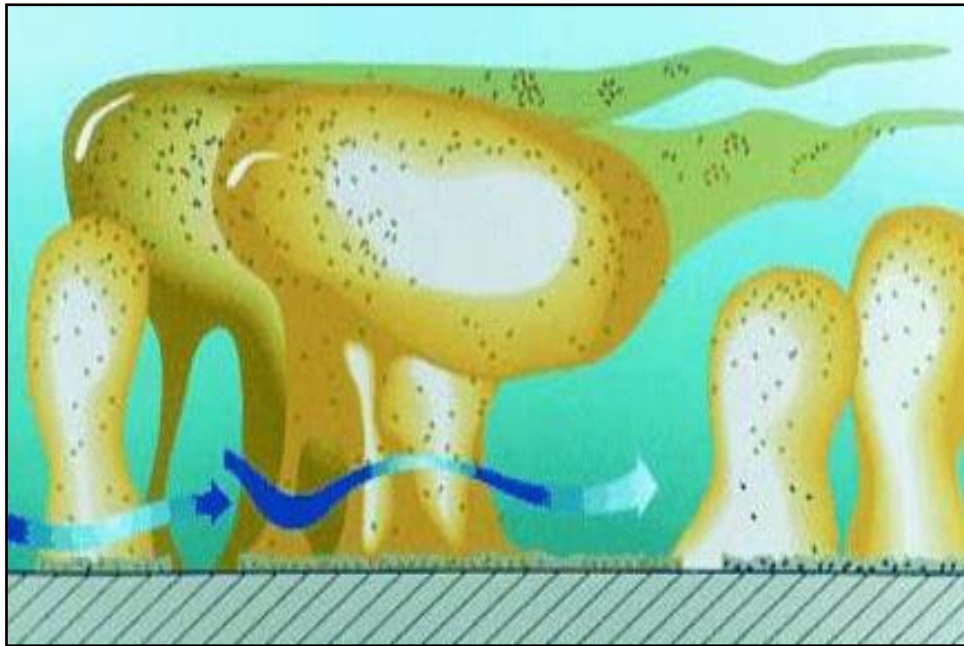


Figure N°24 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle d'un biofilm bactérien. Les flèches indiquent la circulation du fluide à l'intérieur des canaux aqueux.

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

4-Étapes de la formation d'un biofilm :

Tel que mentionné précédemment, la formation d'un biofilm est constituée de plusieurs étapes (**Figure N°25**). Le biofilm peut se former très rapidement, en quelques heures; un bon exemple étant la plaque dentaire. Les bactéries doivent, dans un premier temps, adhérer à une surface biotique ou abiotique (**Yannick et al., 2014**).

4-1-Adhésion réversible :

En milieu liquide ou exposé à l'humidité, les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide par sédimentation ou par mobilité active. Elles s'y attachent de manière réversible par des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques. Cette étape est influencée par des conditions environnementales impliquant le pH, la température, la concentration en oxygène et en nutriments. Les bactéries adhèrent plus facilement sur une surface rugueuse, hydrophobe et non polaire (**Beloin et al., 2008**).

4-2- Adhésion irréversible :

Cette phase est caractérisée par la production d'une matrice d'exopolysaccharides, la prolifération et l'accumulation des cellules en groupes multicouches. La matrice extracellulaire est considérée comme étant essentielle dans la consolidation des cellules au sein du biofilm. Elle permet de piéger et de retenir des nutriments et de protéger ainsi les cellules contre la déshydratation et l'effet des agents antimicrobiens (Seghir, 2015).

4-3- Formation de microcolonie :

La troisième étape est caractérisée par la formation de microcolonies composées à la fois des bactéries initiales qui se divisent et de bactéries qui s'attachent sur le biofilm en formation (Roux et Ghigo, 2006).

4-4-Maturation de biofilm :

Lors de l'étape de maturation du biofilm, les bactéries synthétisent un exopolysaccharide et d'autres constituants de la matrice polymérique. Le biofilm mature représente une structure complexe et les bactéries de diverses régions du biofilm pourront exprimer des gènes différents (Yannick et al., 2014).

4-5- Dispersion de biofilm :

Certaines bactéries peuvent se détacher du biofilm mature et rentrer dans la phase de dissémination. Cette dernière étape permet la colonisation de nouvelles surfaces (Agnès et Jean-Marc, 2006). Le détachement des bactéries ou, plus généralement, d'un fragment de biofilm étant induit par une carence nutritionnelle, il a été avancé qu'il devait permettre aux bactéries de retrouver un environnement plus favorable. Il a été montré que ce détachement bactérien était précédé d'une nouvelle synthèse de flagelles chez les bactéries et d'une réduction du nombre de pili. Les forces de cisaillement, la multiplication cellulaire et une dégradation enzymatique semblent contribuer favorablement à la dispersion des micro-organismes. C'est cette capacité des bactéries adhérentes à quitter le biofilm et à aller contaminer un autre site qui fait des biofilms de véritables réservoirs de pathogènes (Thierry, 2008).

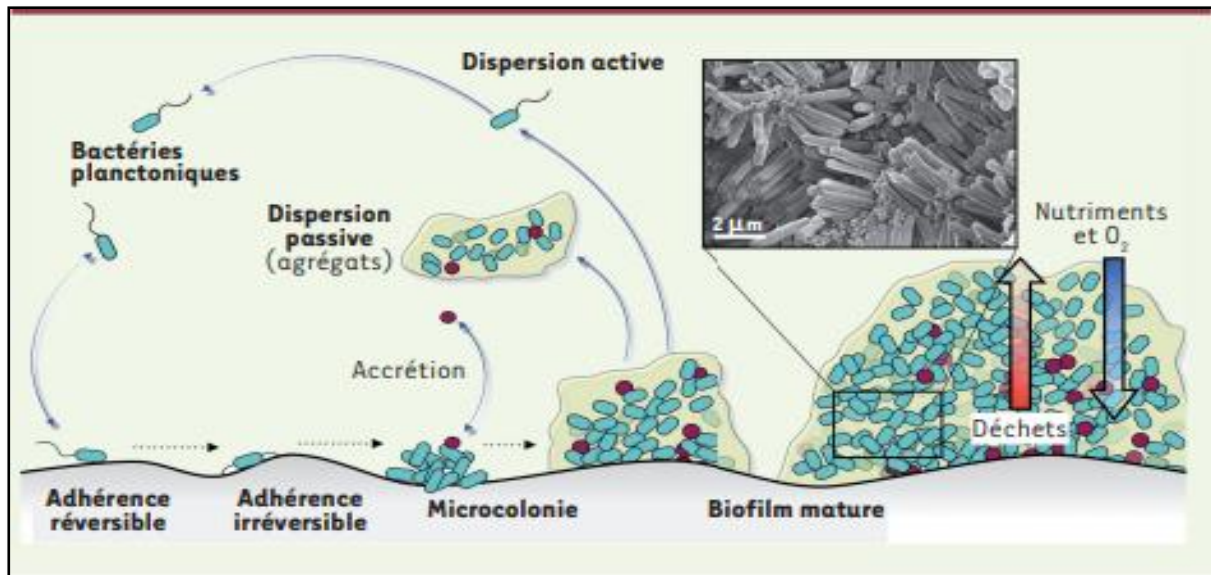


Figure 25 : Développement et structure d'un biofilm bactérien (David et Jean-Marc, 2012).

5-Facteurs favorisant la formation d'un biofilm :

5-1-Caractéristiques de la surface :

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des microcolonies est importante. Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée. Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur : d'une part l'hydrophobicité, les microorganismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux et, d'autre part la présence d'un film protéique. 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. Alors ce film organique masque en partie ou totalement les propriétés initiales de la surface et augmente l'adhésion ou au contraire la diminue (Bezoui, 1991).

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. On peut citer les facteurs suivants: température, pH (conditions optimales de formation de biofilms en situation de neutralité), concentration en oxygène, concentration en fer, osmolarité, présence d'ions spécifiques, sources de carbone disponibles, 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).

5-3- Propriétés des cellules :

Hydrophobicité de la surface des cellules, présence de fimbriae, de flagelles et rôles des exopolysaccharides. De manière générale, l'attachement a lieu préférentiellement sur des surfaces rugueuses (présence d'aspérités), hydrophobes et préalablement recouvertes d'un film protéique. Une augmentation de la vitesse du flux, de la température du liquide ou de la concentration en nutriments peut aussi entraîner une augmentation de la fixation des bactéries à une surface, à condition que ces facteurs n'excèdent pas une valeur critique. De bonnes conditions nutritives sont nécessaires aux étapes de formation du biofilm, alors que les phases de développement tardif sont possibles dans des conditions nutritives moins bonnes. Ainsi, le type de biofilm dépend des conditions nutritives, ce qui suggère une facilité de remodelage des biofilms (Alexandra, 2011).

6-Biofilms et implants médicaux :

6-1-Biofilms associés aux cathéters vasculaires :

Disposer d'un abord vasculaire est essentiel pour la prise en charge des patients relevant de la réanimation, la cancérologie, ou de l'hémodialyse...L'implantation d'un cathéter vasculaire permet la réalisation rapide d'une expansion volumique, l'administration de médicaments, de nutrition parentérale ou de produits sanguins, ainsi que la surveillance cardio-vasculaire et le maintien d'une voie d'accès veineux en situation d'urgence. Les cathéters vasculaires sont, à égalité avec le site urinaire, les premières causes des bactériémies nosocomiales. Ils sont à l'origine d'1 bactériémie sur 5, dont la moitié liée aux cathéters veineux centraux. Les microorganismes en cause proviennent de la flore cutanée du patient, de la microflore exogène du personnel hospitalier, ou encore d'environnements contaminés. Les microorganismes les plus fréquemment isolés sont (**Tableau 4**): *staphylocoques* à coagulase négative (38 %) puis les *Staphylococcus aureus* (27 %), *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, et les *enterobactérie*. En réanimation, après les Cocci à Gram positif (49 %), *entérobactéries* (28 %) et *Pseudomonas aeruginosa* (13 %) occupent une place non négligeable parmi les microorganismes responsables des colonisations des CVC (Central venous catheter) (Bezoui, 1991).

Tableau 4 : Liste de micro-organismes isolés à partir de biofilms formés sur des cathéters veineux centraux (Donlan, 2008)

Bactéries Gram- positives	Bactéries Gram- négatives	Autres micro-organismes
<i>Corynebacterium Spp</i>	<i>Acinetobacter spp</i>	<i>Candida spp</i>
<i>Enterococcus Spp</i>	<i>Acinetobacter calcoaticus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Acinetobacter anitratus</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Mycobacterium chelonai</i>
<i>Staphylococcus spp</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Eschrichia coli</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Staphylocoques</i> coagulase négatifs	<i>Klebseilla oxytoca</i>	
<i>Streptococcus spp</i> a-hémolytiques	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Streptococcus spp</i> (viridans streptococci)	<i>Proteus spp</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Providencia spp</i>	

7-Le biofilm face aux antibiotiques :

Les bactéries vivant au sein du biofilm sont moins sensibles aux antibiotiques et désinfectants que leurs homologues planctoniques. Les concentrations d'antibiotiques nécessaires pour inhiber les bactéries au sein d'un biofilm peuvent être 10 à 1000 fois plus élevées que celles utilisées pour inhiber les mêmes bactéries à l'état planctonique. Ainsi, le traitement antibiotique est généralement efficace contre les bactéries planctoniques libérées du biofilm mais ne permet pas l'élimination complète du biofilm. Ce phénomène est un élément clé de la persistance des infections chroniques liées aux biofilms, créant un sérieux problème de santé publique. Cette persistance peut être due à l'émergence de phénomènes de résistance bactérienne (Bridier et al., 2011).

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, 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. La résistance élevée des biofilms aux agents antibactériens pourrait également reposer sur la présence d'une sub-population de bactéries résistantes, capables de résister à de fortes concentrations d'antibiotiques. Ainsi, 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 une fois le traitement fini (**Agnès et Jean-Marc, 2006**).

8- Régulation de la formation des biofilms :

Au sein d'un biofilm, les micro-organismes communiquent entre eux par des signaux de cellules à cellules. Ces derniers, appelés « quorum sensing », jouent un rôle important dans le développement et la régulation de la formation des biofilms.

8-1-Le quorum sensing :

8-1-1-Definition :

La formation d'un biofilm est contrôlée par des mécanismes de quorum sensing, Les auto-inducteurs sont produits en phase de croissance bactérienne. Lorsqu'un seuil de concentration est atteint, ces auto-inducteurs interagissent avec un régulateur transcriptionnel, permettant l'expression spécifique, en réponse à une forte concentration de cet auto-inducteur, d'un groupe de gènes. Les déterminants génétiques du QS sont organisés en un réseau de régulation complexe incluant un spectre de régulateurs transcriptionnels et post-transcriptionnels qui affectent la synthèse de l'autoinducteur AHL. Des facteurs autres que la densité bactérienne, affectent la production et l'accumulation d'AHL (**Gozoua, 2019**).

8-1-2-Les molécules du quorum sensing :

Les molécules du quorum sensing sont différentes selon les types de bactéries. 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 AHLacylases. On obtient par conséquent une ségrégation spatiale des molécules du quorum sensing au sein d'un biofilm (**Bellifa, 2014**).



Deuxième partie

Matériel et méthodes



1-Prélèvements :

Les prélèvements dans les 4 études : **Bellifa, 2014 ; Doudah, 2016 ; Boukha-Hassane, 2014; Chaouche et al., 2018**, ont été collectés au niveau de différents services du CHU: service de réanimation, d'urologie, de médecine interne et de chirurgie. Et les prélèvements ont été soigneusement prélevés dans des conditions d'asepsie à partir des différents dispositifs médicaux : cathéters ; sonde urinaire ; sondes d'intubation, placées individuellement dans des tubes en verre stériles puis transportés immédiatement au laboratoire pour être analysés.

2-Ensemencement:

L'extrémité distale de chaque cathéter a été coupée, placée dans 1 ml d'eau physiologique stérile puis agité au vortex durant 1 minute (technique de **Brun Buisson, 1987**). Un volume de 20 µL a été ensemencé simultanément sur gélose nutritive pour dénombrement et confirmation de l'infection sur cathéters 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 boîtes ensemencées sont incubées à 37°C pendant 18-24 heures.

➤ **Gélose de Mac-Conkey :**

C'est un milieu de culture utilisé en bactériologie médicale pour la sélection des bactéries à Gram négatives, les entérobactéries ainsi que les bactéries non fermentaires « *Pseudomonas, Acénitobacter* ». Grâce à l'action de deux inhibiteurs, cristal violet et les sels biliaires pour l'inhibition de la flore à Gram positives.



Figure N°26 : Colonies des *Klebsiella pneumoniae* ensemencées sur gélose Mac Conkey (microbiologie clinique.com).

3- Isolement et purification :

Isolement et la purification se fait par un repiquage successif des souches bactériennes sur le même type des milieux sélectifs jusqu'à l'obtention d'un isolat pure.

4-Identification :

L'identification des souches est réalisée par une identification préliminaire « Galerie Classique» et par Galerie Api 20 E.

4-1- Tests préliminaires :

4-1-1- Examen macroscopique :

À l'œil nu, on peut distinguer les caractéristiques d'une colonie : la forme, la taille, l'élévation, l'odeur dégagé, l'opacité etc.

4-1-2- Examen microscopique (Coloration de Gram) :

4-1-2-1- Principe :

La coloration de Gram (mise au point par Christian Gram) est une coloration de base en bactériologie. Elle aussi appelle coloration **V.L.A. F** (Violet. Lugol. Alcool. Fischine). C'est une "**coloration double**", qui permet de différencier les bactéries:

- D'après leur forme.
- D'après leur affinité des parois pour les colorants.

Cette coloration aide à déterminer deux grands groupes appelés Gram positif et Gram négatif, et de donner une information rapide et médicalement importante (**Degrement, 2005**).

4-1-2-2- Technique :

La coloration de Gram ou coloration différentielle s'effectue de la manière suivante :

- Préparation d'un frottis bactérien, on prélève la colonie bactérienne à identifier, et on l'étale sur une goutte d'eau physiologique déposée sur une lame propre puis on la fixe par simple passage sur la flamme du bec Bunsen.
- Verser le Violet de Gentiane sur la lame, laissée en contact 1 minute, ensuite laver rapidement par l'eau courante.

- traité durant une minute par la solution de Lugol et laver à l'eau.
- Décoloration, en traitant avec l'alcool, on fait couler de l'alcool sur le frottis, rincer immédiatement à l'eau. A ce stade, les cellules à Gram négatives seront incolores, les cellules à Gram positives restent violettes.
- En suite recouvrir le frottis par la fuchsine, laisser agir environ 1 min. pour recolorer les cellules Gram négatives présentes puis laver et sécher avec un papier buvard propre
- Examiner le frottis, L'observation se fait à l'objectif x10, x40 et x100 sous immersion.

4-1-2-3- Lecture :

- Bactéries colorées en violet foncé sont des « Gram positives » *Staphylocoques*, *streptocoques*, *entérocoques*.
- Bactéries colorées en rose sont des « Gram négatives » *Entérobactéries*, *Pseudomonas*, *Acénitobacter*.

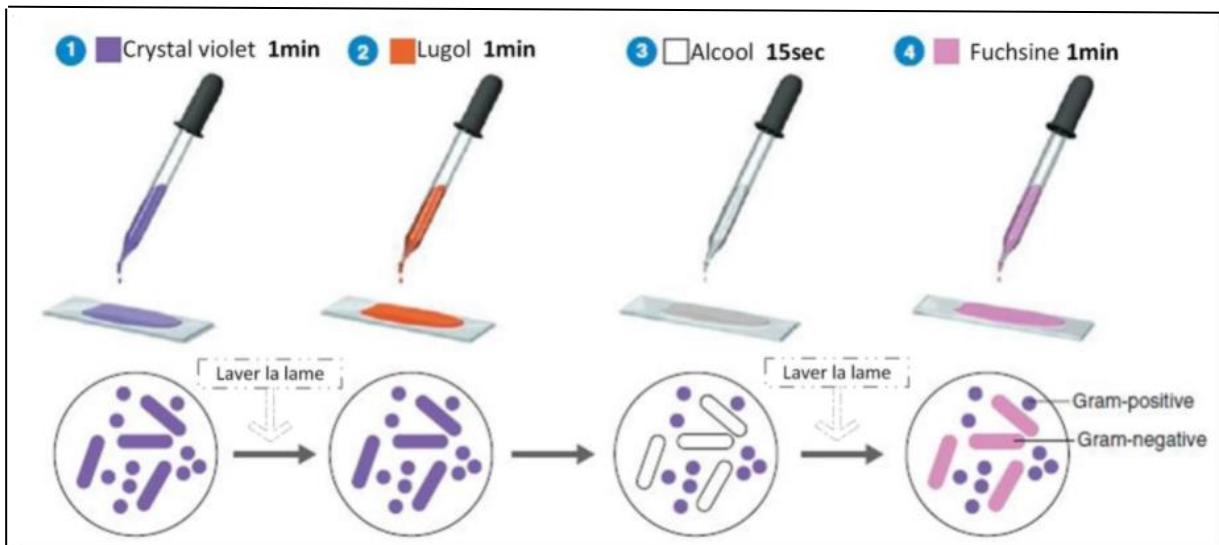


Figure N°27 : Technique de coloration de Gram (microbiologie-clinique.com).

4-2-Identification par la Galerie Api 20E:

4-2-1- Principe :

Le système API est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries. Lorsqu'une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différentes alvéoles qui composent 20 tests

biochimiques différents. La micro-galerie (contenant de substrats déshydratés), les métabolites produits durant la période d'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs.

Elle permet l'identification d'une centaine de bacilles à Gram négatif dont les Entérobactéries.

La galerie API20E permet d'effectuer les tests suivant :

- ✓ ONPG ;
- ✓ ADH;
- ✓ LDC ;
- ✓ ODC ;
- ✓ Citrate de Simmons (CIT) ;
- ✓ Production d'hydrogène sulfuré par réduction de thiosulfate (H₂S) ;
- ✓ Synthèse d'une uréase (URE) ;
- ✓ Recherche d'un tryptophane désaminase (TDA) ;
- ✓ Recherche du pouvoir indologène (IND) ;
- ✓ Production d'acétoïne(VP) ;
- ✓ Synthèse d'une gélatinase(GEL) ;
- ✓ Recherche d'acidification de neuf glucides : Glucose (GLU), Mannitol (MAN), Inositol (INO) Sorbitol(SOR), Rhamnose(RHA), Sorbitol(SOL), Saccharose(SAC), Méllibiose(MEL) Amygdaline(AMY), Et Arabinose(ARA)
- ✓ La galerie permet également la recherche de la nitrate réductase qui se fait dans le micro tube « Glu » (**Boumelit et Chenatlia, 2014**).

4-2-2-Mode opératoire :

➤ Préparation de suspension :

Préparer un inoculum bactérien en ensemencant 5 ml d'eau physiologique à partir d'une colonie de la souche à tester isolée sur milieu non sélectif, puis ajuster la densité par spectrophotomètre afin d'obtenir une culture bactérienne de 0,08 à 0,1 à une longueur d'onde de 625 nm équivalent à 0,5 Mc Ferland. Ceci correspond à une suspension bactérienne de 10⁸ UFC/ml;

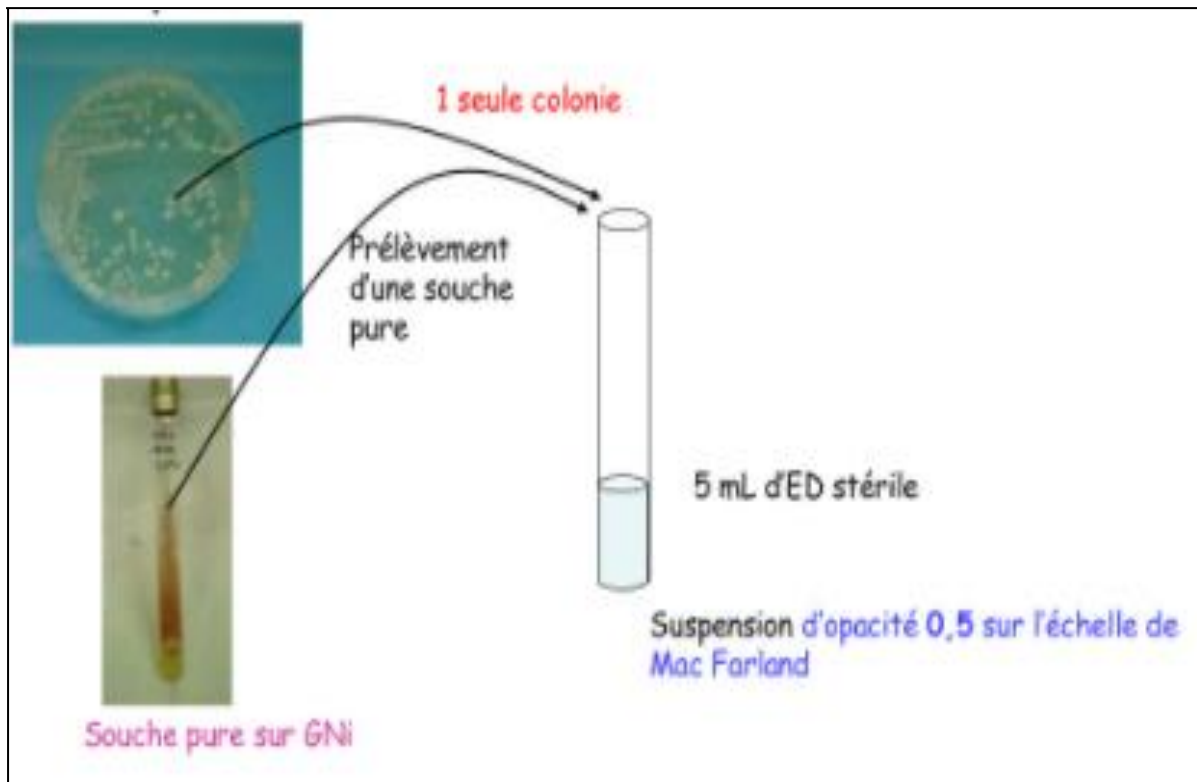


Figure N°28 : Préparation de l'inoculum (Abdessemed, 2015).

➤ **Inoculation de la galerie :**

Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant) :

- ✓ Pour les tests CIT, VP et GEL, remplir tube et cupule,
- ✓ Pour les autres tests, remplir uniquement les tubes.
- ✓ Pour les tests : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- ✓ Refermer la boîte et incuber à 36°C ± 2°C pendant 18-24 heures (**Boumelit et Chenatlia, 2014**).

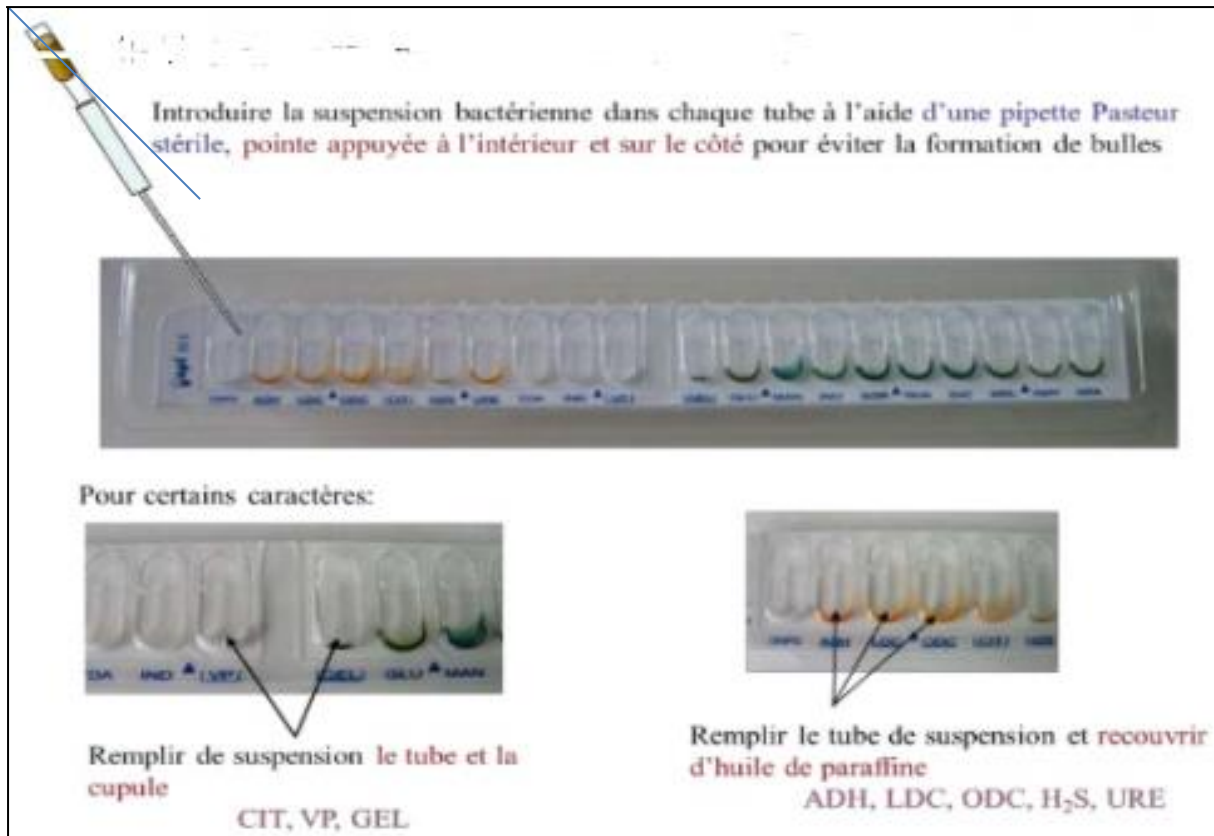


Figure N°29 : Technique d'ensemencement de la galerie Api 20 E (Abdessemed, 2015).

4-2-3- Lecture de la galerie Api 20 E :

La lecture de ces réactions (positives ou négatives) se fait en fonction des variations des couleurs :

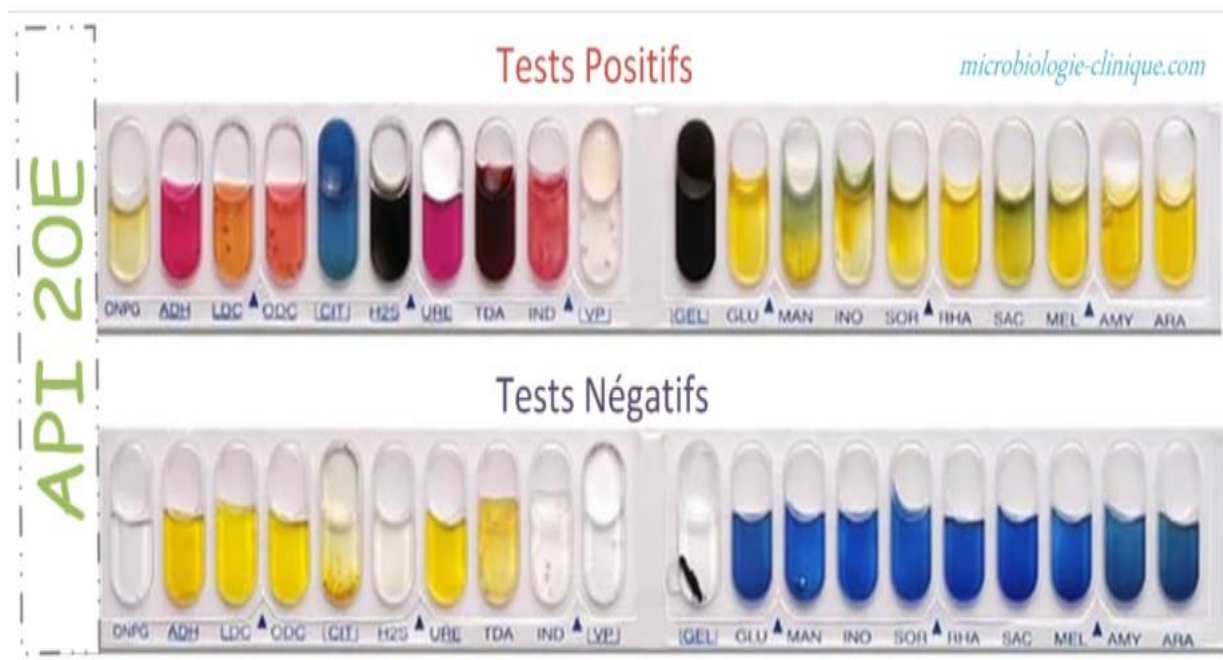


Figure N°30: Lecture de la galerie API 20E (microbiologie-clinique.com).

4-2-4- Identification de la souche :

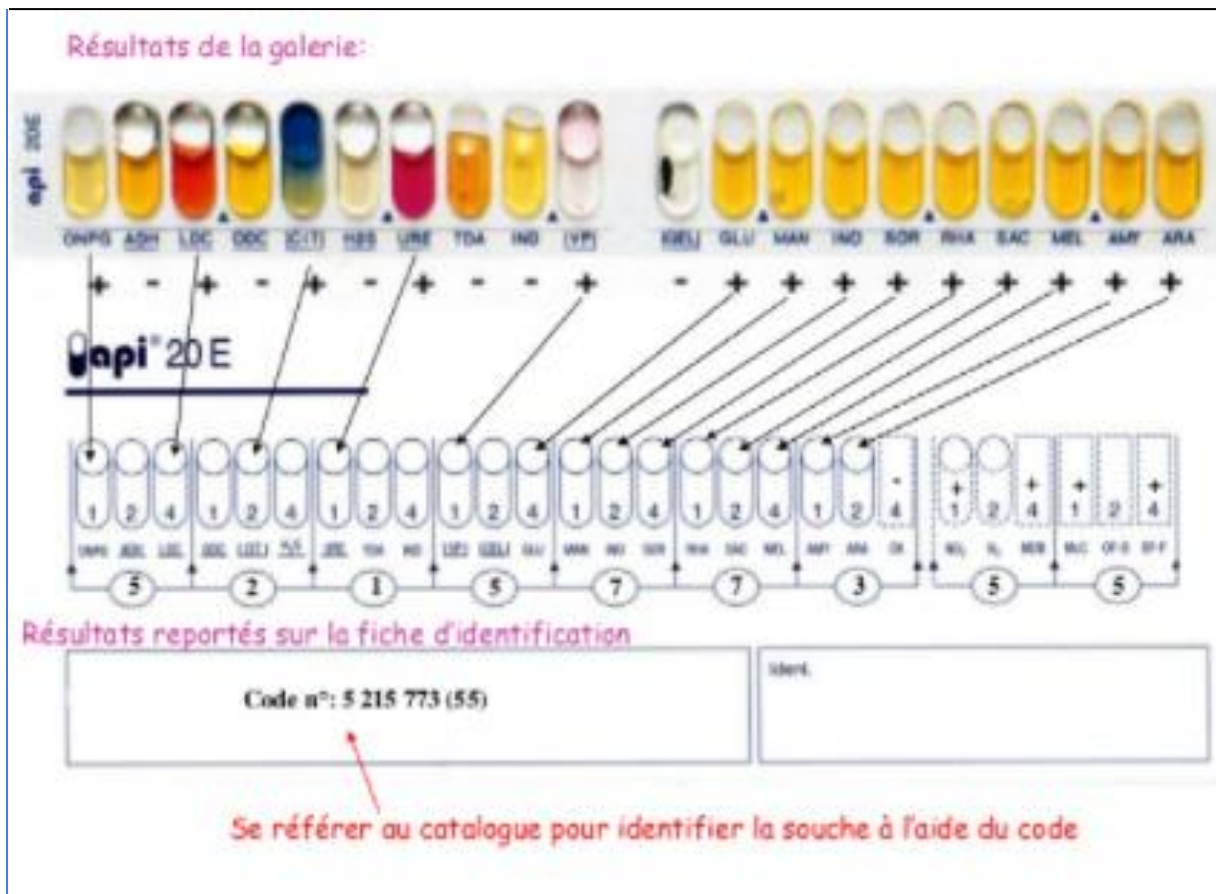


Figure N°31 : Identification de la souche (Abdessemed, 2015).

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-Antibiogramme :

6-1- Principe :

La technique consiste à utiliser des disques d'antibiotiques déposés à la surface d'une gélose ensemencée avec la bactérie à étudier. Chaque antibiotique diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose, sauf là où elles rencontrent une concentration d'antibiotique suffisante qui inhibe leur croissance (Ca-sfm, 2010).

6-2- Technique :

Pour la préparation de suspension voir la page 29 (la galerie Api 20 E) ;

- A partir de cette culture, réaliser une dilution au 1/100 dans l'eau physiologique;
- A l'aide d'un écouvillon stérile, introduit dans la suspension bactérienne et essoré contre la paroi interne du tube, réaliser des stries serrées à la surface d'une boîte de Pétri préalablement coulée avec 20 ml de gélose Mueller-Hinton. Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte 60° et tournant l'écouvillon sur lui-même;
- Déposer les disques d'antibiotiques à tester à l'aide d'un distributeur ou d'une pince stérile.
- Incuber pendant 18 à 24h à 37°C;
- Après 24 heures d'incubation à 37°C, on mesure les diamètres des zones d'inhibition et on détermine le caractère Sensible, Résistante ou Intermédiaire de la souche à étudier en se référant aux valeurs critiques publiées par le **(Ca-sfm, 2013)**.

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).



Figure N°32 : Antibiogramme (Doudah, 2016).

6-3- Lecture :

Tableau N°05 : Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative (Ca-sfm, 2013).

Antibiotiques	Charge du disque	Concentration critique (mg/L)		Diamètres critiques (mm)		Remarques
		S	R	S	R	
Ampicilline	10 µg	≤ 4	> 8	≥ 19	< 16	Interprétation valable pour bacampicilline, pivampicilline. Cf. règle (1)
Amoxicilline	25 µg	≤ 4	> 8	≥ 21	< 16	Cf. règle (1)
Ampicilline/sulbactam	10/10µg	≤ 4/8	> 8/8	≥ 19	< 16	Cf. règle (3)
Amoxicilline/ac. Clavulanique	20/10µg	≤ 4/2	> 8/2	≥ 21	< 16	
Ticarcilline	75 µg	≤ 8	16	≥ 24	< 22	
Ticarcilline/ac. Clavulanique	75/10µg	≤ 8/2	> 16/2	≥ 24	< 22	Interprétation valable pour un traitement intraveineux. Cf. règles (1) et (2).
Pipéracilline	75 µg	≤ 8	> 16	≥ 20	< 16	
Pipéracilline/tazobactam	75/10µg	≤ 8/4	> 16/4	≥ 21	< 17	Interprétation valable uniquement pour les souches isolées des urines. Voir note en annexe 1 : lettre d'information (p.56)
Mécillinam	10 µg	≤ 8	> 8	≥ 18	< 18	
Imipénème	10 µg	≤ 2	> 8	≥ 24	< 17	Déterminer la CMI en cas de résistance par diffusion à l'ertapénème avec sensibilité à l'imipénème.
Méropénème	10 µg	≤ 2	> 8	≥ 22	< 15	
Ertapénème	10 µg	≤ 0,5	> 1	≥ 28	< 26	
Doripénème	10 µg	≤ 1	> 4	≥ 24	< 19	Cf. règle (3).
Aztréonam	30 µg	≤ 1	> 8	≥ 27	< 21	

7-Evaluation de la formation de biofilm in vitro :

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

7-1 Méthode de plaque de culture de tissus (TCP) :

7-1-1 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 μ L des bactéries diluées au 1/10. Chaque puits contient 150 μ 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 (Bellifa, 2014).

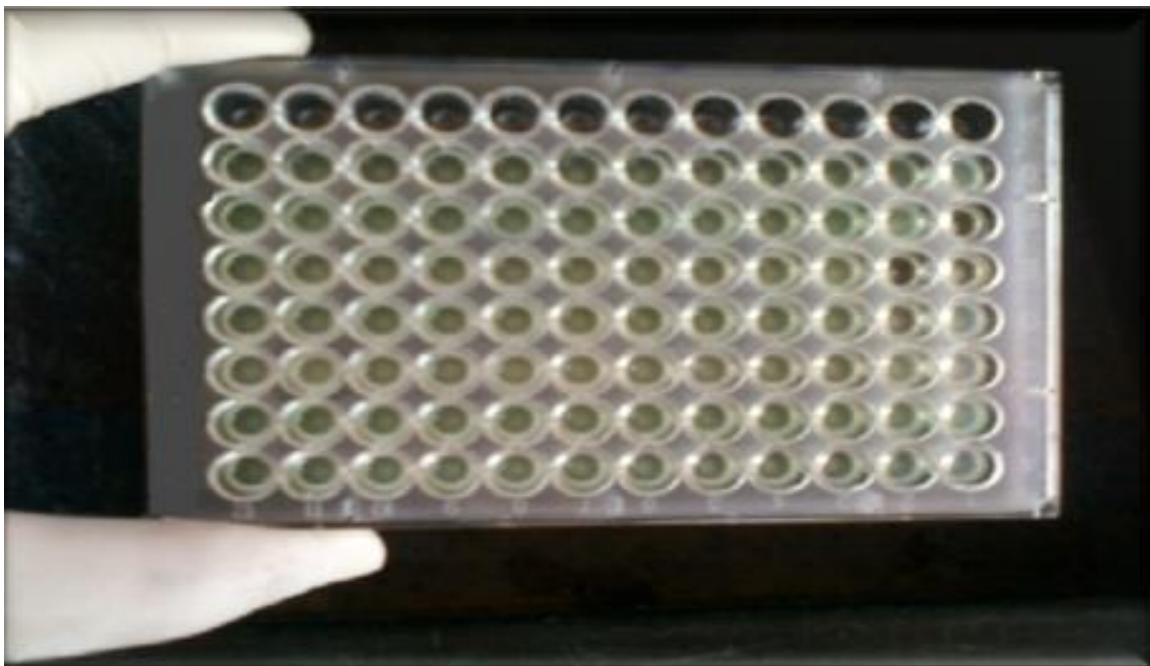


Figure N°33: Technique de formation de biofilm sur microplaque (Bouklia-hassane, 2014).

7-1-2 Lecture :

Les puits sont remplis d'éthanol et le passage par le lecteur ELISA est nécessaire pour donner directement la DO de chaque puits par rapport au témoin **Figure N°34 (Bouklia-hassane, 2014)**.



Figure N°34 : Remplissage des puits par l'éthanol (Bouklia-hassane, 2014).

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

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

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

$DO_t \times 2 \leq DO_i \leq DO_t \times 4$: Modérée

$DO_t \times 4 \leq DO_i$: Fortement formatrice du biofilm (**Christensen et al., 1985**).

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

7-2- La méthode tube (TM) :

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

7-2-1- 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**).

7-2-2- 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**).

7-3 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**).

7-3-1- 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 est ensemencé avec une anse d'une suspension de notre souche. La lecture a été faite après 24 heures à 37°C et (**Jain et Agarwal, 2009**).

7-3-2- 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**).

Nous vous prions de nous excuser de ne pas faire les travaux pratiques liés à notre sujet « Evaluation de la formation de biofilm de *Klebsiella pneumoniae* isolée des différents cathéters au niveau de l'hôpital » en raison de la propagation de virus corona et de l'émersion du nouveau clone, ainsi que l'accès interdit à l'hôpital. Pour ces raisons nous avons fait une comparaison du résultat des quatre études suivantes :

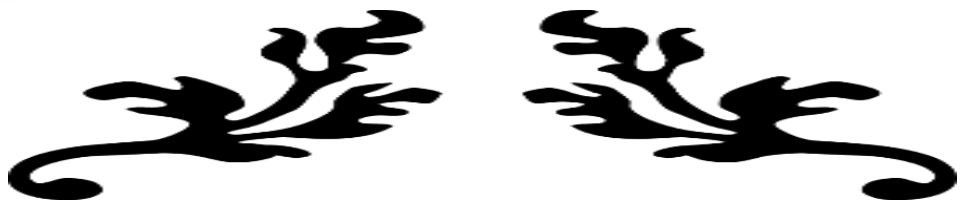
- **Bellifa S, 2014** « Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen », Tlemcen.
- **Doudah H, 2016** « L'effet des extraits de *Lavandula officinalis* sur l'inhibition de la formation de biofilms formés par *Klebsiella pneumoniae* isolée des infections urinaires », Boumerdes.
- **Chaouche A et al., 2018** « Inhibition du biofilm formé par *Klebsiella pneumoniae* responsable d'infection urinaire par l'huile essentielle et les polyphénols de *Lavandula officinalis* », Boumerdes.
- **Bouklia-Hassane O, 2014** « Evaluation de la formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae* isolée de sondes urinaires. CHU de Tlemcen », Tlemcen.



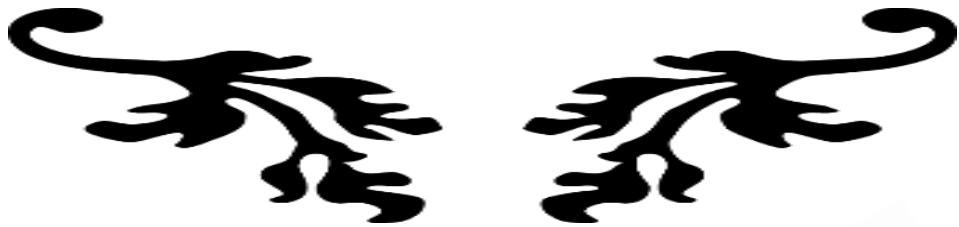
Troisième partie

Résultats et Discussion





Résultats



1-Prélèvements :

Selon l'étude réalisée par **Bellifa, 2014** ; 300 prélèvements ont été analysés entre Mai 2010 et Mai 2012, 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 N°6).

Tableau N°06: caractéristiques et pathologies rencontrées chez les différents patients (Bellifa, 2014).

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

Par contre l'étude réalisée par **Doudah, 2016** montré que les bactéries ont été prélevées chez les patients atteints d'infections urinaires hospitalisés au niveau des urgences à l'hôpital de Thénia, sur une période allant du 15/03/2016 au 30/04/2016, Les six souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées durant cette étude ont été testées pour leurs capacités à former des biofilms par la méthode tube (TM).

Ainsi qu'étude réalisée par **Chaouche et al., 2018** qui ont isolé des bactéries de *Klebsiella pneumoniae* de patients atteints d'infections urinaires, hospitalisées à l'hôpital de Thénia dans

la Wilaya de Boumerdes. Dans la période du 15 février 2016 au 10 Mars 2016, six souches bactériennes de *Klebsiella pneumoniae* ont été isolées, identifiées par des galeries biochimiques.

D'autre étude faite par **Bouklia-Hassane, 2014** a démontré que 32 sondes urinaires ont été prélevées chez 32 patients hospitalisés plus de 48 h au service de réanimation du CHU de Tlemcen. Un total de 8 souches de *Klebsiella pneumoniae*, ont été collectés par isolement sur milieu Mac Conkey.

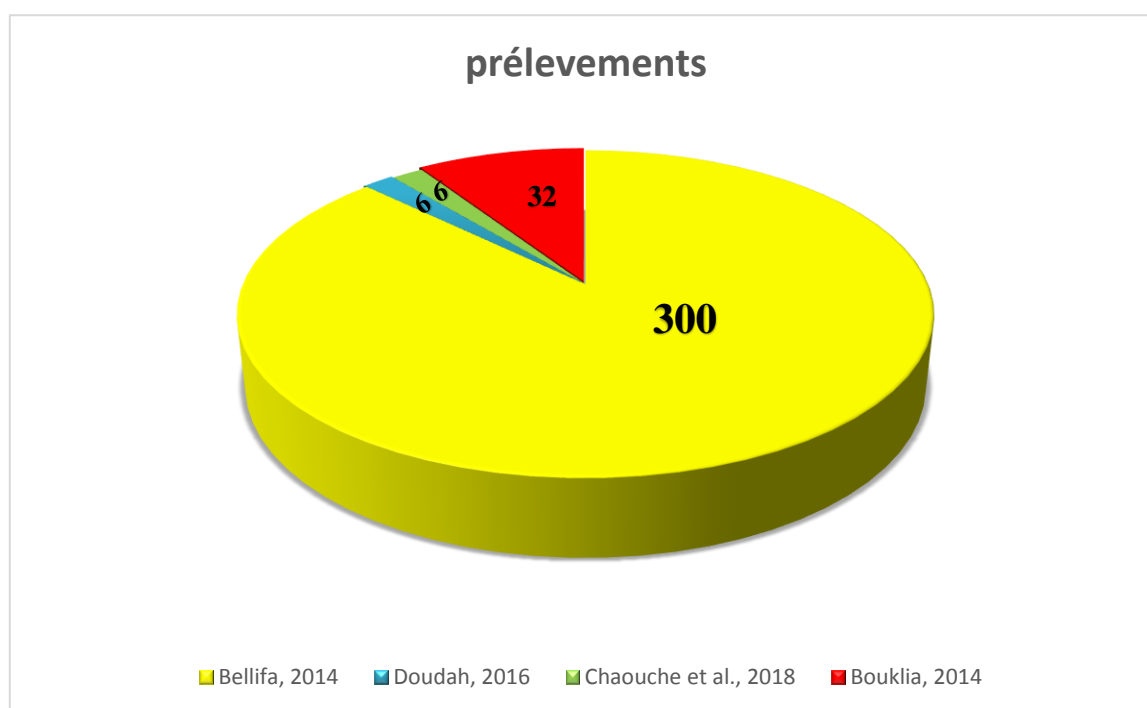


Figure N°35 : Comparaison des prélèvements du 4 études Bellifa, 2014 ; Doudah, 2016 ; Chaouche et al., 2018 ; Bouklia, 2014

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.

Les observations des travaux de : **Bellifa, 2014 ; Doudah, 2016 ; Chaouche et al., 2018 ; Bouklia-Hassane, 2014** montrent que :

2-1-Aspect macroscopique :

Après 18-24 heures à 37°C, elle forme des colonies arrondies, muqueuses, généralement bombées et brillantes sur gélose Mac Conkey (**Figure N°36**).



Figure N°36 : Observation macroscopique de *K. pneumoniae* sur le milieu Mac Conkey (**Bellifa, 2014**).

2-2- Aspect microscopique :

Toutes les souches isolées sont des bacilles à Gram négatif (**Figure N°37 et N°38**), toujours immobile, donnant un aspect muqueux, assez typique.

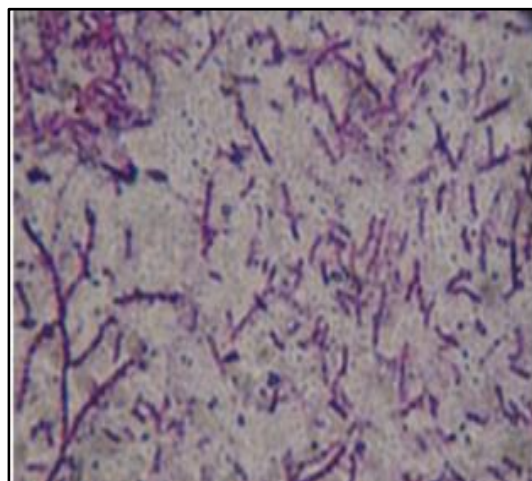


Figure N°37 et N°38: Examen microscopique après coloration de Gram (**Bellifa, 2014 ; Doudah, 2016**).

2-3- Caractères biochimiques :



Figure N°39 : Identification de *Klebsiella pneumoniae* (galerie API20 E) (Bellifa, 2014).

3- Détection de la présence de la capsule des souches de *Klebsiella pneumoniae* :

La capsule était visible comme un halo clair entourant les souches identifiées.

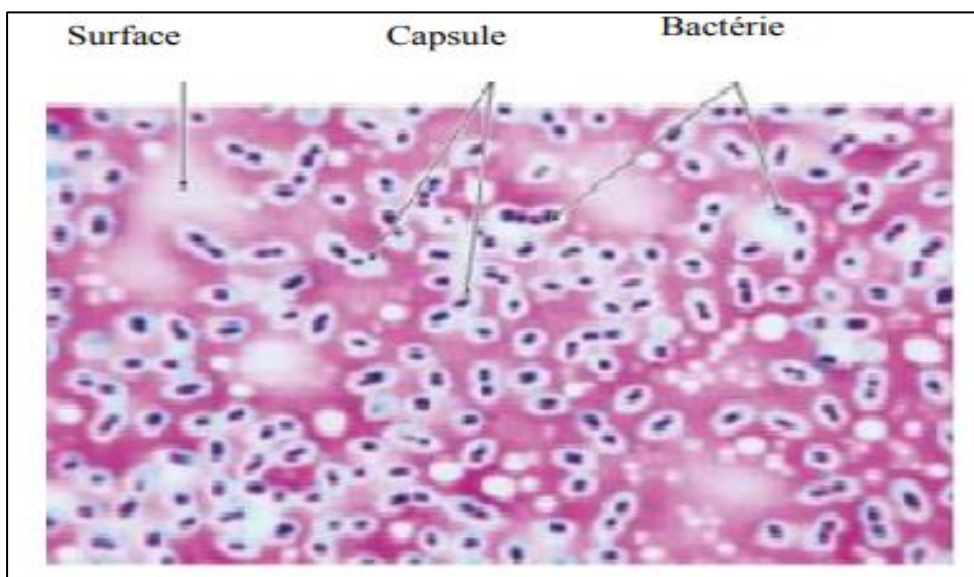


Figure N°40 : Détection de la capsule par l'encre de chine (Bellifa, 2014).

4- Résistances aux antibiotiques : (Antibiogramme)

Evaluation de la sensibilité des antibiotiques à l'hôpital est une phase primordiale, elle oriente le choix des traitements *Klebsiella pneumoniae* est naturellement résistante aux pénicillines (amoxicilline, ticarcilline) par production d'une β -lactamase (Sougakoff et Trystram, 2003).

Bellifa, 2014 a trouvé que 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^{ème} génération (C3G) dont les taux sont parmi les plus importants.

D'autre part **Doudah, 2016** a trouvé que les six souches révèlent des taux de résistance très élevés pour amoxicilline, pénicilline, oxacilline, imipénème, vancomycine, cefazoline et ampicilline. Trois souches sont résistantes à l'Ofloxacin (OFX), cinq souches sont résistantes à la tétracycline (TE), les six souches sont très sensibles à ciprofloxacine (CIP).

Ainsi que les six souches isolées dans le présent travail (**Chaouche et al., 2018**) se sont avérées résistantes aux antibiotiques.

D'autre travail réalisé par **Boukha-Hassane, 2014** démontré que les 8 souches révèlent des taux de résistance très élevés pour l'ampicilline. Pour la famille des monobactames ces souches représentés une résistance très variée. 7 souches résistaient à la cefotaxime, la céfalotine sauf 4 souches qui sont résistantes à l'aztréoname, ceftriaxone ; 3 souches ont représenté une résistance aminosides ; et les 8 souches de *k. pneumoniae* étaient également résistante à l'ofloxacin, sauf 4 d'entre elles étaient résistantes à l'acide nalidixique.

Les effets des disques d'antibiotiques sur *K. pneumoniae* des études précédentes sont présentés dans les figures ci-dessous :



Figure N°41: Résultats d'antibiogramme d'une souche de *K. pneumoniae* isolée du service de réanimation (**Bellifa, 2014**).

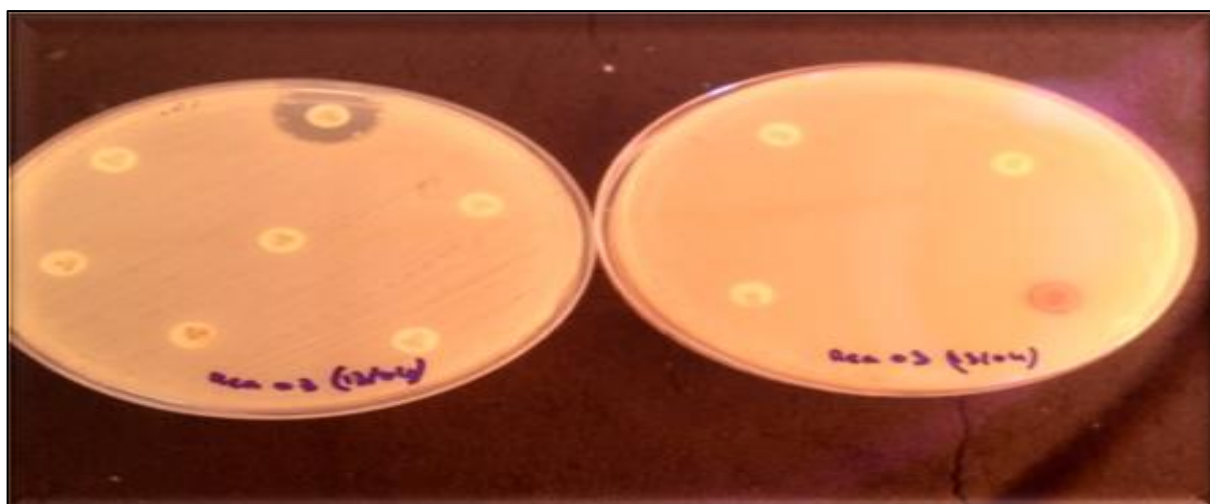


Figure N°42: Image montrant l'effet des disques d'antibiotiques sur suspension de *Klebsiella pneumoniae* (Bouklia-Hassane, 2014).

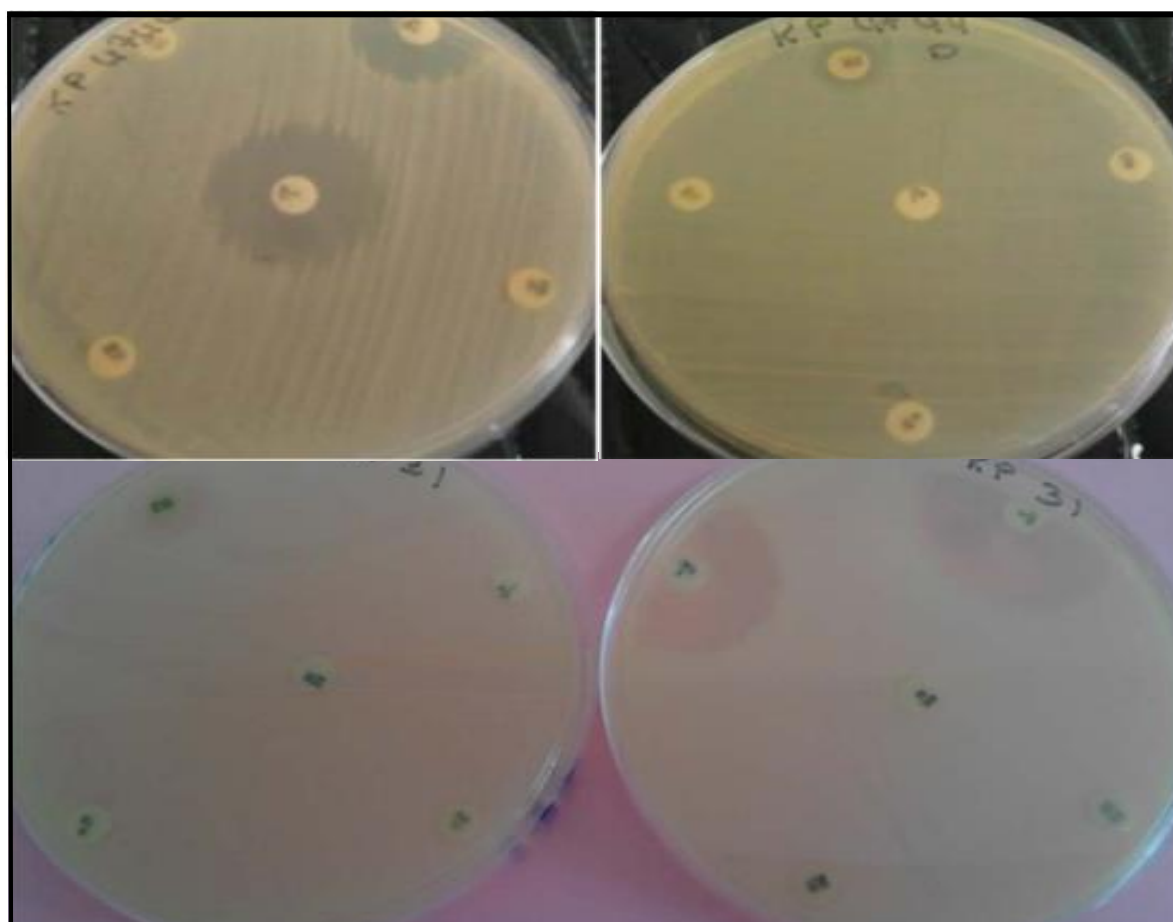


Figure N°43: Effet des disques d'antibiotiques sur *Klebsiella pneumoniae* (Doudah, 2016).

Un antibiogramme a été réalisé sur la totalité des souches. Leurs phénotypes de résistance vis-à-vis chaque antibiotique des quatre études sont représentées dans les graphiques ci-dessous :

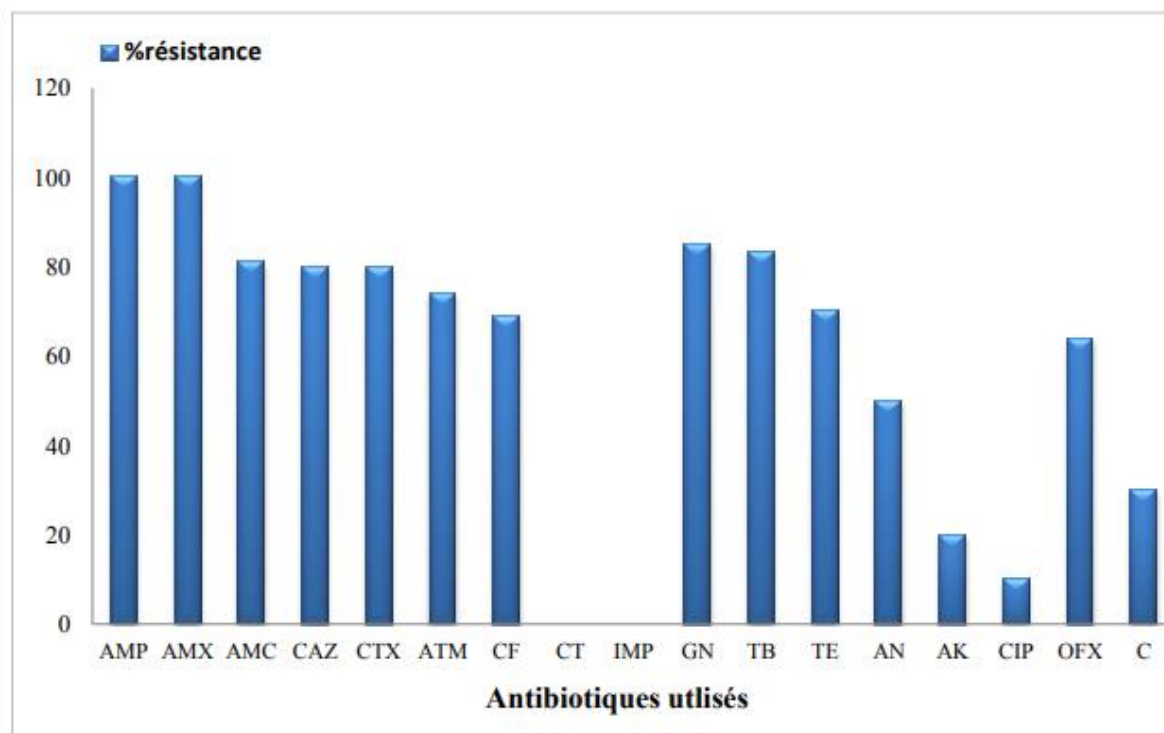


Figure N°44: Fréquence de résistance aux antibiotiques des souches *K. pneumoniae* isolées des dispositifs médicaux étudiés (CHU Tlemcen) (Bellifa, 2014).

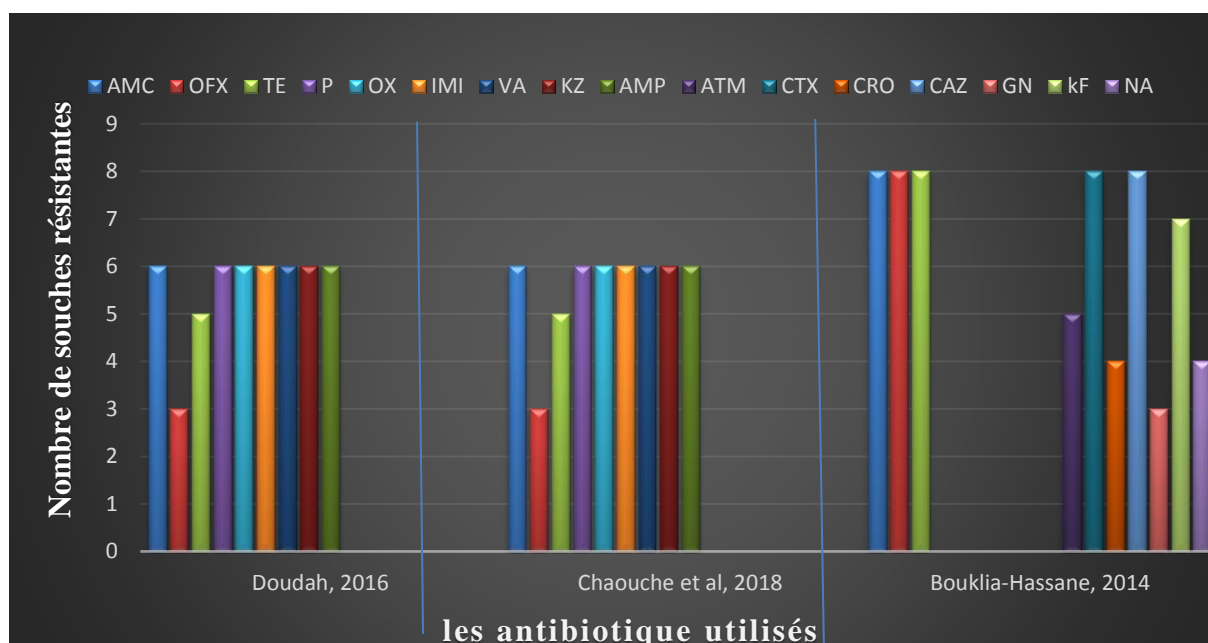


Figure N°45 : Evaluation de la résistance des souches *Klebsiella pneumoniae* vis-à-vis les antibiotiques des trois études (Doudah, 2016 ; Chaouche et al., 2018 ; Boukllia-Hassane, 2014)

5-Evaluation de la formation du biofilm in vitro par trois techniques :

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).

Lors de cette étude (Bellifa, 2014) 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 N°46).



Figure N°46 : Evaluation de la production de biofilm par la méthode TCP (Bellifa, 2014).

Ainsi que 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 (Figure N°47).

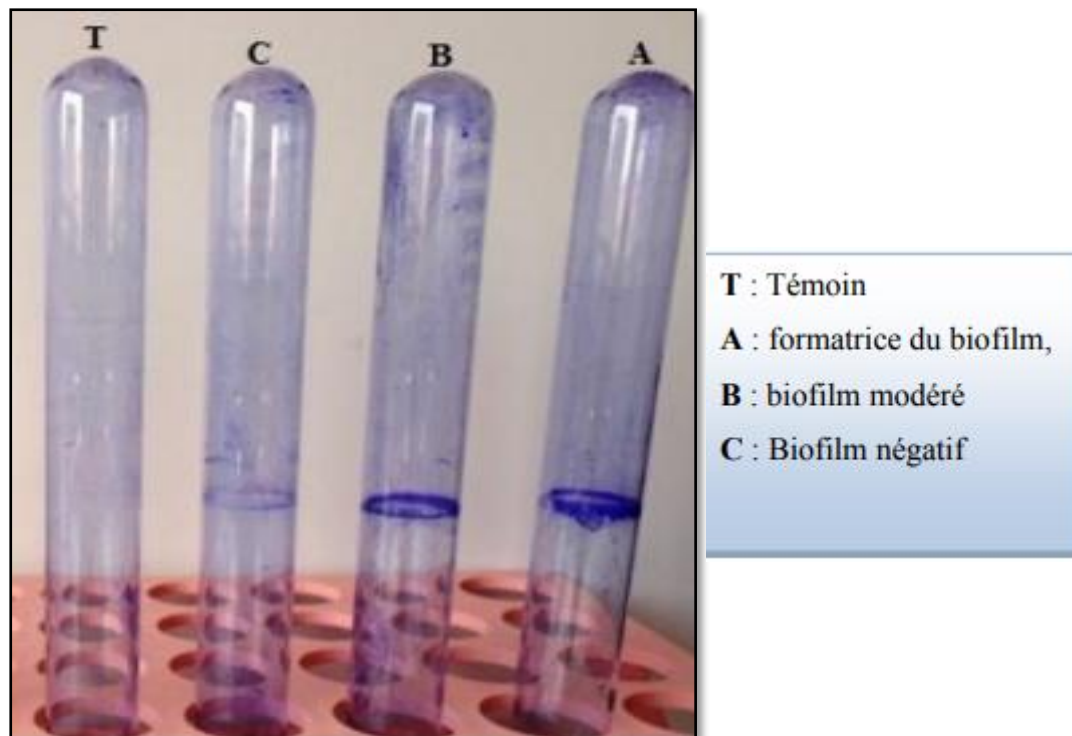


Figure N°47 : Evaluation de la production de biofilm par la méthode TM (Bellifa, 2014).

Par contre 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 N°48).



Figure N°48: Phénotype de production de slime chez *K. pneumoniae* sur milieu RCA (Bellifa, 2014).

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.

Tableau N°7: Résultats de la formation du biofilm par les trois techniques TM, TCP et RCA (Bellifa, 2014).

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

D'autre étude réalisée par Doudah, 2016 a montré que Les six souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées durant cette étude ont été testées pour leurs capacités à former des biofilms par la méthode tube (TM) (Figure N°49).

La technique utilisée a montré les résultats suivants : Trois souches sont fortement formatrices de biofilm, deux souches sont modérément formatrices de biofilm et une seule souche non formatrice de biofilm.

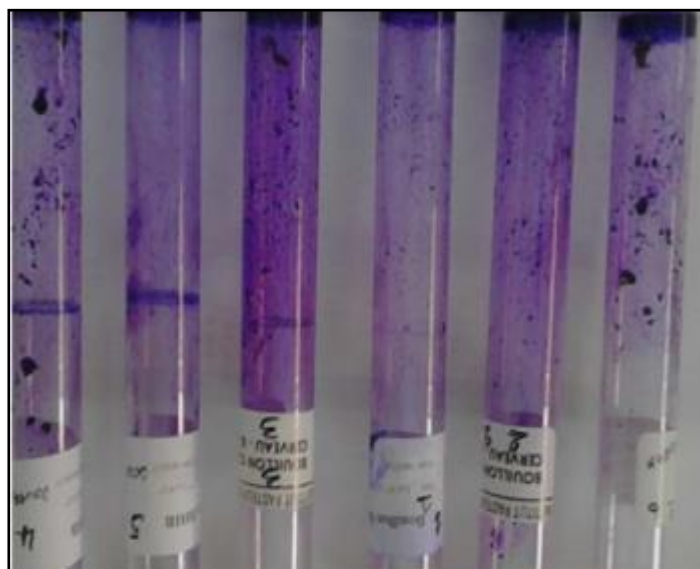


Figure N°49 : Evaluation de la formation de biofilm par la méthode tube (TM) (Doudah, 2016).

Selon l'étude réalisée par **Chaouche et al., 2018** a montré que les six souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées ont été testées par la méthode tube (TM) pour d'avoir leurs capacités à former des biofilms sur les différents dispositifs médicaux. La technique utilisée a montré les résultats observés dans la **figure N°50**. Cependant, trois souches sont fortement formatrices de biofilm, les trois autres n'ont pas le pouvoir de former un biofilm.

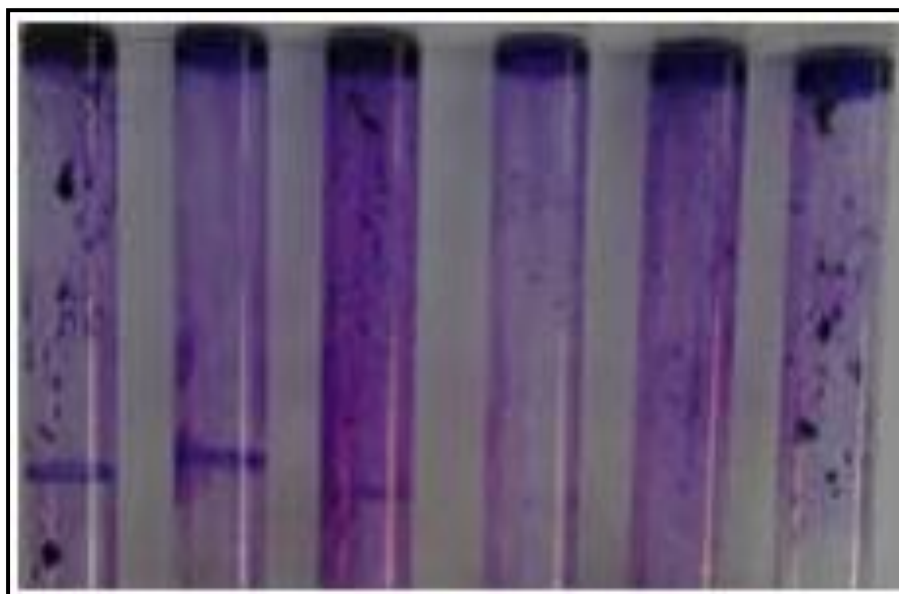


Figure N°50 : Evaluation de la formation de biofilm par ma méthode des tubes (**Chaouche et al., 2018**).

D'autre étude faite par **Boukha-Hassane, 2014** a démontré que les 8 souches cliniques *Klebsiella pneumoniae* isolées durant cette étude ont été testés pour leurs capacités à former des biofilms par la méthode de plaque de culture de Tissus (TCP) (**Figure N°51**).

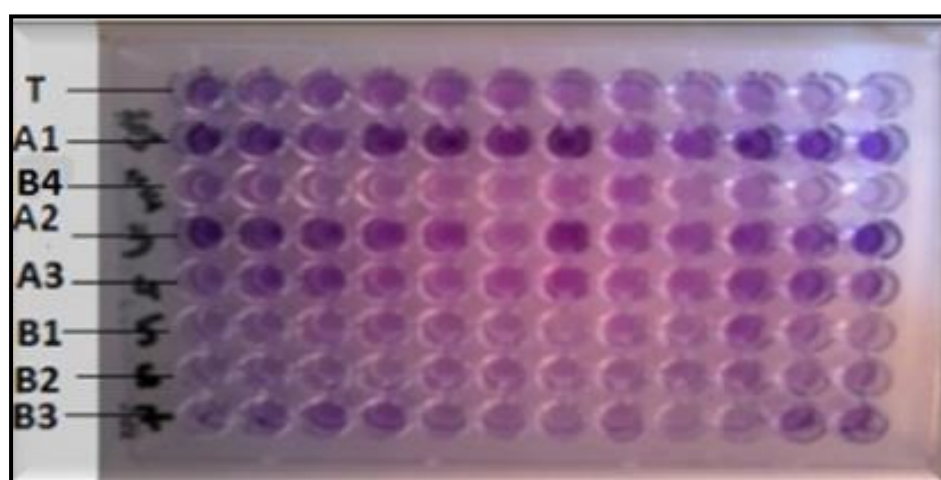


Figure N°51 : Résultat de la formation de biofilm par la méthode de TCP (**Boukha-Hassane, 2014**)

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

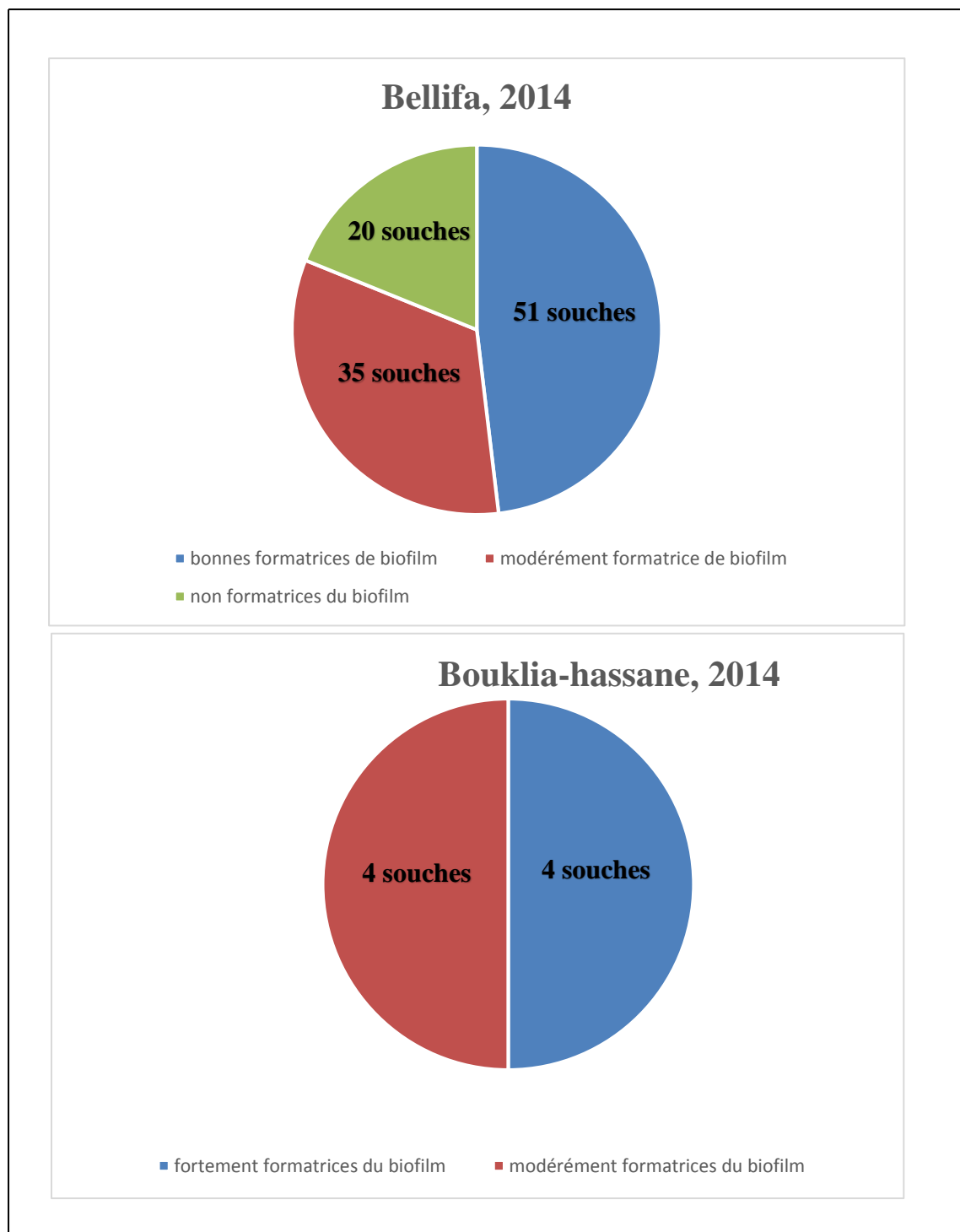


Figure N°52 : Résultats de la production de biofilm chez *K. pneumoniae* par la méthode TCP des deux études **Bellifa, 2014 ; Boukilia Hassane, 2014.**

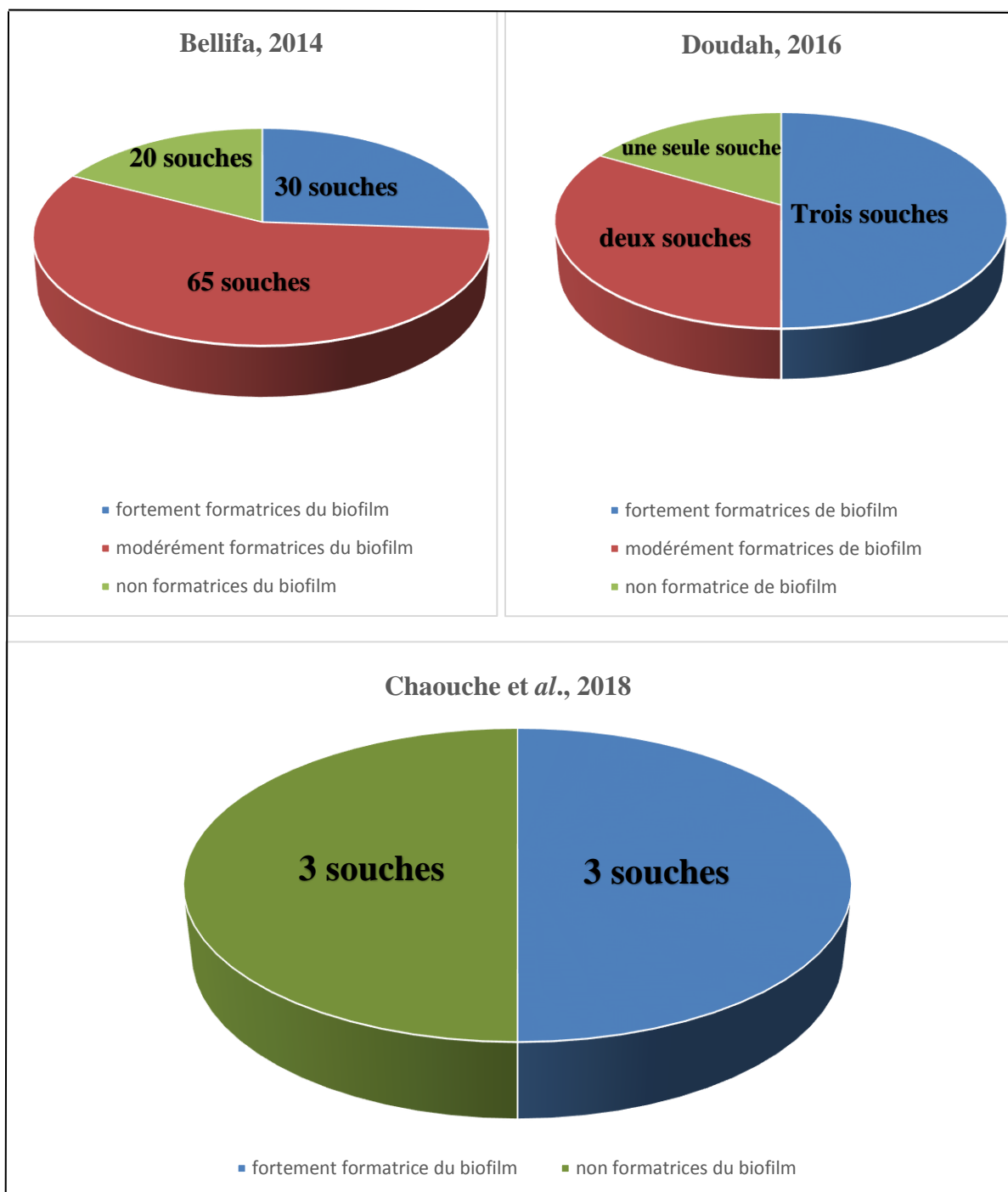


Figure N°53 : Résultats de la production de biofilm chez *K. pneumoniae* par la méthode TM des trois études **Bellifa, 2014 ; Doudah, 2016 ; Chaouche et al., 2018.**



Discussion



Plusieurs chercheurs ont étudié les stratégies employées par les micro-organismes pour produire des biofilms, Ils ont montré que :

Bellifa, 2014 a trouvé que sur 115 souches de *Klebsiella pneumoniae*, 30 sont fortement formatrices du biofilm par la technique de TM et 51 sont aussi fortement formatrices du biofilm par la technique de Microplaque et 20 sont fortement formatrices du biofilm par la méthode de RCA, suite à cette résultat de cette étude on peut conclure que la technique de microplaque est plus efficace pour détecter la formation du biofilm in vitro par rapport les deux techniques : TM et RCA.

D'autres travaux ont montré que plusieurs souches de *K. pneumoniae* sont formatrices de biofilm à un taux élevé, **Bellifa et al., 2013** a trouvé que sur 115 souches de *Klebsiella pneumoniae*, 30 sont fortement formatrices du biofilm, 65 modérément formatrices de biofilm et 25 souches sont non formatrices de biofilm.

D'autres études montrant que la durée de l'implantation du dispositif de manière significative influencé la formation de biofilm.

De même, **Hennequin et Forestier, 2007** ont rapporté dans un étude précédente l'association des bactéries productrices de biofilm avec la colonisation des cathéters urinaires. Long terme les cathéters sont colonisés par de vastes biofilms, qui peut avoir des effets profonds sur la santé du patient.

Dans cette étude **Nirwati et al., 2019** ; ont trouvé que 148 (85,63 %) des 167 isolats étaient des biofilms producteurs. Une étude similaire rapportée par **Hassan et al., 2011** a déclaré que sur 110 *K. pneumoniae* testés, 70 isolats (64,7 %) ont été identifiés comme producteurs de biofilm élevés ou modérés et 40 isolats (35,3%) ont été identifiés comme faibles producteurs de biofilms.

Dans cette étude **Seifi et al., 2016** ; ont testé la capacité du biofilm production dans des isolats de *K. pneumoniae* obtenus à partir de spécimens cliniques. Les résultats indiqué qu'une proportion énorme (plus de 93 %) des isolats étaient des souches productrices de biofilm. Les bactéries formant un biofilm provoquent infections, telles que les infections liées aux cathéters et aux implants, ainsi que les troubles potentiellement mortels chez les patients atteints de brose kystique, plaies chroniques et otite moyenne chronique.

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

Macleod et al., 2007 a analysé 106 échantillons de biofilms développés sur des sondes urinaires, constatant que *K. pneumoniae* était capable de former un biofilm mixte avec *Proteus mirabilis*, quand *E. coli*, *Morganella morganii* ou *Enterobacter cloacae*.

Claudia et al., 2014 ont démontré que *K. pneumoniae* est capable de former un biofilm multi-espèces ensemble avec *Candida albicans* dans une sonde urinaire retirée d'un patient hospitalisé au centre neuromoteur hôpital de réadaptation, Fondazione Santa Lucia à Rome, Italie.

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.

L'étude d'**Oli et al., 2012** montrent que la technique TCP est la plus fiable pour la détection de la formation de biofilm chez des souches cliniques.

De même **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*.

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 corrélés avec les résultats obtenus par la microscopie électronique.

La détection du biofilm par les méthodes TM et TCP semblent plus fiables à celle du rouge Congo (**Bellifa, 2014**).

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**).

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.

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**).

Une autre étude d'**Alcantar-Curiel et al., 2018** ; ont proposé que s'il semble que la résistance aux antibiotiques et la capacité bactérienne à former un biofilm jouent un rôle important dans la propagation mondiale de *K. pneumoniae*.

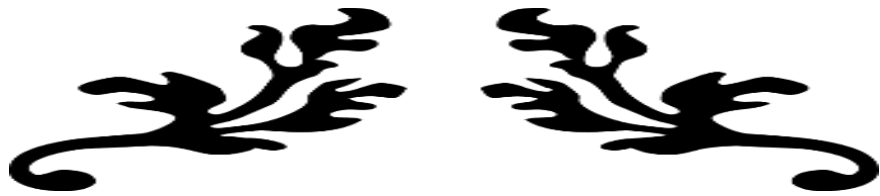
De même **Singla et al., 2012** ; ont montré que *K. pneumoniae* en mode de croissance biofilm était plus résistante à des antibiotiques qu'en mode planctonique.

Ashurst et Dawson, 2019 ; ont souligné que *K. pneumoniae* colonise généralement l'homme surfaces muqueuses de l'oropharynx et gastro-intestinal tract. Pour cette raison, *K. pneumoniae* est considéré comme la cause la plus fréquente de pneumonie nosocomiale aux Etats-Unis.

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.

K. pneumoniae est une bactérie à Gram négatif qui est responsable d'une panoplie de maladies y compris les infections respiratoires, des voies urinaires, et d'infections chroniques des plaies. La formation de biofilm chez cette bactérie est un facteur de virulence majeur utilisé pour coloniser l'hôte humain (**Brandon et al., 2013**).

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 (**Bellifa, 2014**).



Conclusion



La capacité d'une souche à former du biofilm est reconnue comme étant un important facteur de virulence chez de nombreuses espèces bactériennes, dont *K. pneumoniae*. Le rôle pathogène des biofilms est maintenant bien établi dans les infections chroniques ainsi que celle associées aux dispositifs médicaux.

Au cours de ce présent travail, notre rôle était dans un premier temps de fournir les éléments nécessaires pour établir la colonisation du dispositif médical et d'aider à déterminer son imputabilité éventuelle dans le processus infectieux.

Toutes ces souches sont entourées par des capsules, ce qui explique leurs capacités de former les biofilms. L'évaluation de formation de biofilm de nos isolats par les trois techniques (TCP, TM, 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.

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

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

La réduction de la durée d'implantation du dispositif médical implantable, ainsi que le sondage et le cathétérisme inutiles constituent les étapes clés dans la maîtrise de la formation de biofilm et par conséquent les infections qui lui sont liées.

La plupart des isolats de *K. pneumoniae* ont montré une résistance à une large gamme d'antibiotiques. La plupart d'entre eux étaient également se révèle être des producteurs de biofilms de diverses capacités.

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



1. **Aïssata C.O., 2007.** Les infections nosocomiales liées aux cathéters veineux centraux et périphériques dans le service de néphrologie et d'hémodialyse du CHU du point G. Thèse de doctorat en médecine. Université de Bamako, 103p.
2. **Arnaud M., Maugat S., Jarlier V., Astagneau P., 2013.** For the National Early Warning, Investigation and Surveillance of Healthcare Associated Infections Network (RAISIN)/multidrug resistance study group. Ongoing increasing temporal and geographical trends of the incidence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae infections in France, 2009 to 2013.
3. **Alexandra G., 2011.** Sélection de mutations affectant la formation de biofilm chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Mémoire de maître ès sciences (M. Sc) en sciences vétérinaires option microbiologie. Université de Montréal, 111p.
4. **Alcántar-Curiel M.D., Ledezma-Escalante C.A., Jarillo-Quijada M.D., et al., 2018.** Association of Antibiotic Resistance, cell adherence, and biofilm production with the Endemicity of nosocomial *Klebsiella pneumoniae*. Biomed Res Int. 2018; 7012958.
5. **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.
6. **Ashurst JV., Dawson A., 2019.** *Klebsiella Pneumoniae*. In: Stat Pearls. Treasure Island (FL).
7. **Balestrino D., 2006.** Formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae* : facteurs impliqués et rôle du quorum-sensing. Thèse de doctorat Clermont Ferrand. France p7-9.
8. **Bellifa S., 2014.** Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, 92p.
9. **Beloin C.R., Ghigo J.M., 2008.** "*Escherichia Coli* biofilms." 289, 249, 322.
10. **Beloin, C.R., Ghigo J.M., 2008.** "*Escherichia coli*, fimbriae, bacterial persistence and host response induction in the human urinary tract."
11. **Bezoui M., 2016.** Biofilms bactériens et leur implication en pathologie humaine. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université Mohammed V-Rabat, 127p.

- 12. Bellifa S., Hassaine H., Balestrino D., Charbonnel N., M'hamed I., Terki I.K., Lchachi M., Didi W ; 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.
- 13. Bouklia-Hassane O., 2014.** Evaluation de la formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae* isolée de sondes urinaires. CHU de Tlemcen. Mémoire de master. Université Aboubekr Belkaid Tlemcen, 38p.
- 14. Bridier A., Dubois-Brissonnet F., Greub G., Thomas V., Briandet R., 2011.** Dynamics of the action of biocides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicrobial agents and chemotherapy 55, 2648-2654.
- 15. Branda S.S., Vik S., Friedman L., Kolter R., 2005.** Biofilms: the matrix revisited. Trends in Microbiology, 13, 20-26.
- 16. Belbel Z., 2013.** Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées dans les hôpitaux de la ville d'Annaba. Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar Annaba, 138p.
- 17. Bally J., Refutin S., 2020.** Les cathéters veineux centraux. Fiche pratique, 8p.
- 18. 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
- 19. Berra L., Coppadoro A., Bittner E.A., 2012.** A clinical assessment of the Mucus Shaver: a device to keep the endotracheal tube free from secretions. Critical Care medicine 40:119–124.
- 20. Boumelit A., Chenatlia M., 2014.** Contribution à l'étude de l'effet des produits cosmétiques sur la flore cutanée. Mémoire de Master. Université 8 Mai 1945 –Guelma, 41p.
- 21. Bouhadjar A., Terbeche M., 2017.** Evaluation de la formation du biofilm par *Staphylococcus aureus* isolées du cathéter veineux périphérique -CHU Tlemcen. Mémoire de master. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, 63p.
- 22. Chaouche A., Arab K., Laoufi R., Malek M., 2018.** Inhibition du biofilm formé par *Klebsiella pneumoniae* responsable d'infection urinaire par l'huile essentielle et les polyphenols de *Lavandula officinalis*. SAGREN vol 02, no 02, p 39-45.

- 23. CA-SFM., 2010.** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.
<http://www.sfm.asso.fr/>
- 24. CA-SFM., 2013.** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.
- 25. Cristian C., Marie-Hélène S., Armand T., 2015.** Microbiologie, hygiène et droit alimentaire. Dixième Édition. Stéphanie Honoré et Élodie Lecoquerre. 91 p.
- 26. Courvalin P., Leclercq R., E Bingen., 2006.** Antibiogramme.2:142-162, 227-246, 263-277.
- 27. Christensen S.C., Korner B., 1972.** An endemic caused by multiresistant *Klebsiella* in an urological unit. Scand.J. Urol.Nephrol. 6:232-238.
- 28. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.A., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M., 1985.** Adherence of coagulase negative Staphylococci to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. Journal of Clinical Microbiology. 22:996–1006.
- 29. Claudia V., Francesca L., Maria P.B., Gianfranco D., Pietro E., Varaldo., 2014.** Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*.748p.
- 30. Vuotto C., Longo F., Pascolini C., Donelli G., Balice M.P., Libori M.F., Tiracchia V., Salvia A., Varaldo P.E., 2017.** Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. Journal of Applied Microbiology 123, 1003-1018.
- 31. David L., Jean-Marc G., 2012.** Infections associées aux biofilms. Médecine/sciences 2012 ; 28 : 727-39.
- 32. Donlan R.M., 2008.** Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? Curr Top Microbiol Immunol 322, 133-161.
- 33. Doudah H., 2016.** L'effet des extraits de *Lavandula officinalis* sur l'inhibition de la formation de biofilms formés par *Klebsiella pneumoniae* isolée des infections urinaires. Mémoire de master. Université M'hamed Bougara Boumerdes, 40p.
- 34. Degrement., 2005.** Memento technique de l'eau. Dixième Édition. Tec et Doc, 144- 173p.
- 35. Derardja A., Messaadia S., 2018.** Recherche de biofilms mixtes sur implants médicaux. Mémoire de master. Université des Frères Mentouri Constantine, 54p.

- 36. Domka J., Lee J., Bansal T., Wood T.K., 2007.** Temporal gene expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environmental Microbiology*. 9: 332–346.
- 37. Djelloul D.S., 2010.** Détection de biofilm a *staphylocoques* sur cathéters veineux. Mémoire de Magister. Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen, 77p.
- 38. Daniel Vogel M.D., Jonas Marschall M.D., 2015.** Prévention des bactériémies associées aux cathéters : nouvelles directives ...du point de vue suisse. *Swissnoso*. Volume 20 No 1, 1-6p.
- 39. Elodie C.D., 2016.** Les infections liées au cathéter : aspects épidémiologiques.
- 40. Er-Rahmany F., 2010.** Les infections liées aux cathéters veineux centraux en réanimation. Thèse de doctorat. Université Cadi Ayyad, 58p.
- 41. Emilson J.P. R., 2012.** Complications Des Abords Veineux Peripheriques A L'hopital Mere Enfant Tsaralalana. Thèse de doctorat. Université D'antananarivo, 60p.
- 42. 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*.
- 43. Freeman D.J., Falkiner F.R., Keane C.T., 1989.** New method of detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*. 42: 87-84.
- 44. Feldman C., Kassel M., Cantrell J., Kaka S., Morar R., Goolam Mahomed A., Philips J.I., 1999.** The presence and sequence of endotracheal tube colonization in patients undergoing mechanical ventilation. *European Respiratory Journal*. 13:546–551.
- 45. Grosjean J., Clavé D., Archambaud M., Pasquier C., 2017.** *Bactériologie et Virologie pratique*. 3éme édition, 125-129p.
- 46. Gozoua E., 2019.** Étude du quorum sensing des bactéries organisées en biofilm en vue de la mise en place de biocides non toxiques. Thèse de doctorat. Université de Toulon, 268p.
- 47. Hola V., Ruzicka F., 2011.** The formation of poly-microbial biofilm on urinary catheters. *Urinary tract infections*, 153- 172.

- 48. Hassan A., Usman J., Kaleem F., Omair M., Khalid A., Iqbal M., 2011.** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(4), 305-311.
- 49. Hennequin C., Forestier C., 2007.** Influence of capsule and extended-spectrum betalactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. *Research in Microbiology* 158(2007) 339-347.
- 50. Hennequin C., Robin F., Cabrolier N., Bonnet R., Forestiera C., 2012.** Characterization of a DHA-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain Involved in an Outbreak and Role of the Amp Regulator in Virulence. 0066-4804/12/\$12.00 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 288–294p.
- 51. Inglis T.J., Millar M.R., Jones J.G., Robinson D.A., 1989.** Tracheal tube biofilm as a source of bacterial colonization of the lung. *Journal of Clinical Microbiology* 27:2014–8.
- 52. 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.
- 53. 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.
- 54. Jagnow J., Clegg S., 2003.** *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. *Microbiology*. 149:2397-2405
- 55. Kedjar K., Ramdane C.S., 2015.** *Klebsiella pneumoniae* : Antibiorésistance et effets des extraits organiques et aqueux d’Inula viscosa. Mémoire de Master. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, 21p.
- 56. Kassis-Chikhani N., 2012.** *Klebsiella Pneumoniae* pathogène nosocomial resistance et virulence. Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie Paris 6, 190p.
- 57. Knobloch J.K., Horstkotte M.A., Rhode H., Mack D., 2002.** Evaluation of different detection methods for biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology*. 19: 101-106.
- 58. Koerner R.J., 1997.** Contribution of endotracheal tubes to the pathogenesis of ventilator-associated pneumonia. *Journal of Hospital Infection*. 35:83–89.

- 59. 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.
- 60. Lagha N., 2015.** Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de Laghouat. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen, 84p.
- 61. Michèle A., Catherine B., Dany C., Sylvie G., Véronique G., Michèle H., Catherine D., Micheline L., Thierry S., Viviane Y., 2001.** Le Catheterisme Veineux. Guide De Bonnes Pratiques. C.CLIN Paris-Nord. 2ème version, 1-52.
- 62. Michel C., 1981.** Utilisation des antibiotiques en pisciculture. Note technique n°11bis, 125p.
- 63. Mimos O., 2013.** Infections liées aux cathéters intra-vasculaires en réanimation. Le Congrès Médecins. Conférence d'actualisation. Université de Poitiers, 86021 Poitiers cedex, France.
o.mimos@chu-poitiers.fr
- 64. Macleod S.M., Stickler D.J., 2007.** Species interactions in mixed-community crystalline biofilms on urinary catheters. *J. Med. Microbiol*, 56, 1549–1557.
- 65. 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.
- 66. Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay D.J., 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.
- 67. M'Hamedi I., 2014.** Evaluation de la formation de biofilms des souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées de dispositifs médicaux au CHU de Tlemcen. Thèse de Doctorat. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, 66p.
- 68. Madouri M., 2017.** Formation de biofilm in vitro par des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* isolées de sondes urinaires. Mémoire De Master. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, 56p.

- 69. Nasr S.A., AbuShady H.M., Hussein H.S., 2012.** Biofilm formation and presence of icaAD gene in clinical isolates of staphylococci. The Egyptian Journal of Medical Human Genetics 1110-8630.
- 70. Nirwati H., Kian S., Fahrina F., Fernando W., Sarastia N., Vania P., Mohamad S.H., Andreanita M., Abu T.A., Titik N., 2019.** Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. BMC Proceedings, 1-8.
- 71. Nouri M., Ziadi C.F., 2015.** Etude bactériologique et résistance aux antibiotiques de *Klebsiella pneumoniae*. Mémoire de Master. Université des Frères Mentouri Constantine, 50p.
- 72. 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).
- 73. 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.
- 74. 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.
- 75. Paterson D.L., Bonomo R.A., 2005.** Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin.Microbiol.Rev. 18:657-686.
- 76. Paolozzi L., Liebart J.C., 2015.** Microbiologie. 2 ème édition, 357p.
- 77. Ramiro P., 2006.** Dispositifs Médicaux Concepts et réalités de terrain, guide juridique et pratique.
- walraeve-bresson@sante.gouv.
- 78. Rosyne L., 2016.** Activités anti-biofilm de *Lactobacillus* vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae*. Thèse de doctorat. Université d’Auvergne, 139p.
- 79. Roux A., Ghigo J.M., 2006.** Les biofilms bactériens présenté par communication. Bull. Acad. Vét. France - Tome 159 - N°3. Pp 261-268.

- 80. 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.
- 81. 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.
- 82. Samou F., Hamel S., 2005.** Les Infections Nosocomiales Dans Le Service De Chirurgie « B » De L'hôpital Du Point G. Thèse de doctorat en médecine. Université du Mali.97p.
- 83. Sekhri-Arafa N., 2011.** Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *Klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Benbadis de Constantine. Thèse de doctorat. Université Mentouri de Constantine, 187p.
- 84. Sirot D., 1995.** Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 36 Suppl A: 19-34.
- 85. Seghir A., 2015.** Recherche de biofilms mixtes sur cathéters veineux périphériques au CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat. Université Aboubekr Belkaïd –Tlemcen, 110p.
- 86. Spormann A.M., 2008.** Physiology of microbes in biofilms stability of Burkholderia cenocepacia biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*.5208- 5218.
- 87. Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic BS. Vabic-Vlahovic M., 2000.** A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 40: 175–179.
- 88. Sottile F.D., Marrie T.J., Prough D.S., 1986.** Nosocomial pulmonary infection: possible etiologic significance of bacterial adhesion to endotracheal tubes. *Critical Care Medicine* 14:265–70.
- 89. Singla S., Harjai K., Chhibber S., 2012.** Susceptibility of different phases of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* to three different antibiotics. *The Journal of antibiotics*.
- 90. Seifi K., Kazemian H., Heidari H., Rezagholizadeh F., Saeed Y., Shirvani F., Hourani H., 2016.** Evaluation of biofilm formation among *Klebsiella pneumoniae* isolates and molecular characterization by ERIC-PCR. *Jundishapur J Microbiol*. 2016;9(1): e30682.

91. Saha A., Devi K.M., Damrolien S., Devi K.S., Sharma K.T., 2018. Biofilm production and its correlation with antibiotic resistance pattern among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital in north-East India. *Int J Adv Med.* 2018;5(4):964–8.

92. Soufi F.Z., Hafayed H., 2019. Le profil phénotypique de la résistance aux bêta-lactamines de *Klebsiella pneumoniae* uropathogène isolée à l'hôpital El-Hakim Saâdan de Biskra. Mémoire De Master. Université Mohamed Khider de Biskra, 46p.

93. 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).

94. Thierry J., 2008. Biofilms bactériens. Procédés chimie - bio - agro | Bioprocédés. BIO600 V1, p 1-8.

95. Webographie

<http://www.bacteriologie.net/>

96. Yala D., Merad A.S., Mohamedi D., Ouar–Korichi M.N., 2001. Résistance bactérienne aux antibiotiques. *Médecine du Maghreb,* n°91 : p5-12.

97. Yannick D.N., Skander H., Mario J., 2014. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *The Canadian Journal of Veterinary Research;* 78:110–116.

98. Yang, J., L Ye., W Wang., Y Luo., Y Zhang., L Han., 2011. Diverse prevalence of 16S rRNA methylase genes *ermA* et *erm B*".173.

99. 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.



Annexes



Annexe N°01:

Composition des Milieux de culture (En g/l)

Gélose Mac conkey :

Peptone de viande	3g
Peptone de caséine	17g
Mélange de sels biliaires.....	1,5g
Lactose	10g
Cristal violet.....	0.001g
Rouge neutre	0.03g
Chlorure de sodium.....	5g

Gélose de Mueller-Hinton (MH) :

Infusion de viande de boeuf.....	300g
Hydrolysate de caséine	17,5g
Amidon	1,5g
Agar.....	17g
pH	7,4

Gélose nutritive :

Peptone.....	15g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	2g
NaCl.....	5g
Agar.....	20g
pH	7,6

Annexe N°02:

Colorants utilisé

Violet de gentiane :

Phénol.....	2g
Violet de gentiane.....	1g
Ethanol à 90°.....	10ml
Eau distillée.....	100ml

Lugol :

Iodure de potassium.....	2g
Iode méthaloïde.....	1g
Eau distillée.....	300ml

Fuchsine :

Fuchsine basique.....	1g
Alcool éthylique à 90°.....	10ml
Phénol.....	5g
Eau distillée.....	100ml