



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : ي ا ل م ي ك ر و ب ي و ل و ج

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes

Intitulé :

Recherche de biofilms mixtes sur implants médicaux

Présenté et soutenu par : DERARDJA Asma

Le : 24/06/2018

MESSAADIA Soulef

Jury d'évaluation :

Président du jury : MERGOUD Lilia (Maître Assistante «A» - UFM Constantine).

Rapporteur : BOUCHLOUKH Warda (Maître Assistante «A» - UFM Constantine).

Examinatrice : ABDELAZIZ Wided (Maître Assistante «A» - UFM Constantine).

*Année universitaire
2017 - 2018*

Remerciements

*Nous tenons tout d'abord à remercier dieu le tout puissant et
miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir
ce modeste travail.*

*En seconde lieu, nous tenons à remercier notre chère encadreur Mlle
Bouchloukh Warda
Maître assistante à l'UFM Constantine pour ses précieux conseils sa
confiance et son aide
durant toute la période du travail.*

*Notre vif remerciement pour les membres du jury à commencer par
Mme MERGOUD Lilia
Maître assistante à l'UFM Constantine
Qui nous a fait l'honneur de présider notre jury.*

*A Mme **ABDELAZIZ Wided** Maître assistante à l'UFM Constantine
d'avoir accepté d'examiner
Ce modeste travail.*

*Nos profonds remerciements vont également à tous les enseignants qui
nous ont donné
les bases de la recherche pendant les cinq ans et les Personnes qui nous
ont aidé et contribué,
de près ou de loin, à la réalisation de ce modeste travail.*

Merci

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

A mes chers parents ;

Derardja Stofa et Khalfia Akila, je n'oublie jamais vos sacrifices exprimés mon égard, votre attention corrective et votre dévouement pour mon éducation.

A mes chères sœurs ;

Ikram ,Hana ,belkis salsabil.

A mes chers frères ;

Zien Eddine, Fathou Allah, Zakaria, Haroun, borhan Eddine et Mamoune A.bassit

À mon neveu ; Tayssir et A ma nièce ; Rssil

A mon chère fiancé ; Bendali hacine Anouar,

A ma belle famille ; Bendali hacine mouhamed ennasser, baka Fadila , Wided , Wafa, Afaf .

A mes belle sœurs ; Narimen Djaloudi et Ben haroud

Maya,

A mes beaux-frères ; Khbibech Sofwan

À mes chères amies.

Pour tous les moments qui nous avons partagé.

A mon binôme Messaadia Soulef

A tous les membres de nos familles.

Et à la mémoire des gents qui nous à quittés et que dieu le tout Puissant l'accueille en son vaste paradis.

Asma

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

A mes chers parents ;

*, je n'oublie jamais vos sacrifices exprimés mon
égard, votre attention correctrice et votre
dévouement pour mon éducation.*

A mes chères sœurs et A mon cher frère ;

À mes chères amies.

Pour tous les moments qui nous avons partagé.

A mon binôme Derardja Asma

A tous les membres de nos familles.

*Et à la mémoire des gents qui nous à quittés et que
dieu le tout Puissant l'accueille en son vaste paradis.*

Soulef

Table de matière

INTRODUCTION	1
Partie I: Synthèse bibliographique	
CHAPITRE 1: Généralités sur les biofilms	2
1. Introduction générale	2
2. Historique	2
3. Définition d'un biofilm	4
4. Cycle de vie d'un biofilm	5
4.1. Premières étapes du cycle de vie des biofilms : attachement microbien	5
4.1.1. L'attachement initial réversible	6
4.1.2. L'attachement irréversible	6
4.2. Etapes intermédiaires du cycle de vie des biofilms : prolifération et maturation.....	7
4.2.1. Prolifération	7
4.2.2. Maturation	7
4.3. Dernière étape du cycle de vie des biofilms : dispersion	7
5. Les principaux composants d'un biofilm	8
5.1. Les microorganismes	8
5.2. La matrice extracellulaire	9
6. Organisation structurale d'un biofilm	10
7. Ubiquité des biofilms	11
7.1. Dans l'environnement	12
7.2. Dans le domaine industriel	12
7.3. Chez l'homme	12

7.4. Dans le domaine médical	13
7.4.1. Les infections dues aux biofilms	13
7.4.2. Protection vis-à-vis du système immunitaire	14
7.4.3. L'antibiothérapie et les biofilms	14
8. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm	14
8.1. Caractéristiques de la surface	15
8.2. Caractéristiques du milieu	15
8.3. Propriétés des cellules	15
9. Les mécanismes régulateurs de la formation de biofilms	15
9.1. Le quorum sensing	15
9.2. Régulation génétique par les cellules fixées	16
10. Avantages conférés par le mode de vie biofilm	16
10.1. Avantages métaboliques	16
10.2. Protection mécanique et résistance aux stress extérieurs	16
CHAPITRE 2: Les implants médicaux invasifs	18
1. Définition d'un dispositif médical	18
2. Les sondes urinaires	18
2.1. Définition d'une sonde urinaire	18
2.2. Les infections urinaires associées aux soins	19
2.3. Physiopathologie des infections urinaires associées au sondage urinaire.....	19
2.4. Les voies de contamination des sondes urinaires	19
2.5. Biofilms sur sondes urinaires	20
2.6. Microbiologie des infections urinaires associées au sondage urinaire	21
2.7. Prévention des infections urinaires associées au sondage urinaire	21

3. Le cathéter veineux	22
3.1. Définition d'un cathéter	22
3.2. Les différents types de cathéters	22
3.3. Les infections liées aux cathéters	23
3.4. Les principales voies de contamination du cathéter	23
3.5. Biofilms sur cathéters	25
3.6. Microbiologie des infections associées aux cathéters vasculaires	25
3.7. Prévention des infections associées aux cathéters	26
Partie II: Partie pratique	
I. Matériel et méthodes	27
1. Cadre d'étude	27
2. Types de prélèvements	27
3. Traitement des échantillons	27
4. Souches bactériennes	28
4.1. Isolement et identification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
4.2. Isolement et identification de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	28
4.3. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques	28
5. Les tests de formation de biofilms en tubes	29
5.1. Cultures bactériennes	30
5.2. Test au Cristal Violet	30
II. Résultats et discussion	32
1. Isolement et identification de souches bactériennes à partir des dispositifs médicaux.....	32
1.1. Isolement et identification de <i>P. aeruginosa</i> et de <i>K. pneumoniae</i>	34
1.2. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques	34

2. Tests de formation de biofilms en tube	35
2.1. Tests de formation de biofilms en polystyrène	36
2.2. Tests de formation de biofilms en verre	38
CONCLUSION	43
Références	45
Annexes	
Résumés	

Liste des abréviations

ADNe: ADN extracellulaire

AFNOR NF: Association Française de Normalisation

AMC: Augmentin

AML: Amoxicilline

AMX: Amoxilline

AN: Amikacine

ATB : Antibiotiques

ATM: Aztréonam

BCC : Bouillon cœur cerveau

C: Chloramphénicol

CAZ: Céfotaxime

CHU: Centre Hospitalier Universitaire

CIP: Ciprofloxacine

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute

CLSM: Confocal Laser Scanning Microscopy

CS: Colistine

CTX: Céfotaxime

CTX: Céfotaxime

CV : Cristal Violet

CVC : Cathéters Veineux Centraux

CVC: Cathéters vasculaire centraux

DM : Dispositifs Médicaux

DO : Densité Optique

DsRed: Discosomasp. Red fluorescent protein

ED: Eau Distillée

ePN: exoprotéines

EPS : Substances Polymériques Extracellulaires

ePS: exopolysaccharides

FEP: Céfépime

FOX: Céfoxitine

GFP: Green Fluorescent Protein

GM: Gentamicine)

ILC: Infections liées aux cathéters

IN: Infections Nosocomiales

IPM: Imipenème

IU: Infections urinaires

IUN: infections urinaires nosocomiales

LB: Luria Bertani

LPS : les lipopolysaccharides

MEB: Microscopie électronique à balayage

MH: Mueller-Hinton

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PIP: Pipéracilline

QS: Quorum Sensing

SU: Sonde urinaire

SXT: Bactrim

TE: Tétracycline

TIC: Ticarcilline

TSI: Triple Sugar Iron Agar

Liste des figures

Figure 1. Biofilm de <i>Pseudomonas</i> sous Microscopie Électronique à Balayage enrobé dans la matrice d'exopolysaccharides	4
Figure 2. Cycle de vie des biofilms	5
Figure 3. Biofilm bactérien mixte.....	9
Figure 4. Microstructure (a) et Macrostructure (b) du biofilm de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	11
Figure 5. Photo d'une sonde urinaire.....	18
Figure 6. Sondage vésical : principales voies d'acquisition des microorganismes.....	20
Figure 7. Schéma d'un cathéter veineux	22
Figure 8. Les principales voies d'acquisition des microorganismes sur cathéters.....	24
Figure 9. Biofilm de staphylocoque sur cathéters.....	25
Figure 10. Echantillon de DM à analyser: Sonde Urinaire	27
Figure 11. Protocole opératoire de la formation de biofilms mono-espèces et multi-espèces.....	31
Figure 12. Formation de biofilms de <i>P. aeruginosa</i> et <i>K. pneumoniae</i> sur polystyrène..	37
Figure 13. Croissance de <i>P. aeruginosa</i> et <i>K. pneumoniae</i> en bouillon LB sur polystyrène.....	38
Figure 14. Formation de biofilms de <i>P. aeruginosa</i> et <i>K. pneumoniae</i> sur le verre.....	39
Figure 15. Croissance de <i>P. aeruginosa</i> et <i>K. pneumoniae</i> en bouillon LB sur le verre ..	40

Liste des tableaux

Tableau 1. Les différents types de cathéters	23
Tableau 2. Antibiotiques testés sur <i>P. aeruginosa</i> et <i>K. pneumoniae</i>	29
Tableau 3. Souches bactériennes isolées et identifiées à partir des sondes urinaires et les cathéters veineux	33
Tableau 4. Les résultats d'identification de <i>P. aeruginosa</i> et de <i>K. pneumoniae</i>	34
Tableau 5. Le profil de sensibilité de <i>P. aeruginosa</i> aux ATB testés.....	35
Tableau 6. Le profil de sensibilité de <i>K. pneumoniae</i> aux ATB testés.....	35

Introduction générale

Introduction générale

Le biofilm se définit comme une population microbienne organisée d'une ou plusieurs espèces bactériennes, ou d'autres types de microorganismes, adhérant irréversiblement entre eux et sur une surface biotique ou abiotique, souvent englobée dans une matrice d'exopolysaccharides (**Donlan et Costerton, 2002 ; Hall-Stoodley et Stoodley, 2005**).

La plupart des biofilms médicaux sont composés de plusieurs espèces bactériennes (biofilms mixtes). Des interactions telles que la concurrence, le commensalisme, le mutualisme et le parasitisme sont courantes entre les membres de la communauté au sein d'un biofilm mixte (**Palmer *et al.* 2001 ; Christensen *et al.*, 2002 ; Filoche *et al.*, 2004 ; Luca *et al.*, 2014**).

La majorité des infections humaines (65%) sont causées par des biofilms, souvent responsables du caractère chronique de l'infection (**Hall-Stoodley *et al.* 2004 ; Roux et Ghigo, 2006 ; Simain *et al.*, 2010 ; Harriott et Noverr, 2011**). Malheureusement, ces infections sont d'autant plus difficiles à combattre que les bactéries associées en biofilm sont résistantes aux antibiotiques et aux défenses de l'hôte (**Fux *et al.*, 2004**).

Les principales infections associées aux biofilms sont liées d'une part à des pathologies chroniques comme l'endocardite infectieuse, la mucoviscidose, les infections urinaires ou de plaies, et les pathologies buccodentaires et d'autre part à la colonisation de dispositifs médicaux même si les techniques aseptiques sont rigoureusement respectées. Le développement du biofilm est rapide et inévitable sur la plupart des matériaux utilisés en médecine humaine telles que les cathéters veineux et les sondes urinaires (**Hojo *et al.*, 2009 ; Barakat *et al.*, 2014 ; Ebrey *et al.*, 2004 ; Arciola *et al.*, 2015**).

Dans ce contexte, et en tenant compte que les conditions permettant la formation d'un biofilm mixte ne sont pas clairement établies, le présent travail a pour objectif dans un premier temps d'identifier la flore bactérienne colonisant la surface des cathéters veineux et les sondes urinaires provenant des malades hospitalisés. Dans un deuxième temps, d'étudier *in vitro* la capacité de formation de biofilms mixtes en tubes, suivant la technique de coloration au cristal violet, entre deux bactéries d'intérêt médical à savoir *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*.

Partie I

Synthèse bibliographique

CHAPITRE 1: Généralités sur les biofilms

1. Introduction

En conditions naturelles, les microorganismes peuvent vivre sous forme libre ou planctonique, mais le plus souvent sont retrouvés en communautés pluricellulaires, plus ou moins complexes, à un ou plusieurs types d'organismes. De telles communautés microbiennes peuvent éventuellement adhérer à une surface. La coexistence de ces microorganismes et leurs comportements coopératifs entre eux, ont pour effet l'apparition de nouvelles fonctions au sein de la communauté microbienne. On appelle ces organisations ; des biofilms (**Moons et Michiels, 2009 ; Klein, 2011; Bezoui, 2016; Tasse, 2017**).

Le biofilm, une stratégie de survie, permet aux microorganismes de s'installer et de coloniser un environnement, plutôt que libre et isolé dans le milieu environnemental. En effet, les transitions entre ces modes de vie mettent en jeu des processus dynamiques et complexes (**Filloux et Vallet, 2003; Roux et Ghigo, 2006 ; Klein, 2011**).

Ce mode de vie, dit sessile (à l'opposé de mode de vie planctonique), est retrouvé dans tout type d'environnement. Il est la principale forme de vie microbienne et la capacité à former un biofilm est maintenant reconnue comme une caractéristique microbienne universelle, et par conséquent il est de plus en plus étudié en tant qu'un système d'organisation communautaire pour ces microorganismes (**Tremblay et al., 2014 ; Pinho Medeiros, 2016 ; Tasse, 2017**).

2. Historique

Les premières descriptions de bactéries agrégées ont été publiées par Anthony van Leeuwenhoek. En effet, il observa en **1683** la présence de microorganismes issus d'un échantillon de grattage de sa propre surface dentaire. Une année après, Leeuwenhoek a rapporté un document qui a été considéré comme le premier papier scientifique sur les biofilms (**Sauer et al., 2007; Baudin, 2017 ; Tasse, 2017**).

De **1880** jusqu'à la fin du 20^{ème} siècle, ce mode de vie sessile tombe dans l'oubli. Les bactéries sont alors majoritairement considérées sous leur forme planctonique (**Murray et Lopez, 1997**).

L'existence du mode de vie en biofilm a été envisagée depuis les travaux de Henrici et Zobell. En **1932** Henrici, observa sur des lames de verre plongées dans un aquarium, le

développement de bactéries sur la surface des lames qui s'épaissit progressivement. Ses observations des microorganismes dans l'eau lui permettent d'établir une évidence acceptée seulement depuis quelques décennies : les bactéries sont majoritairement adhérentes sur une surface pour croître et non libres dans leur environnement. Henrici avança cette idée uniquement pour l'environnement aquatique en opposant les bactéries benthiques aux bactéries planctoniques (**Roux et Ghigo, 2006 ; Daddi Oubekka, 2012 ; Pantaléon, 2015**).

Une hypothèse a été décrite dans une étude de Claude Zobell, qui démontra vers **1936** que les surfaces solides sont bénéfiques au développement des bactéries lors de leur conservation dans un milieu nutritif dilué. En **1943**, il montra que de très faibles quantités de nutriments organiques s'adsorbent sur le verre et que cette concentration de matière organique favorise la formation de communautés bactériennes fixées sur les surfaces (**Costerton, 2004; Roux et Ghigo, 2006; Pantaléon, 2015 ; Salain, 2015**).

Les plus importantes études physico-chimiques portant sur les biofilms datent des années **1970**, avec les travaux de Jones *et al.* en **1969**. En utilisant la microscopie électronique, ces chercheurs ont confirmé, outre la structure des biofilms, l'existence d'une matrice polysidique autour des agrégats microbiens dans les filtres des stations d'épuration (**Wagner *et al.*, 2010**).

En **1973**, en utilisant la microscopie électronique, Characklis a démontré la ténacité et la résistance des dépôts microbiens dans les conduites d'eau industrielles (**Wagner *et al.*, 2010**).

En **1978**, John William Costerton a pris conscience que la grande majorité des microorganismes ne sont pas présents en suspension dans les liquides, mais fixés sur des surfaces terrestres et constituées de populations hétérogènes, englobées dans une matrice extracellulaire. Costerton propose alors le terme de « biofilm » pour définir ces communautés microbiennes (**Baudin, 2017**).

L'étude de ces structures biologiques complexes est devenue un champ pluridisciplinaire qui intéresse de nombreux chercheurs (**Sauer *et al.*, 2007; Kone, 2012**). Depuis, l'intérêt pour la recherche scientifique sur les biofilms croît de manière exponentielle, et qui a vraiment débuté qu'à partir des années **2000**, avec la réalisation des premières images CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) de biofilms vivants par Lawrence *et al.* Cependant, il y a encore un manque de connaissances général sur la façon dont les biofilms se

développent, changent et se détachent (Sauer *et al.*, 2007; Karunakaran *et al.*, 2011; Daddi Oubekka, 2012 ; Kone, 2012).

3. Définition d'un biofilm

Étymologiquement, le terme biofilm, vient du «bios» (vie) et de «film» (pellicule) (Figure 1).

Le biofilm se définit comme un micro-écosystème (de l'ordre de quelques micromètres à plusieurs millimètres d'épaisseur) où une population organisée d'une ou plusieurs espèces bactériennes, ou d'autres types de microorganismes (champignons, algues, levures), adhérant irréversiblement entre eux et sur une surface liquide ou solide (eau, tissus biologiques, substrats solides situés dans des environnements aquatiques), souvent englobée dans une matrice hautement hydratée de substances polymériques extracellulaires (EPS). Cette dernière contient en majorité des sucres, lipides, protéines, acides nucléiques extracellulaires et des matières minérales comme des sels, produite par les membres de cette communauté (Roux et Ghigo, 2006; Alnasouri, 2010 ; Remy, 2015 ; Salaün, 2015 ; Bezoui, 2016).

Il présente un phénotype différent de celui des bactéries planctoniques, au niveau du taux de croissance et de la transcription de gènes, assurant la croissance et la survie à l'état sessile et les protégeant des agressions extérieures et exprimant des propriétés biologiques spécifiques (Roux et Ghigo, 2006; Salaün, 2015 ; Bezoui, 2016).

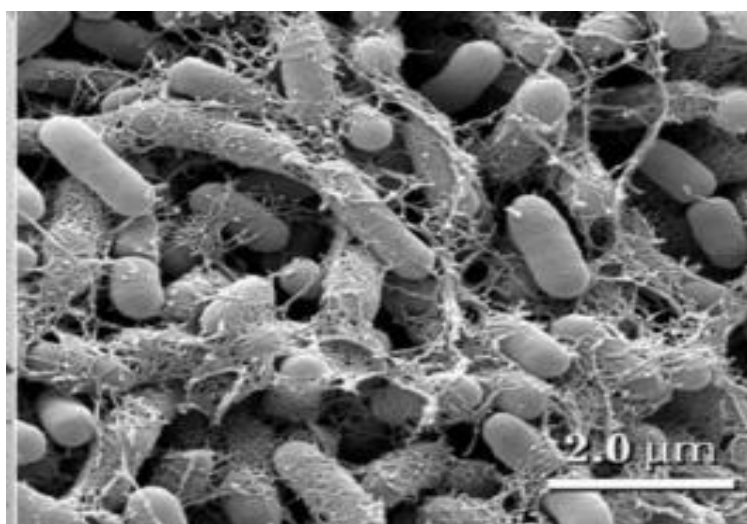


Figure 1. Biofilms d'*Escherichia coli* O157:H7 souche 43895OR développés sur des coupons de verre (Baudin, 2017).

4. Cycle de vie d'un biofilm

Les biofilms ont un cycle de vie, qui peut être considéré comme un équilibre dynamique entre les phénomènes qui tendent à en augmenter l'épaisseur (multiplication des cellules) et les phénomènes qui tendent à en réduire l'épaisseur (mécanismes de détachement) (Squinazi, 2013; Baudin, 2017).

Il existe cinq principales étapes du cycle de vie des biofilms : (i) attachement réversible (ou initial), (ii) attachement irréversible, (iii) prolifération, (iv) maturation et (v) dispersion (Sauer *et al.*, 2002).

Chaque étape de la formation du biofilm est régulée et requiert une reprogrammation de l'expression génique des microorganismes sessiles, résultant d'une réponse à un environnement changeant (Schembri *et al.*, 2003).

La **Figure 2** présente les principales étapes du cycle de développement des biofilms.

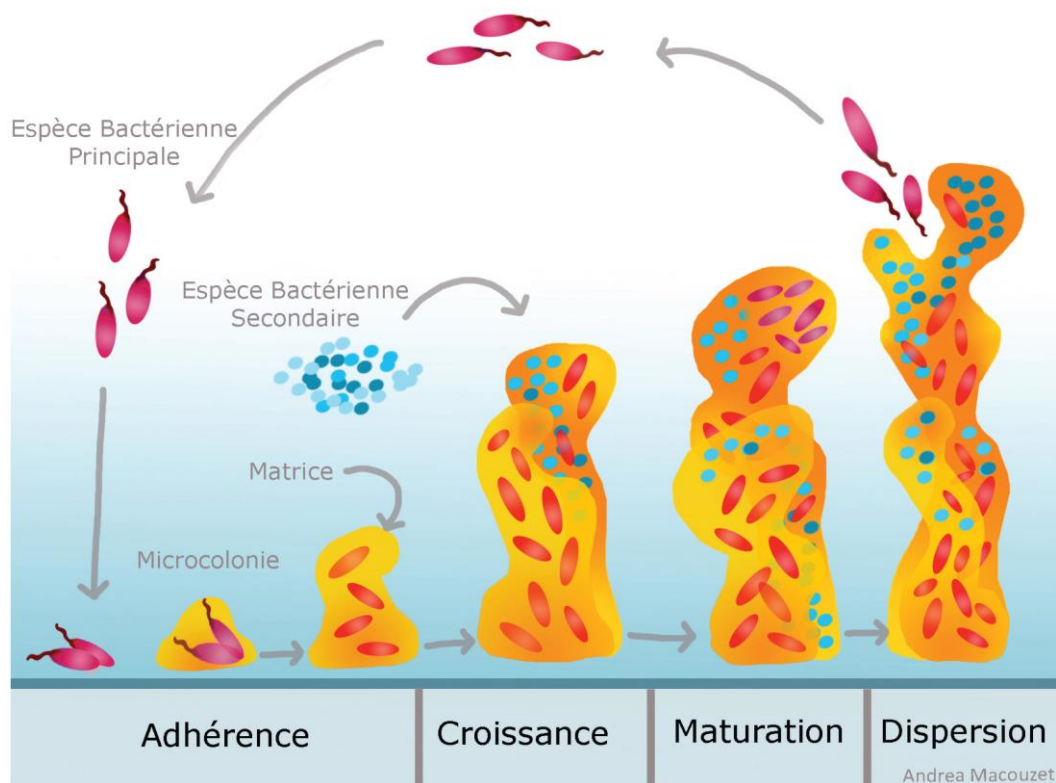


Figure 2. Cycle de vie des biofilms (Tremblay *et al.*, 2014).

4.1. Premières étapes du cycle de vie des biofilms : attachement microbien

La couche de conditionnement est tout d'abord nécessaire à l'attachement microbien. Il s'agit de la couche composée de nombreuses particules organiques ou inorganiques de

charges différentes déposant sur la surface du support sur lequel va s'établir le biofilm (**Garrett et al., 2008; Bezoui, 2016**).

Elle adsorbe également des molécules de faible poids moléculaire, des molécules hydrophobes, des polysaccharides complexes, des glycoprotéines, des lipides, et des composés humiques pouvant être utilisés par les bactéries (**Squinazi, 2013**).

4.1.1. L'attachement initial réversible

Il met en jeu des interactions faibles entre le microorganisme et la surface: il fait intervenir des interactions physicochimiques de faible énergie telles que les forces de Van Der Waals et électrostatiques. C'est également une étape courte, de l'ordre de minute et pendant cette période, les forces d'adhésion entre les bactéries et la surface augmentent rapidement (**Dunne, 2002; Shurtleff et al., 2002; Busscher et van der Mei, 2006 ; Boks et al., 2008**).

La mobilité flagellaire joue également un rôle essentiel dans l'initiation de la plupart des biofilms permettant entre autre de surmonter les forces de répulsion existant entre la cellule et la surface à coloniser, et peut aussi contribuer à l'adhésion cellulaire en augmentant la probabilité de contact entre la cellule et la surface (**Verstraeten et al., 2008**).

Il faut cependant savoir que les bactéries utilisent différentes approches pour former les biofilms. Certaines bactéries formant des biofilms ne possèdent pas de flagelles comme *Staphylococcus aureus* et *S. epidermidis*. L'absence de flagelles est compensée par l'existence d'autres molécules adhésives, comme les curli, permettant l'attachement de la bactérie à la surface (**Wang et al., 2004**).

4.1.2. L'attachement irréversible

Il met en jeu des liaisons permanentes entre ces derniers. Il est grandement dépendant des espèces microbiennes et des propriétés physicochimiques du matériau de la surface en jeu (**Renner et Weibel, 2011**).

Il fait intervenir des interactions de plus forte énergie telles que des interactions moléculaires et cellulaires spécifiques. Il s'agit d'une étape plus longue, de l'ordre de l'heure. A cette étape, les interactions spécifiques entre les structures de la surface microbienne et la surface du matériau deviennent prédominantes. En effet, cette étape requiert des liaisons solides entre support et microorganisme via les fonctions adhésives des structures polymériques de surface bactérienne. Pour les bactéries à Gram négatif, il s'agit des pili, des curli, des capsules et du glycocalix et pour les bactéries à Gram positif, ce sont les acides

teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix (Prigent-Combaret *et al.*, 2000; Van Houdt et Michiels, 2005 ; Prüß *et al.*, 2006 ; Lemon *et al.*, 2008).

Le flagelle est généralement perdu à cette étape pour laisser place à l'élaboration de ces structures adhésives. Certaines protéines jouent un rôle dans la transition entre attachement initial et irréversible. Chez *Escherichia coli*, les lipopolysaccharides (LPS) et le pili de la surface membranaire interviennent en augmentant le taux d'attachement initial et en favorisant la transition vers l'attachement irréversible (Chao et Zhang, 2011).

C'est également à cette étape que les cellules commencent à synthétiser et à sécréter les polymères de la matrice extracellulaire permettant aux bactéries de consolider leur fixation sur la surface. La synthèse des EPS, qui débute dès les premières étapes d'adhésion, se poursuit pendant la maturation du biofilm et la matrice peut alors occuper jusqu'à 75-95 % du volume d'un biofilm mature (Kuchma *et al.*, 2005 ; Baudin, 2017).

4.2. Etapes intermédiaires du cycle de vie des biofilms : prolifération et maturation

4.2.1. Prolifération

Une fois les microorganismes sont solidement attachés à la surface, la croissance des biofilms peut se poursuivre. Le développement de micro-colonies est observé. L'augmentation de la taille des micro-colonies par la division cellulaire et la production de matrice extracellulaire aboutit aux structures tridimensionnelles complexes du biofilm (Chmielewski et Frank, 2003).

4.2.2. Maturation

Le développement et la maturation des biofilms impliquent une communication entre les cellules constituant le biofilm par la détection de molécules signal produites par les microorganismes eux-mêmes et leur donnant une indication sur la densité de cellules présentes dans le milieu (Baudin, 2017).

Avec la maturation du biofilm, des changements environnementaux en son sein ont lieu, notamment associés à une diminution de la disponibilité en nutriments, une augmentation de la concentration de métabolites sécrétés, entraînant une modification de l'expression génique des cellules du biofilm (Tenke *et al.*, 2006; Grasteau, 2011).

4.3. Dernière étape du cycle de vie des biofilms : dispersion

Lorsque l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte, le biofilm subit des phénomènes de dispersion. La dispersion est l'étape permettant aux microorganismes au sein du biofilm de

retourner à un état planctonique. Celle-ci permet aux individus de promouvoir une diversité génétique, de fuir un environnement défavorable ou bien de coloniser de nouvelles niches écologiques engendrant la formation d'autres biofilms (Sauer *et al.*, 2002; Parsek et Greenberg, 2005; Clutterbuck *et al.*, 2007).

La dispersion est considérée comme duelle : dispersion active et dispersion passive. La dispersion active est initiée par les bactéries mêmes du biofilm afin de s'échapper de celui-ci. Il s'agit donc d'une dispersion relevant de mécanismes biologiques (Morgan *et al.*, 2006; Baudin, 2017). La dispersion passive est quant à elle relayée par des forces externes appliquées au biofilm qui décrochent les bactéries du biofilm. Il s'agit donc d'une dispersion relevant de mécanismes physicochimiques (Davies, 2011 ; McDougald *et al.*, 2012).

Les formes planctoniques ainsi libérées peuvent conserver des caractéristiques des bactéries du biofilm, comme l'antibiorésistance. En effet, les bactéries planctoniques essaimant d'un biofilm sont capables de résister aux défenses immunitaires d'un hôte et être à l'origine d'une infection (Dolan et Costerton, 2002).

5. Les principaux composants d'un biofilm

Les deux entités composant les biofilms sont les microorganismes et la matrice extracellulaire (Baudin, 2017). Les microorganismes représentent 2 à 15% du matériel du biofilm alors que la matrice extracellulaire représente 50 à 90% de la masse organique carbonée d'un biofilm (Sutherland, 2001).

Les propriétés physiques du biofilm sont plutôt déterminées par la matrice extracellulaire, alors que ses propriétés physiologiques plutôt par les microorganismes eux-mêmes (De Beer et Stoodley, 2006).

5.1. Les microorganismes

Dans la nature, une des grandes caractéristiques des biofilms, c'est qu'ils sont hétérogènes, des communautés bactériennes au sein desquelles on peut trouver des espèces vivantes extrêmement variées et cela peut conférer une certaine stabilité aux biofilms d'espèces mixtes par rapport aux biofilms mono espèces (Filloux et Vallet, 2003; Pinck, 2014 ; Baudin, 2017).

On trouve ainsi au sein des biofilms aussi bien des organismes procaryotes comme les bactéries ou les archées que des organismes eucaryotes tels que les protozoaires, levures, les champignons, les microalgues ou les petits animaux. On trouve également des virus dans les

biofilms. Les différents microorganismes communiquent et interagissent entre eux afin d'assurer la pérennité du biofilm et la survie de tous (**Pantaléon, 2015 ; Baudin, 2017**).

La localisation des différentes espèces et la mixité des biofilms peuvent être observées grâce à l'utilisation de techniques de fluorescence. Les bactéries peuvent également être étiquetées par l'introduction des gènes codant pour la GFP (*Green Fluorescent Protein*) ou la DsRed (*Discosomasp. Red fluorescent protein*) (**Figure 3**). L'expression de ces protéines fluorescentes va permettre de pister une espèce donnée dans un environnement complexe (**Filloux et Vallet, 2003**).

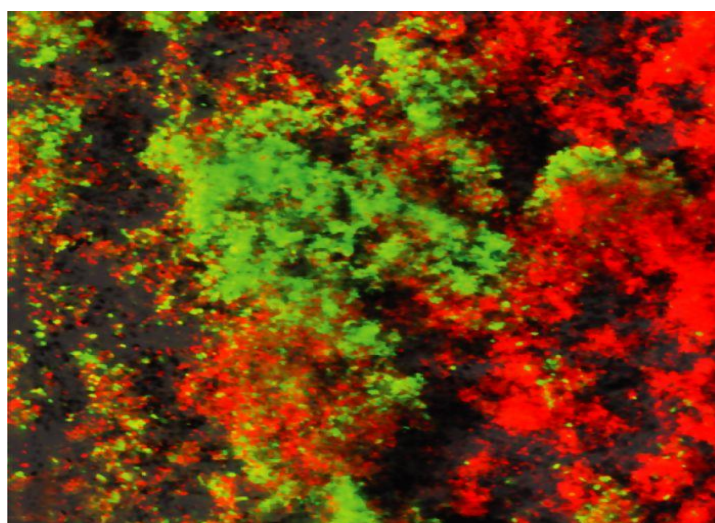


Figure 3. Biofilm bactérien mixte. Les bactéries fluorescentes vertes ou rouges sont visualisées par l'utilisation d'un microscope confocal (*Confocal Scanning Laser Microscopy*, CSLM). Les bactéries présentes dans le biofilm sont *P. putida* OUS82 (marquage Gfp) et *Pseudomonas* sp. B13 (marquage dsRed) (**Filloux et Vallet, 2003**).

5.2. La matrice extracellulaire

A partir d'une certaine densité bactérienne, la matrice extracellulaire ou substances polymériques extracellulaires (EPS) est produite par les microorganismes du biofilm et représente la « colle » fixant les cellules entre elles et au substrat. Les EPS sont caractérisées par leur apparence gélatineuse. Ils sont responsables de la morphologie, la structure, la cohésion et l'intégrité fonctionnelle des biofilms (**Karatan et Watnik, 2009 ; Klein, 2011; Baudin, 2017**).

La matrice extracellulaire est le composant majoritaire du biofilm bactérien et constitue dans la majorité des biofilms bactériens 90% de la masse du biofilm. Les exopolymères produits par les bactéries sont spécifiques de chaque espèce. Chaque biofilm

multi-espèces formé dans un habitat naturel possède une matrice extracellulaire unique, notamment grâce à la variété d'exopolymères produits par les bactéries (**Flemming et Wingender, 2010 ; Pantaléon, 2015**).

La matrice extracellulaire est essentiellement composée d'eau (jusqu'à 97 %) et une grande variété des macromolécules organiques comme les lipopolysaccharides, les glycolipides, les lipides, les protéines, les acides nucléiques, les déchets métaboliques et d'autres composés inorganiques tels que les phosphates ou les sulfates issus du milieu externe (**Sutherland, 2001 ; Roux et Ghigo, 2006; Flemming et Wingender, 2010; Doghri, 2015**).

Quel que soit le biofilm bactérien étudié les composants majoritaires d'une matrice extracellulaire restent les exoprotéines (ePN), les exopolysaccharides (ePS), et l'ADN extracellulaire (ADNe). Chacun d'eux participe à l'émergence d'une matrice extracellulaire dont la composition, chimique dépend toutefois de la ou des espèce(s) microbienne(s) mise(s) en jeu au sein du biofilm, de son (leur) expression génique, ainsi que de l'environnement dans lequel évolue le biofilm (**De Chalvet de Rochermonteix, 2009; Baudin, 2017**).

6. Organisation structurale d'un biofilm

Un biofilm est constitué d'une fine monocouche de cellules à sa base (fixées à la surface du substrat), surmontée de plusieurs couches épaisses de cellules enfermées dans une matrice et reliées par des canaux aqueux. Il s'agit d'une organisation spatiale stratifiée, permettant des échanges (informations, nutriments...) et une coopération entre microorganismes (**Tolker-Nielsen, 2000; Costerton, 2007**).

La couche la plus profonde du biofilm est constituée par les cellules qui se sont fixées en premier. Ces cellules sont petites, leur métabolisme est anaérobie et leur croissance est lente. La couche superficielle du biofilm est constituée de grandes cellules en aérobiose et à croissance rapide. Entre ces deux couches de cellules, on trouve des cellules en micro-aérobiose (**Clutterbuck, 2007**).

Les biofilms ont une structure et architecture complexe et irrégulière, certaines de ces structures sont dites en « champignon » comme celles développées par les biofilms de l'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa*, d'autres sont plutôt de forme « conique » et d'autres encore sont relativement plates (**Ploux et al., 2007**).

L'organisation stratifiée des biofilms s'explique par l'existence de gradients de nutriments et d'ions. Plus on avance vers les couches profondes du biofilm, moins la diffusion

est efficace et plus les concentrations en éléments nutritifs sont basses. Ces gradients permettent d'expliquer la présence de zones de croissance différentes des microorganismes (Bury-Moné, 2007).

Tous les biofilms n'ont pas la même épaisseur. Les biofilms des eaux naturelles oligotrophes sont plus fins que ceux des milieux aqueux riches comme la plaque dentaire ou les cathéters (Bury-Moné, 2007).

La forme, la topographie, les plis et les formes induites par les phénomènes de développement, détachement et décrochement etc., sont observés sur la surface de biofilm à l'œil nu ou avec un faible grossissement (Alnasouri, 2010).

L'utilisation de la microscopie électronique à balayage (MEB) montre qu'un biofilm de *S. epidermidis* est composé des groupes de cellules et des agrégats séparés par des trous bordés par les exopolymères. Les cellules bactériennes forment des structures semblables à un nid d'abeille comme cela est montré dans la Figure 4 (Costerton, 2007).

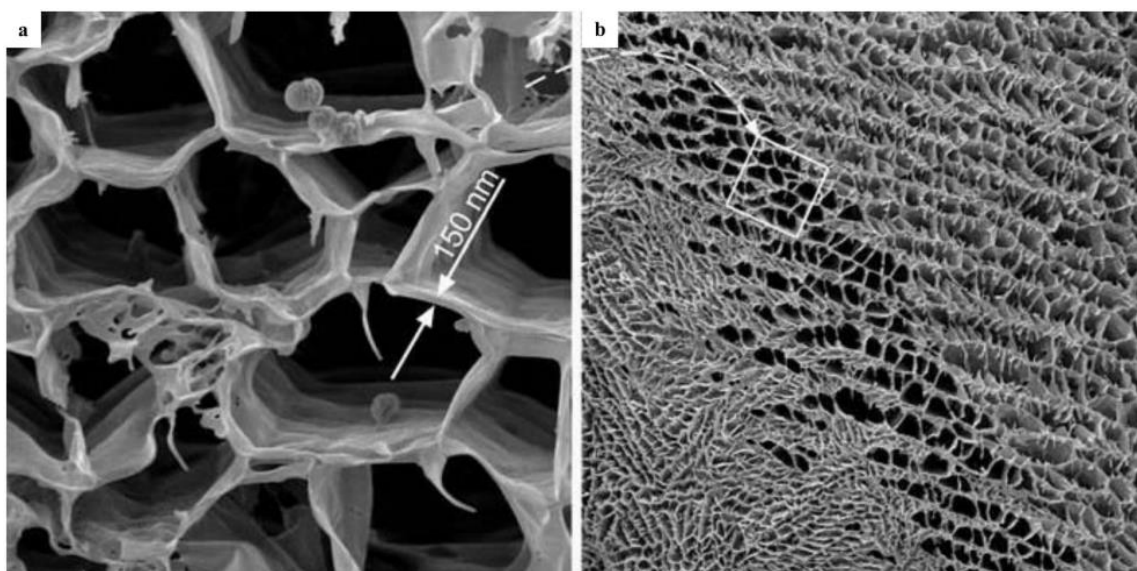


Figure 4. Microstructure (a) et Macrostructure (b) du biofilm de *Staphylococcus epidermidis*. (Costerton, 2007).

7. Ubiquité des biofilms

Du fait de leur nature ubiquitaire, les biofilms peuvent être utiles voir même nécessaires comme ils peuvent être source de problèmes, parfois ils se développent dans des endroits où leur présence n'est pas souhaitée et deviennent problématiques notamment dans le domaine médical, industriel ou dans l'environnement (Beech et Sunner, 2004 ; Dobretsov *et al.*, 2009).

7.1. Dans l'environnement

Les biofilms sont présents partout dans l'environnement, d'ailleurs 80 % de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme d'un biofilm. Ils peuvent se former sur des surfaces biotiques ou abiotiques d'une grande diversité (**Roux et Ghigo, 2006; Remy, 2015 ; Baudin, 2017**).

Les biofilms jouent un rôle écologique capital et contribuent très largement au bon fonctionnement de la plupart des écosystèmes mais le plus souvent inoffensifs (**Roux et Ghigo, 2006; Klein, 2011; Payet, 2017**).

Les biofilms se trouvent dans les sols, les eaux et même dans l'air où les bactéries forment des biofilms naturellement (**Pantaléon, 2015; Baudin, 2017**). En particulier, les biofilms jouent un rôle fondamental dans le recyclage de la biomasse des sols sur terre. Ils permettent la décomposition de la matière organique, sont impliqués dans les cycles biogéochimiques de la plupart des éléments, entrent en jeu dans de nombreux processus tels que l'oxydation, la réduction, l'incorporation, la dégradation, la minéralisation, la conversion ou encore le recyclage des éléments (**Baudin, 2017**).

Dans les environnements terrestres en contact avec l'eau, la grande majorité des microorganismes se développent sur les surfaces immergées au sein de biofilms. On trouve ainsi des biofilms sur les roches des lacs, dans le fond des rivières, les fonds marins abyssaux et même aux interfaces air-liquide des eaux stagnantes. Ils participent également aux processus des écosystèmes immergés. En effet, ils jouent des rôles dans la modification physique et chimique des micro-habitats des cours d'eau, notamment par la rétention de particules en suspension (**Battin et al., 2003**).

7.2. Dans le domaine industriel

Les biofilms sont partout, sur le béton, le métal, les tuyaux, les circuits de distribution et d'épuration de l'eau, les machines dans les entreprises alimentaires (ex : laiterie) ou pharmaceutiques (**Gutierrez et al., 2012; Lin et al., 2014; Inkinen et al., 2014**).

7.3. Chez l'homme

Les biofilms chez l'homme se rencontrent en deux endroits : autour de lui dans ses lieux de vie, et sur lui dans sa flore endogène (**Baudin, 2017**).

Les biofilms naturellement développés sur l'homme constituent sa flore endogène. On parle de microbiote. Ils ont notamment une fonction protectrice et sont une barrière biologique prévenant la prolifération de microorganismes pathogènes et/ou opportunistes. Ils

sont rencontrés ainsi à la surface de la peau, dans la bouche ou encore au sein des appareils des grandes fonctions biologiques (systèmes digestif, respiratoire et urogénital) (**Reid et al., 2001 ; Baudin, 2017**).

Les biofilms se retrouvent dans les pièces à plus haut taux d'humidité et notamment dans la cuisine, les salles de bains (sont des milieux propices pour la formation de biofilm), robinets, siphons, pommeaux de douches, jouets de bain, porte-savons et brosses à dents (**Eise et al., 2003 ; Sammons et al., 2004**). Il est en effet estimé que des biofilms, comprenant notamment les espèces bactériennes *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*, se forment sur plus de 38% des brosses à dents (**Abubakar et al., 2013**).

7.4. Dans le domaine médical

En santé humaine, il a été montré que les biofilms sont associés à des problèmes majeurs de santé publique et sont impliqués dans un large éventail de maladies infectieuses qui touchent majoritairement les personnes légèrement ou fortement immunodéprimés ou porteurs de prothèses médicales (**Tasse, 2017**).

7.4.1. Les infections dues aux biofilms

La majorité (65%) des infections humaines sont causées par des biofilms, souvent responsables du caractère chronique de l'infection (**Hall-Stoodley et al., 2004 ; Roux et Ghigo, 2006 ; Simain et al., 2010 ; Harriott et Noverr, 2011**).

Les principales infections associées aux biofilms sont liées d'une part à la colonisation de dispositifs médicaux (DM) même si les techniques aseptiques sont scrupuleusement respectées, le développement du biofilm est rapide et inéluctable sur la plupart des matériaux utilisés en médecine humaine telles que les cathéters sanguins, prothèses, sondes urinaires ou trachéales ou encore les valves cardiaques (**Ebrej et al., 2004**). Et d'autre part à des pathologies chroniques comme l'endocardite infectieuse, la mucoviscidose, les infections urinaires ou de plaies, et les pathologies buccodentaires (**Hojo et al., 2009; Barakat et al., 2014; Arciola et al., 2015**).

Les microorganismes associés à ces infections sont le plus souvent *P. aeruginosa*, *S. aureus* ou encore *E. coli*. Ce n'est donc pas sans raison que ces bactéries sont au centre de la majorité des études portant sur la compréhension du mode de vie en biofilm (**Salaün, 2015**).

Les conséquences de ces infections peuvent aller de l'infection urinaire jusqu'à la septicémie. Malheureusement, ces infections sont d'autant plus difficiles à combattre que les

bactéries associées en biofilm sont résistantes aux antibiotiques (ATB) et aux défenses de l'hôte (Fux *et al.*, 2004).

7.4.2. Protection vis-à-vis du système immunitaire

Lors de maladies liées aux biofilms, les défenses de l'hôte ne sont souvent pas assez efficaces pour les éliminer. Les biofilms sont protégés vis-à-vis du système immunitaire des hôtes infectés par leur taille qui est tout d'abord un frein important au processus de phagocytose et par la matrice extracellulaire qui empêche la reconnaissance des antigènes bactériens par les anticorps qui éliminent alors uniquement les bactéries détachées du biofilm et ils ne peuvent pas accéder aux bactéries à l'intérieur du biofilm et peuvent endommager les tissus voisins (Percival et Bowler, 2004 ; Roux et Ghigo, 2006 ; Klein, 2011).

7.4.3. L'antibiothérapie et les biofilms

Les infections associées aux biofilms sont plus difficiles à traiter que les infections classiques (Anderl *et al.* 2000; Boles *et al.* 2004).

Une fois les biofilms installés des doses ATB, de l'ordre 100 à 1000 fois supérieures aux doses usuelles, sont nécessaires pour éliminer la biomasse principale, ce qui représente des doses imprescriptibles en antibiothérapie qui devient inefficaces pour les éradiquer et souvent les symptômes réapparaissent, signant une rechute. Ainsi des infections peuvent persister des années au sein d'un organisme (Klein, 2011 ; Badel-Berchoux *et al.*, 2017).

8. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm

8.1. Caractéristiques de la surface

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des micro-colonies est importante car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée. Néanmoins, certaines souches sauvages de bactéries colonisent aussi des surfaces lisses (Donlan, 2002 ; Dolan et Costerton, 2002).

Les propriétés physicochimiques 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 (Donlan, 2002 ; Hall-Stoodley et Stoodley, 2002).

8.2. Caractéristiques du milieu

On peut citer les facteurs suivants: température, pH, concentration en oxygène, concentration en fer, osmolarité, présence d'ions spécifiques, sources de carbone disponibles, concentrations en nutriments (Martinez et Casadevall, 2007; Spormann, 2008).

8.3. Propriétés des cellules

L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de fimbriae, de flagelles, de curli, la production d'exopolysaccharides et certaines protéines influencent l'attachement des bactéries sur une surface (Liu et Tay, 2002; Palmer *et al.*, 2007 ; Goller et Romeo, 2008).

9. Les mécanismes régulateurs de la formation de biofilms

9.1. Le quorum sensing

Au sein d'un biofilm, les microorganismes communiquent entre eux par des signaux de cellules à cellules. Ces derniers, appelés « Quorum Sensing » (QS), jouent un rôle important dans le développement et la régulation de la formation des biofilms. Ces mécanismes sont basés sur le principe de masse critique. Une fois que les signaux atteignent une valeur seuil, des régulateurs transcriptionnels sont activés et exercent un contrôle sur des gènes spécifiques. Ces gènes impliqués dans les mécanismes de QS entraînent des répercussions sur les stades tardifs de formation des biofilms (Tomlin, 2005 ; Irie et Parsek, 2008).

Il existe plusieurs classes de molécules du QS, qui se différencient selon les types de bactéries. En général, on trouve des acyl-homosérines lactones (AHL) chez la plupart des bactéries à Gram négatif. La majorité des bactéries à Gram positif utilisent des peptides auto-inducteurs (Schauder *et al.*, 2001; Irie et Parsek, 2008).

Le QS régule la physiologie du biofilm en modulant la taille de la population du biofilm, il initie les phénomènes de dispersion. Il aurait aussi un rôle dans la détermination de l'épaisseur du biofilm. Il peut réprimer ou stimuler l'expression de certains caractères, comme par exemple la motilité ou certains facteurs de virulence extracellulaires, comme les protéases. Le QS jouerait aussi un rôle dans l'établissement d'antibiorésistance (Queck *et al.*, 2006; Irie et Parsek, 2008).

9.2. Régulation génétique par les cellules fixées

Après fixation sur un substrat, l'expression d'un certain nombre de gènes est régulée par les cellules fixées. Cette régulation peut être de type inhibiteur ou stimulateur. Elle va entraîner une modification phénotypique des bactéries et avoir pour conséquence la formation d'un biofilm. Au cours de la formation d'un biofilm, 22% des gènes sont stimulés et l'expression de 16% des gènes est inhibée (Becker *et al.*, 2001; Donlan, 2002).

10. Avantages conférés par le mode de vie biofilm

La vie en biofilm, en communauté, permet aux bactéries de créer leur propre niche écologique au sein de leurs exo-produits. Cet écosystème a l'avantage majeur de protéger les bactéries contre des conditions environnementales défavorables, et de plus leur confère une coopération dans certains systèmes cataboliques, une synergies entre microorganismes, une expressions phénotypiques de facteurs de résistance lors de situations de stress (Hahn et Höfle, 2001; Jefferson, 2004; Matz *et al.*, 2005 ; Tomlin *et al.*, 2005 ; Jouenne, 2008).

10.1. Avantages métaboliques

La croissance bactérienne en biofilm permet l'acquisition d'avantages métaboliques par l'action synergique des différentes espèces bactériennes. Les bactéries du biofilm accèderaient plus facilement aux nutriments circulant entre les colonies, et qui sont concentrés par les EPS que les bactéries planctoniques (Branda *et al.*, 2005; Roux et Ghigo, 2006).

L'organisation structurée en communauté des biofilms permet l'optimisation des mécanismes de capture et d'échange de nutriments, de métabolites et l'évacuation de métabolites toxiques et ainsi la réalisation d'économies énergétiques et de réserves, de plus permet aux microorganismes de coopérer pour dégrader certains nutriments complexes. Les métabolites de certains microorganismes peuvent également être utilisés par d'autres microorganismes comme nutriments (Sutherland, 2001; Branda *et al.*, 2005; Tomlin *et al.*, 2005 ; Klein, 2011).

Donc, l'hétérogénéité métabolique de la population bactérienne due à l'accumulation de multiples micro-niches, participe sans doute largement aux propriétés de récalcitrante et de persistance (Tomlin *et al.*, 2005).

10.2. Protection mécanique et résistance aux stress extérieurs

Le mode de vie en biofilm est accompagné de la sécrétion d'une matrice exopolymérique constituant une gangue stabilisatrice et protectrice vis-à-vis d'un certain

nombre de facteurs d'agression environnementaux comme les changements de pH, stress oxydatif, irradiation UV, hautes températures, hyper-osmolarité, manque de source carbonée, dessiccation, forces de cisaillement, etc. Ces situations entraînent des modifications de l'expression du génome qui va ainsi engendrer des modifications phénotypiques importantes du biofilm (**Sutherland, 2001; Martínez et Casadevall, 2007; Clutterbuck *et al.*, 2007; Spormann, 2008 ; Bezoui, 2016**).

La matrice assure aussi une protection mécanique contre l'entrée dans le biofilm de biocides tels que des antiseptiques, des détergents et des ATB. La nature de la matrice, en hydrogel, induit une diminution des cibles accessibles pour les ATB et une réduction de la diffusion des plus grosses molécules (**Gilbert *et al.*, 2002, Simoes *et al.*, 2009**).

CHAPITRE 2: Les implants médicaux invasifs

1. Définition d'un dispositif médical

Un dispositif médical (DM) est tout instrument, appareil, équipement, matière, produit, à l'exception des produits d'origine humaine, ou autre article seul ou en association, y compris les :

- accessoires et logiciels intervenant dans son fonctionnement, destiné par le fabricant à être utilisé chez l'homme à des fins médicales (**Dubernard, 2009**).
- Tout dispositif, implanté à titre provisoire ou permanent, peut devenir le site d'une éventuelle infection (sonde urinaire, cathéter sanguin, valve cardiaque, prothèse vasculaire ou orthopédique, dispositif intra-utérin,..) (**Florence, 2010**).

2. Les sondes urinaires

2.1. Définition d'une sonde urinaire

Une sonde urinaire (SU), un instrument médical, est appelée souvent « dispositif », elle est utilisée chez l'homme et chez la femme pour vider la vessie en insérant dans l'appareil urogénital du patient jusqu'elle atteint la vessie sans avoir à déplacer physiquement et pour injecter un médicament ou bien diagnostiquer l'état de vessie (**Figure 5**) (**Elves et Fneley, 1997**).

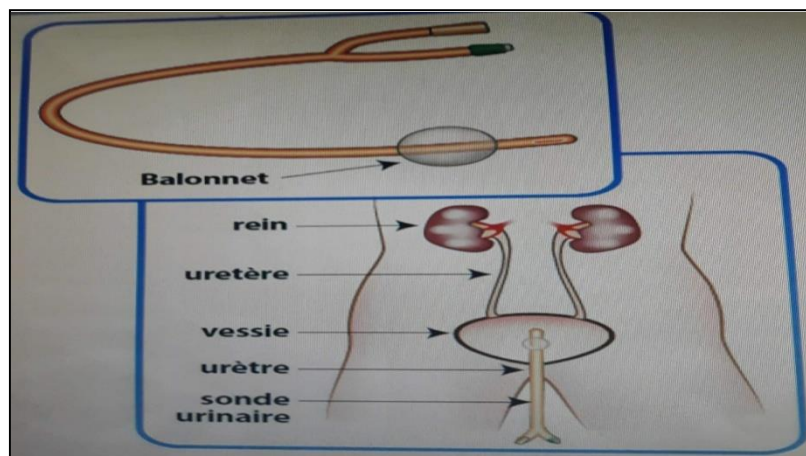


Figure 5. Photo d'une sonde urinaire (**Hélène et Nathalie, 2017**).

2.2. Les infections urinaires associées aux soins

Elle exclut désormais la bactériurie asymptomatique (ou colonisation) du champ de l'IN. L'IU associe la présence de signes cliniques et/ou fonctionnels (fièvre > 38°C, impériosité mictionnelle, pollakiurie, brûlure mictionnelle, ou douleur sus-pubienne) en l'absence d'autre cause, infectieuse ou non, à des critères biologiques définissant une uroculture positive (**Florence et al., 2010**).

Une IU est dite nosocomiale lorsqu'elle est acquise dans une structure de soins (apparaît après les 48 premières heures) ou d'une manière plus générale reliée à la prise en charge du patient, et n'existait pas à l'admission, mais 66% d'entre elles sont d'origine endogène favorisée par le sondage (**Elie, 2010 ; Maitre, 2012**).

80 % des infections urinaires nosocomiales (IUN) sont sur SU, et les 20% restants sont ressortent de manœuvres urologiques plus spécialisées acquise à l'hôpital (**Martine et Henry, 1997 ; Maitre, 2012**).

2.3. Physiopathologie des infections urinaires associées au sondage urinaire

L'arbre urinaire est normalement stérile, à l'exception de la flore des derniers centimètres de l'urètre distal où il est colonisé par la flore digestive (Entérobactéries, Streptocoques, anaérobies), la flore cutanée (Staphylocoques à coagulase négative, Corynébactéries) et la flore génitale (Lactobacilles chez la femme) (**Maillet, 2013**).

Le concept de bactériurie asymptomatique est indissociable de celui de colonisation et correspond à la même entité sans le rattacher à une notion de seuil (UFC/ml). Le terme de colonisation est préférable à celui de bactériurie asymptomatique (**Spilf et Afu, 2002**).

2.4. Les voies de contamination des sondes urinaires

Trois modes d'acquisition des microorganismes par voie ascendante ont été décrits, pouvant s'associer chez un même patient sondé (**Figure 6**) (**Spilf et Afu, 2002 ; Florence et al., 2010**) :

- **Au moment de l'insertion de la sonde** (**Jamil et al., 2001**).
- **Par migration extraluminale :**

Dont le biofilm se développant sur la surface externe de la sonde, de microorganismes préférentiellement endogènes, à partir du méat urinaire vers l'urètre et la vessie, ou introduits dès la manœuvre invasive (**Florence et al., 2010**).

- **Par migration intraluminale :**

Quand des microorganismes pénètrent à l'intérieur du système de drainage fermé ou « système clos » : en cas de reflux des urines collectées vers la vessie au moment de la mobilisation du patient par exemple, ou lors de la violation du système de drainage au niveau de la connexion sonde-collecteur à urine, ou lors de la vidange sans précautions du collecteur : il s'agit alors d'une transmission croisée de microorganismes d'origine exogène, véhiculés par les professionnels de santé (manuportage) et pouvant diffuser selon un mode épidémique (Florence *et al.*, 2010).

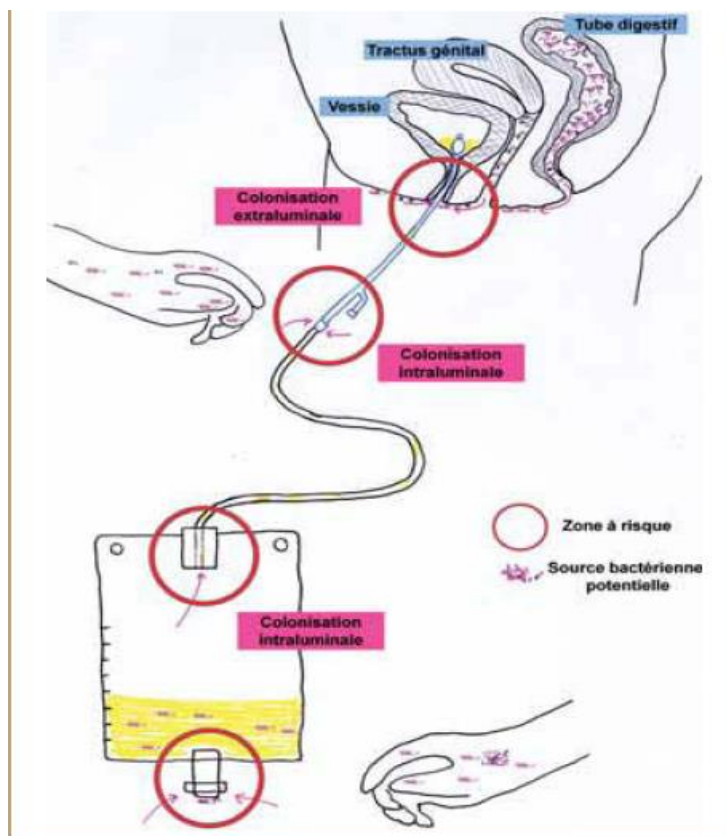


Figure 6 : Sondage vésical : principales voies d'acquisition des microorganismes (Florence *et al.*, 2010).

2.5. Biofilms sur sondes urinaires

Le biofilm microbien s'installe en 24 à 72 heures après la pose de la sonde. Si certaines espèces bactériennes dotées d'une uréase (*Proteus* sp., *Providencia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) sont présentes dans le biofilm, elles hydrolysent

l'urée en ammoniac libre induisant une augmentation du pH urinaire et la précipitation de minéraux sous forme de cristaux de struvite ou d'hydroxyapatite qui s'incrustent sur la sonde.

L'incrustation qui siège autour du ballonnet et dans la lumière de la sonde entraîne une réduction du canal de drainage et une stagnation des urines, favorisant ainsi la survenue de bactériurie. C'est une particularité du biofilm des sondes vésicales. (Florence *et al.*, 2010).

2.6. Microbiologie des infections urinaires associées au sondage urinaire

Les microorganismes les plus fréquemment à l'origine des IU sur SU restent dans 60 % des cas les entérobactéries de la flore digestive du patient, native ou modifiée par l'exposition à une antibiothérapie, ou par transmission croisée, avec prédominance d'*E. coli*.

Dans les réanimations, après les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* (16 %), *Candida* (15 %) et les entérocoques (12 %) occupent une place non négligeable. Lors des sondages de longue durée (> 30 jours), il existe de façon constante une bactériurie élevée (≥ 105 UFC/mL), et polymicrobienne (2 à 5 espèces) dans 80 % des cas (Florence *et al.*, 2010).

2.7. Prévention des infections urinaires associées au sondage urinaire

- **Éviter le sondage vésical abusif :**
 - Restreindre aux indications pertinentes en hospitalisation ou en péri-opératoire.
 - Préférer les alternatives au sondage (mesures du résidu vésical par échographie, sondage évacuateur intermittent, étui pénien, cathéter sus-pubien).
 - Veiller à l'ablation précoce de la sonde en utilisant des actions mnémotechniques (Florence *et al.*, 2010).
- **Appliquer les protocoles d'insertion et de maintenance des sondes.**
 - Poser la sonde dans des conditions d'asepsie rigoureuse.
 - Utiliser un système de drainage clos pendant toute la durée du sondage (pas de déconnexion).
 - Le changement systématique de la sonde vésicale n'est pas une mesure de prévention et n'est pas recommandé
 - Lavage des mains avant l'insertion de la SU (Florence *et al.*, 2010 ; Floriane et Emmanuelle, 2014).

3. Le cathéter veineux

3.1. Définition d'un cathéter

Les cathéters veineux courts sont, selon la norme AFNOR NF S 90- 040, des «tubes en matière plastique ou en élastomère, d'une longueur inférieure ou égale à 80 mm, introduits par effraction dans le système vasculaire pour une durée limitée dans le temps ».

Le cathéter est composé d'un élément souple ou rigide introduit dans la veine et d'une embase sur laquelle se connecte le dispositif de perfusion ou « ligne veineuse».

Il existe des cathéters de longueur et de diamètres différents. L'embase des cathéters peut ou non comporter une ailette ou un site d'injection. Des dispositifs métalliques ou « aiguilles épicroâniennes » sont également utilisés pour permettre des prélèvements sanguins intermittents ou des injections médicamenteuses répétées ; ces dispositifs épicroâniens destinés à être introduits dans une veine sont non réutilisables.

Le dispositif de perfusion est composé de la tubulure de perfusion et de ses annexes: prolongateur, robinet et rampe (**Figure 7**) (**Hajjar et al., 2005**).

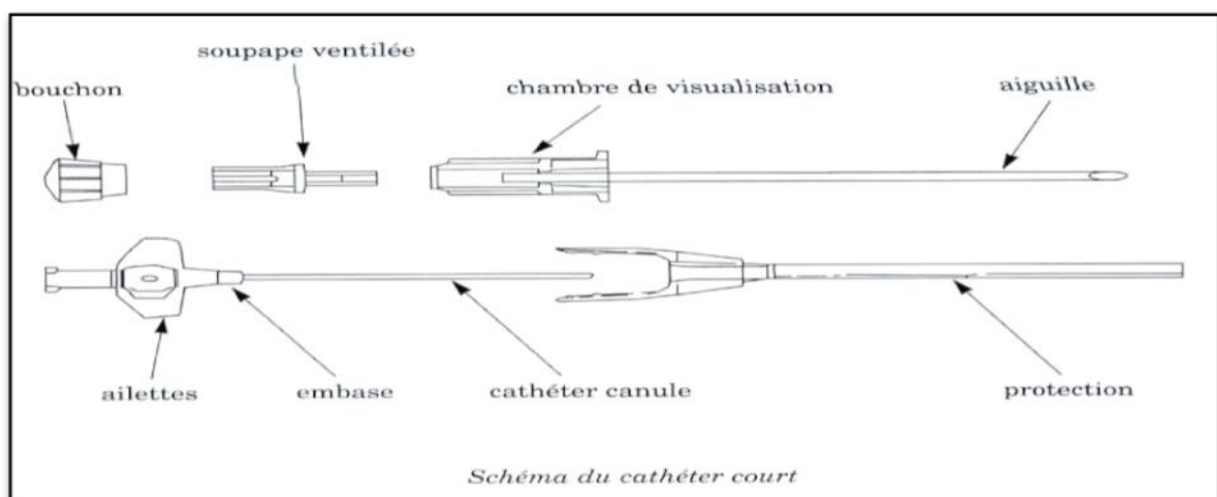


Figure 7 : Schéma d'un cathéter veineux (**Hajjar et al., 2005**).

3.2. Les différents types de cathéters

Il existe plusieurs types de cathéters vasculaires, les plus importants sont trois détaillés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1. Les différents types de cathéters (Cagny, 2014).

Type de cathéters vasculaire	Site anatomique d'insertion et spécificités éventuelles	Durée moyenne de maintien habituellement observée
Cathéter artériel périphérique (CAP)	Artère radiale ou fémorale. Monitoring des paramètres hémodynamiques et accès vasculaire pour prélèvements répétés de gaz du sang	Courte
Cathéter veineux périphérique (CVP)	Veines de l'avant-bras, de la main ou du pied chez le nouveau-né	Très courte 2 à 4 jours
Cathéter veineux central (CVC)	Inséré dans des conditions d'asepsie chirurgicale dans la veine sous-clavière, jugulaire interne, ou fémorale	Courte

3.3. Les infections liées aux cathéters

On définit une infection liée au cathéter (ILC) par la présence de microorganismes à la surface interne et/ou externe du cathéter, responsables d'une infection locale et/ou générale. Sur le plan physiopathologique, l'ILC est précédée par la colonisation de l'extrémité distale du cathéter par des bactéries (Carrière et Marchandin, 2001).

3.4. Les principales voies de contamination du cathéter

Il est classique de définir trois voies de contamination du cathéter:

- **Contamination de la face externe du cathéter :**

Elle peut survenir au moment de la pose du cathéter. Toutefois, le plus souvent, on observe une colonisation sous-cutanée secondaire du cathéter. Dans les deux cas, la contamination se fait à partir de germes provenant du point d'entrée cutané du cathéter. Cette flore peut être la propre flore cutanée du patient ou une flore ayant colonisé son revêtement cutané (mains du personnel soignant).

Cette voie de contamination dite extra-luminale serait la plus fréquemment rencontrée. (Florence *et al.*, 2010).

- **Contamination de la lumière interne du cathéter :**

Elle survient lors des manipulations des raccords à l'occasion des divers branchements, ceux-ci étant colonisés soit par la flore cutanée du patient par contiguïté, soit par le personnel soignant.

Cette voie de contamination dite endo-luminale serait surtout en cause avec les cathéters centraux de longue durée et, en particulier, ceux pour nutrition parentérale, chimiothérapie et hémodialyse (Florence *et al.*, 2010).

- **Colonisation de la portion intravasculaire du cathéter :**

Elle survient à partir d'un foyer infectieux situé à distance, au cours d'une bactériémie ou d'une septicémie. Cette voie de contamination hématogène est rare (Florence *et al.*, 2010).

La **figure 8** Représente schématiquement l'ensemble des voies de contamination des cathéters.

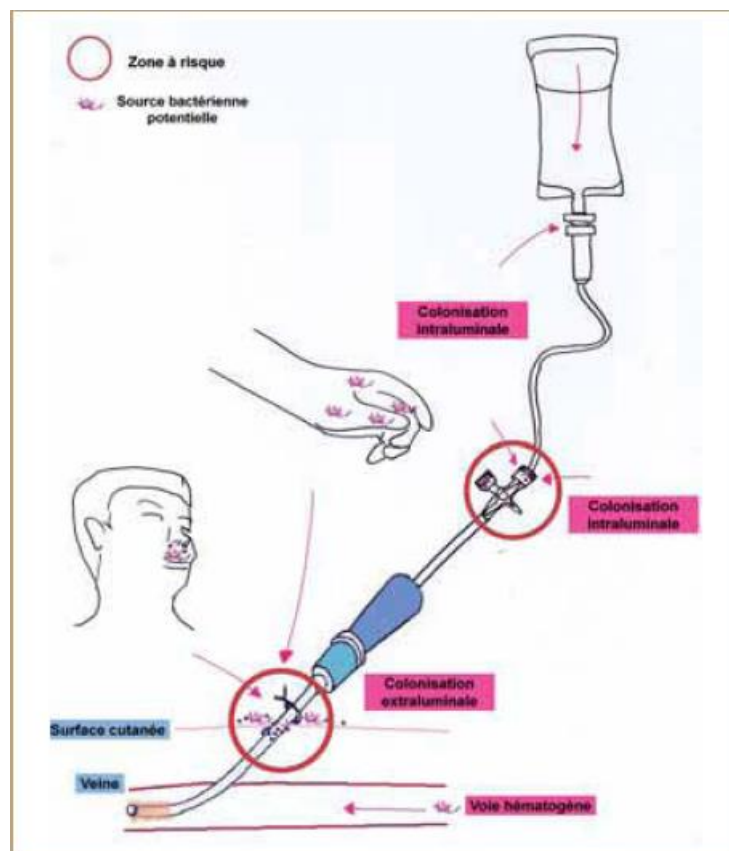


Figure 8. Les principales voies d'acquisition des microorganismes sur cathéters (Florence *et al.*, 2010).

3.5. Biofilms sur cathéters

L'étape initiale des infections sur cathéters intra-vasculaires serait le dépôt d'un film protéique et plaquettaire à la surface du cathéter. Ce film favoriserait l'adhésion et l'accumulation secondaire de microorganismes, de protéines et de plaquettes.

Trois facteurs entreraient en jeu : l'hôte, chez lequel le déficit de la phagocytose des polynucléaires entraînerait l'incapacité d'éradiquer les germes; le matériel étranger qui servirait d'ancrage aux protéines sériques, et enfin des facteurs liés à la bactérie comme cela a été étudié chez les staphylocoques. Ces bactéries produisent des adhésines, des substances polysaccharidiques favorisant l'adhésion et une substance exopolysaccharidique, le « slime », qui est excrétée lors de la prolifération des staphylocoques adhérant à une surface (**Figure 9**) (**Carrière et Marchandin, 2001**).

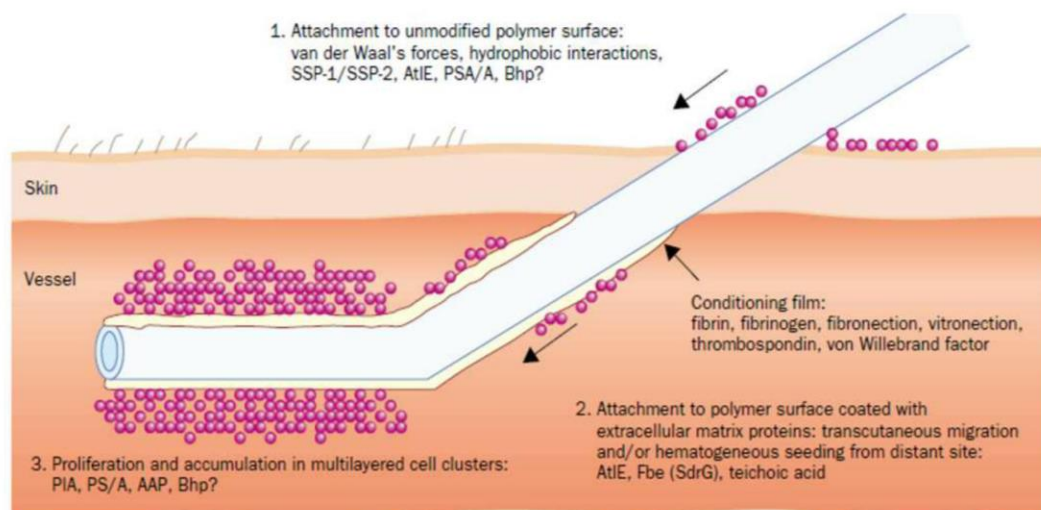


Figure 9. Biofilm de staphylocoque sur cathéters (**Boyer et al., 2013**).

3.6. Microbiologie des infections associées aux cathéters vasculaires

Le profil bactériologique observé dans les ILC est largement dépendant de l'écosystème mis en jeu (**Carrière et Marchandin, 2001**).

Pour les cathéters à émergence cutanée, les microorganismes les plus fréquemment impliqués dans les bactériémies associées sont principalement ceux de la flore cutanée, essentiellement les staphylocoques à coagulase négative (38 %) puis les *Staphylococcus aureus* (27 %), les *Candida* sp. et les entérobactéries.

En réanimation, après les cocci à Gram positif (49 %), entérobactéries (28 %) et *P. aeruginosa* (13 %) occupent une place non négligeable parmi les microorganismes responsables des colonisations des cathéters vasculaire centraux (CVC).

Pour les cathéters implantés chirurgicalement et les cathéters centraux à insertion périphérique, sont isolés par ordre de prévalence, les staphylocoques à coagulase négative, les entérobactéries puis *S. aureus* et *P. aeruginosa* (**Carrière et Marchandin, 2001 ; Florence et al., 2010**).

3.7. Prévention des infections associées aux cathéters

Les infections sur cathéters sont majoritairement d'origine exogène. C'est donc pour ce type d'infections associées aux soins, considérée comme « évitables », que l'efficacité des programmes de prévention est attendue.

Les mesures sont nombreuses, répondant à différents niveaux de preuve selon les études scientifiques qui ont permis de les valider.

Les mesures essentielles sont les suivantes :

- restreindre la pose d'un cathéter vasculaire aux indications pertinentes et en limiter la durée par une réévaluation fréquente (quotidienne pour les cathéters de courte durée) ;
- former les professionnels qui insèrent et entretiennent ces cathéters vasculaires ;
- respecter les conditions d'asepsie recommandées pour la pose et pour la manipulation, et particulièrement la désinfection des mains par friction hydroalcoolique et la préparation cutanée du site d'insertion. Privilégier les sites d'insertion à risque moindre de complications ;
- changer les lignes de perfusion selon les recommandations en vigueur en fonction du type de soluté perfusé (**Carrière et Marchandin, 2001 ; Florence et al., 2010 ; Lebeaux et al., 2014**).

Partie II

Partie pratique

Matériel et Méthodes

I. Matériel et Méthodes

1. Cadre d'étude

Cette étude a été menée au sein de laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Ben Badis de Constantine. Elle a porté sur les différentes souches bactériennes isolées (format des biofilms mixtes), chez les patients porteurs de dispositifs médicaux invasifs (DM), durant la période allant du **1^{er} février au 1^{er} Avril 2018**.

2. Types de prélèvements

Les DM les plus couramment analysés sont : les sondes urinaires et les cathéters veineux. Ces DM font l'objet d'un examen bactériologique afin de rechercher et identifier les bactéries qu'ils portent.

L'examen bactériologique de ces DM nécessite leur ablation préalable dans des conditions d'asepsie rigoureuses. Les parties distales, d'environ 10 cm de longueur, issus de chaque DM ont constituées les échantillons à analyser. Ces échantillons sont transmis au laboratoire sans tard dans des écouvillons stériles et secs.

3. Traitement des échantillons

Le traitement des échantillons nécessite une préalable immersion et incubation dans le bouillon cœur cerveau (BCC) (**Figure 10**). Ce dernier est ajouté à chaque écouvillon contenant l'échantillon à analyser de manière à ce que les parties distales soient complètement immergées. Par la suite, les écouvillons sont incubés à 37 °C pendant 15 minutes.



Figure 10. Echantillon de DM à analyser: Sonde Urinaire.

Après homogénéisation des milieux d'enrichissement, une quantité est prélevée et ensemencée sur la surface des milieux d'isolement à savoir ; la gélose au sang cuit (au chocolat), l'Hektoen et le Chapman préalablement coulés en boîtes de pétri. Les milieux sont ensemencés, en stries serrées sur la surface, de façon à obtenir des colonies bien isolées après une incubation à 37 °C pendant 24 heures.

Des repiquages successifs sont effectués sur les milieux d'isolement d'origine afin de confirmer la pureté des souches pour entreprendre l'étape d'identification.

4. Souches bactériennes

Deux souches cliniques appartenant aux espèces *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* ont été sélectionnées pour cette étude. Ces bactéries ont fait l'objet de tests de biofilms mono-espèces et de biofilms multi-espèces (biofilms mixtes). L'isolement, l'identification et la caractérisation de ces souches ont été réalisés selon les méthodes conventionnelles.

4.1. Isolement et identification de *Pseudomonas aeruginosa*

L'isolement de *P. aeruginosa* a été réalisé après ensemencement de la gélose au sang cuit (au chocolat). Les boîtes sont par la suite incubées à 37°C pendant 24.

L'identification de cette espèce est habituellement facile. Elle est basée essentiellement sur : l'examen macroscopique et l'identification des caractères biochimiques à l'aide de la galerie classique en tube. Cette dernière a été composée des milieux suivants : Mannitol-Mobilité, Citrate de Simmons, le milieu TSI (Triple Sugar Iron Agar) et Urée Indole.

4.2. Isolement et identification de *Klebsiella pneumoniae*

L'isolement de *K. pneumoniae* a été également réalisé sur le milieu Hektoen préalablement coulé en boîte de pétri. Les boîtes ensemencées sont par la suite incubées à 37°C pendant 24.

L'identification et la caractérisation de *K. pneumoniae* a été aussi effectuée après examen macroscopique et l'identification des caractères biochimiques à l'aide de la galerie classique en tube.

4.3. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité de souches vis-à-vis les différentes familles d'antibiotiques (ATB), est testée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) (La

standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale, avec collaboration de l'OMS, 2011). Le **tableau 2** montre la liste des d'ATB testés selon les recommandations du CLSI.

Tableau 2. Antibiotiques testés sur *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*.

N°	ATB testés sur <i>P. aeruginosa</i>	ATB testés sur <i>K. pneumoniae</i>
01	Ticarcilline (TIC)	Amoxicilline (AMX)
02	Pipéracilline (PIP)	Augmentin (AMC)
03	Céftazidime (CAZ)	Bactrim (SXT)
04	Aztréonam (ATM)	Imipenème (IPM)
05	Céfépine (FEP)	Céfotaxime (CTX)
06	Imipenème (IPM)	Colistine (CS)
07	Amoxicilline (AML)	Chloramphénicol (C)
08	Amikacine (AN)	Gentamicine (GM)
09	Tétracycline (TE)	Amikacine (AN)
10	Céfoxitine (FOX)	Céfoxitine (FOX)
11	Céfotaxime (CTX)	Tétracycline (TE)
12	Ciprofloxacine (CIP)	Ciprofloxacine (CIP)

5. Les tests de formation de biofilms en tubes

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine 1.

Afin de mettre en évidence la capacité de formation de biofilm, chez les deux isolats cliniques *P. aeruginosa* (PA) et *K. pneumoniae* (KP) (biofilms mono-espèces), la méthode choisie est la méthode standard de coloration au Cristal Violet (**CV**) (**Djordjevic et al., 2002; Metzler, 2016**). Cette technique permet une évaluation quantitative de la formation de biofilms puisque la coloration adsorbée est directement corrélée à la densité du biofilm formé (**Vieu, 2014**). Elle a été également appliquée à fin de mettre en évidence la formation de biofilms multi-espèces (biofilms mixtes). Ces derniers ont été formés après association entre les deux bactéries *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*.

Deux tubes différents ont été employés comme support à l'adhésion bactérienne et la formation de biofilm à savoir des tubes en polystyrène de capacité maximale de 5 ml et d'autres en verre à vis de 20 ml.

5.1. Cultures bactériennes

Pour la réalisation des tests de formation de biofilms, chaque souche a été préalablement ensemencée sur gélose Luria Bertani (LB agar) (**Annexe 1,2**). Après 24 heures d'incubation à 37°C, des suspensions bactériennes ont été préparées dans le bouillon Luria Bertani (LB broth) (**Annexe 1,3**) et ajustées à une densité optique (DO) 600 nm de 0,20 à l'aide d'un spectrophotomètre.

Un volume maximal de 2 ml issus de ces deux suspensions bactériennes a été ensemencé dans les divers tubes selon les expériences suivantes :

➤ **A fin de réaliser des biofilms mono-espèces (constitué d'une seule bactérie):**

Des tubes ont été inoculés avec 2 ml de la suspension **PA** (Biofilm à 100 % PA) et d'autres 2 ml de la suspension **KP** (Biofilm à 100 % KP) (**Annexe 3**).

➤ **A fin de réaliser des biofilms multi-espèces (association entre les deux bactéries) :**

Des tubes ont été ensemencés avec 1 ml de la suspension PA et 1 ml de la suspension KP (Biofilm à 50 % PA et 50 % KP).

Des tubes ont été inoculé avec 1,5 ml de la suspension PA et 0,5 ml de la suspension KP (Biofilm à 75 % PA et 25 % KP).

Enfin, des tubes ont été ensemencés avec 0,5 ml de la suspension PA et 1,5 ml de la suspension KP (Biofilm à 25 % PA et 75 % KP).

Pour chaque expérience, trois tubes en polystyrène et trois en verre ont été utilisés. L'ensemble des tubes est ensuite incubé à 37°C pendant 24 heures (sans agitation) (**Annexe 3**).

5.2. Test au Cristal Violet

A la fin de la période d'incubation et pour chaque tube, l'absorbance de la culture bactérienne résultante est mesurée à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Après, chaque tube est soigneusement vidé de la culture bactérienne, et rincé 3 fois à l'eau distillée (**ED**).

La biomasse fixée sur les parois du tube est révélée après coloration à l'aide d'une solution aqueuse de CV à 1 % (m/v) (**Annexe 1**). Après un temps de contact d'une heure, l'excès de colorant est éliminé suivi d'un lavage abondant des parois du tube à l'ED (jusqu'à l'obtention des gouttes transparentes). Les tubes sont enfin égouttés et mis à sécher à l'air libre.

Le CV fixé sur les parois des tubes est solubilisé à l'aide d'une solution constituée d'un mélange éthanol-acétone (75 : 25) (**Annex 1**). Après 1 heure du temps, l'absorbance de la solution obtenue est mesurée à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

La figure 11 ci-dessous récapitule les différentes étapes de protocole opératoire.

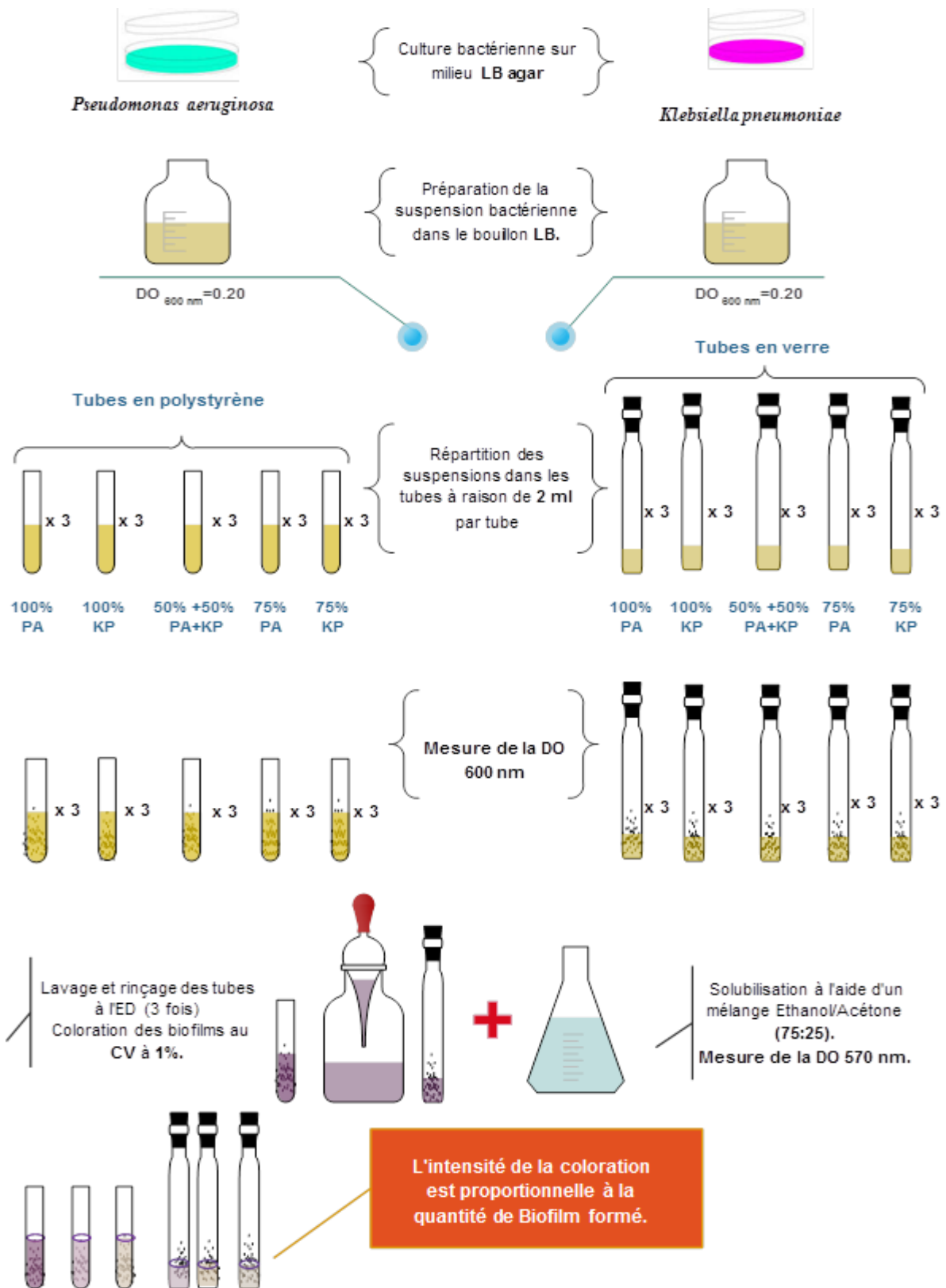


Figure 11. Protocole opératoire de la formation de biofilms mono-espèces et multi-espèces.

Résultats et discussion

II. Résultats et discussion

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 ou d'une sonde vésicale est associée à un risque infectieux non négligeable. La physiopathologie de ces infections est étroitement liée à la constitution d'un biofilm sur ces corps étrangers (**Florence *et al.*, 2010**).

Les biofilms médicaux sont associés à des problèmes majeurs de santé publique et sont impliqués dans un large éventail de maladies infectieuses qui touchent majoritairement les personnes immunodéprimés ou porteurs de dispositifs médicaux (**Tasse, 2017**).

Le lien entre la capacité d'une souche à former un biofilm et sa virulence est souvent présenté comme direct. Au cours de la phase planctonique d'infection, les bactéries libèrent des facteurs de virulence et altèrent les tissus de l'hôte. Une fois dans un environnement adapté, les bactéries peuvent s'implanter et persister sur une surface via l'expression de facteurs impliqués dans la formation de biofilms et dans la virulence (**Roux et Ghigo, 2006**).

1. Isolement et identification de souches bactériennes à partir des dispositifs médicaux

Généralement, le laboratoire de bactériologie reçoit une demande d'analyse d'un DM dans le cas d'une suspicion d'infection liée aux DM. Les infections liées aux DM représentent une proportion non négligeable des IN avec une mortalité significative en réanimation. L'ablation est immédiate d'un DM présumé infecter s'il y a apparition de ; signes locaux francs, signes de gravité ou une infection.

Dans ce présent travail et dans le but d'identifier les différentes bactéries colonisant les surfaces des DM (format des biofilms mixtes), la technique choisie consiste à recueillir l'extrémité distale de DM dans le BCC. Les tubes ont été par la suite incubés pendant 15 minutes dans le but de favoriser la croissance des espèces présentes en faible quantité dans les échantillons. Une goutte a été prélevée etensemencée en surface sur les milieux de culture sélectifs.

Durant la période de 2 mois, différentes espèces bactériennes ont été identifiées, à partir des DM analysés, les plus sujettes à l'analyse bactériologique et les plus susceptibles d'être colonisés, à savoir les sondes urinaires et les cathéters veineux, à l'aide des méthodes conventionnelles d'identification bactérienne.

En effet, les espèces bactériennes identifiées appartiennent à différents genres bactériens soit 100 % des bacilles à Gram négatif et aucun cocci à Gram positif n'a été isolé (Tableau 3). Il s'agit essentiellement d'Entérobactéries et des bacilles non fermentaires.

Tableau 3. Souches bactériennes isolées et identifiées à partir des sondes urinaires et les cathéters veineux

Dispositif médical (DM)	Souches bactériennes formant des biofilms mixtes à double espèces	
	Bactérie 1	Bactérie 2
Sonde Urinaire	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Providencia stuartii</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Providencia stuartii</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>
Cathéter Veineux	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Morganella spp.</i>

D'après Maki et Tambyah en 2001, le risque de développer une infection des voies urinaires augmente de façon significative avec l'utilisation des dispositifs médicaux tels que les sondes urinaires. Les bactéries initiales qui causent les infections associées aux sondes sont habituellement Gram positive *Staphylococcus epidemidis*, et les Gram négatives *Escherichia coli*, ou *Entérocooccus faecalis*. Avec le temps, d'autres espèces apparaissent comprenant *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Porteus mirabilis* et *Providencia stuartii* (Maki et Tambyah, 2001).

D'après Klevins en 2005 et Donlan en 2008, les cathéters veineux centraux sont les implants médicaux les plus à risque par rapport au développement d'une infection nosocomiale. Les micro-organismes en cause proviennent de la flore cutanée du patient, de la micro-flore exogène du personnel hospitalier, ou encore d'environnements contaminés. Les micro-organismes les plus fréquemment isolés sont *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus*

epidermidis, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* et *Klebsiella pneumoniae* (De Chalvet De Rochemonteix, 2009).

1.1. Isolement et identification de *P. aeruginosa* et de *K. pneumoniae*

Le **tableau 4** ci-dessous récapitule les aspects macroscopiques de colonies de *P. aeruginosa* et de *K. pneumoniae* sur les milieux d'isolement ainsi que l'identification biochimique à l'aide de la galerie classique en tube (**Annexe 2**).

Tableau 4. Les résultats d'identification de *P. aeruginosa* et de *K. pneumoniae*

Identification	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Examen macroscopique (Annexe 2)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Colonies grandes, rugueuses convexes et lisses, accompagnées par une odeur caractéristique de seringa. ➤ La couleur du milieu ne change pas; lactose négatives. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Colonies rondes, lisses, bombées, brillantes, muqueuses, parfois filantes à l'anse de platine. ➤ Changement de couleur de milieu; lactose positives.
Identification biochimique (Galerie classique)	<p>Mannitol/mobilité +/+</p> <p>Citrate de Simmons +</p> <p>TSI: (fermentation des sucres / production de Gaz / production de H₂S) -</p> <p>Urée/ Indole +/-</p>	<p>Mannitol/mobilité +/-</p> <p>Citrate de Simmons +</p> <p>TSI: (fermentation des sucres / production de Gaz/ production de H₂S) +</p> <p>Urée/ Indole +/-</p>

1.2. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

La détection des phénotypes de résistance a été réalisée en pratiquant la méthode conventionnelle de diffusion des disques en gélose MH et les critères de lecture et d'interprétation sont ceux du CLSI.

Les profils de résistances déterminés révèlent que les deux souches ; *P. aeruginosa* (PA) et *K. pneumoniae* (KP) présentent deux comportements différents vis-à-vis les divers ATB testés. Effectivement, PA apparaît sensible à l'ensemble des ATB testés à l'exception d'AML, TE, FOX et CTX ou elle montre une résistance face à ces quatre ATB tandis que KP exhibe une résistance exceptionnelle à tout les ATB testés.

Le **tableau 5** et le **tableau 6** ci-dessous détaillent respectivement les profils de sensibilités de *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*.

Tableau 5. Le profil de sensibilité de *P. aeruginosa* aux ATB testés.

Antibiotique	TIC	PIP	CAZ	ATM	FEP	IPM	AML	AN	TE	FOX	CTX	CIP
Sensible (S) Résistante (R)	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S

Tableau 6. Le profil de sensibilité de *K. pneumoniae* aux ATB testés.

Antibiotique	AMX	AMC	SXT	IPM	CTX	CS	C	GM	AN	FOX	TE	CIP
Sensible (S) Résistante (R)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

2. Tests de formation de biofilms en tube

La grande majorité des études sur les biofilms sont réalisées en monoculture, c'est-à-dire que l'on étudie des biofilms formés d'une seule espèce de microorganismes. Néanmoins, dans la nature, les microorganismes sous forme de biofilms sont rarement trouvés sous forme de culture pure ; les biofilms hétérogènes sont prédominants (**Macleane et al., 2004**).

Un nombre important de méthodes permettant la détection et la quantification des biofilms, parmi les quelles, la méthode de coloration des biomasses fixées aux parois des tubes et la quantification du biofilm se fait alors sur la masse formée sur le bord des tubes (**Freeman et al., 1989 ; Stepanovic et al., 2007**).

Plusieurs colorants existent, le plus répandus étant le CV, qui se fixe sur l'ensemble des charges négatives des constituants, provenant aussi bien des bactéries que de la matrice (**Alnasouri, 2010 ; Klein, 2011 ; Tasse, 2017**). Le CV se fixe exactement sur les polysaccharides du peptidoglycane et colore sans spécifier toutes les biomasses. Ce colorant

fait de ce test utile pour estimer la réponse global en mode biofilm d'un isolat (Metzler, 2016). Après un temps de contact, le surplus est éliminé par rinçage. Après remise en suspension, il est possible de quantifier le biofilm formé par simple lecture d'absorbance (Almasouri, 2010; Klein, 2011; Tasse, 2017).

En raison de sa simplicité et sa fiabilité, selon Djordjevic *et al.* (2002), l'étude phénotypique de la production de biofilms par la méthode standard de coloration CV effectuée en tube, a permis une évaluation quantitative de la production et la formation de biofilms par les bactéries (Metzler, 2016).

La bactérie va initialement adhérer sur une surface, se multiplier et produire un biofilm bactérien. Le CV colore les structures polysaccharidiques des bactéries incluses dans le biofilm. Un lavage à l'eau distillée permet d'éliminer l'excès de colorant ainsi que les bactéries planctoniques. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de biofilm produite. Une mesure de la densité optique permet d'avoir une approche quantitative sur la capacité d'une bactérie à produire un biofilm, la coloration adsorbée est directement corrélée à la densité du biofilm formé, et sa solubilisation permet une quantification de celui-ci (Musk *et al.*, 2005; Vieu, 2014).

C'est d'ailleurs pour cette raison, dans cette présente étude, la technique de coloration au CV a été appliquée à fin d'évaluer la capacité de formation de biofilms chez deux bactéries d'intérêt médical à savoir ; *P. aeruginosa* (PA) et *K. pneumoniae* (KP) ainsi que de quantifier la formation de biofilms mixtes constitués par ces deux bactéries. Par ailleurs, une comparaison a été effectuée entre deux supports ; le verre et le polystyrène.

2.1. Tests de formation de biofilms en polystyrène

Après 24 heures d'incubation à 37 °C, la formation des biofilm a été exprimée en absorbances mesurées à 570 nm du colorant incorporé par les cellules formants des biofilms. Afin d'évaluer la proportion de cellules planctoniques, non fixées, les valeurs de densités optiques sont mesurées à 600 nm. La mesure doit se faire avant l'élimination de la culture bactérienne, une étape nécessaire avant d'entamer la coloration au CV.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence la capacité des isolats étudiés à former des biofilms importants sur surface hydrophobe (polystyrène) après culture en bouillon LB (Annexe 3). La formation de biofilm chez PA et KP est caractérisée non seulement par la présence d'un anneau à l'interface air-liquide, mais également par la présence d'un prolongement de la croissance cellulaire au-dessus et en dessous de celui-ci.

La plus grande valeur d'absorbance, pour le biofilm mono-espèce, est notée pour la bactérie PA (DO570= 0,794) en comparaison avec la bactérie KP (DO 570=0,738). En outre et En ce qui concerne les biofilms mixtes, la valeur la plus élevée est enregistrée pour l'association à 50% PA et 50 % KP (DO570=0,852) tandis que la plus faible pour l'association à 75% PA et 25% KP (DO570=0,826). Par conséquent, le biofilm mixte le plus notable est constitué par la moitié de concentrations de PA et KP et que la dominance de KP améliore énormément la formation de biofilm à double espèces en polystyrène.

Les résultats de la formation de biofilms sur polystyrène en bouillon LB et après 24 heures d'incubation sont représentés dans la **figure 12**.

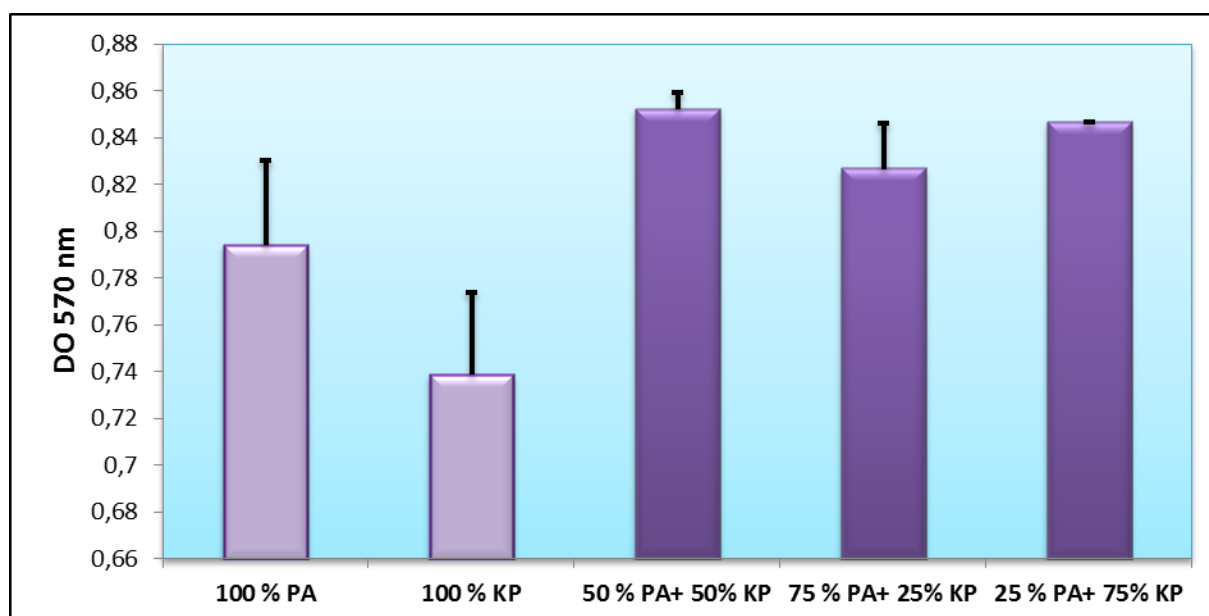


Figure 12. Formation de biofilms de *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* sur polystyrène.

Comme illustre la **figure 13**, les valeurs de DO600 obtenues après 24 heures d'incubation en milieu LB, directement corrélée à la croissance bactérienne des cellules planctoniques, indiquent des variations entre et au sein de chaque test à savoir ; biofilm mono-espèce et biofilm multi-espèces. En effet, des croissances significativement importantes sont marquées pour les associations entre les deux bactéries par rapport aux bactéries cultivées seules. Pour le cas des associations, la valeur la plus élevée est enregistrée pour le cas de la culture à 75% PA et 25% KP (DO600=0,534) et la plus basse pour la culture à 25% PA et 75% (DO600=0,481). Concernant les bactéries cultivées seules, la bactérie KP a donné une valeur importante (DO60=0,488) par rapport à la bactérie PA (DO600=0,443).

Le bouillon LB est largement utilisé pour la culture et la croissance des bactéries, c'est un milieu riche en éléments nutritifs et permet la croissance d'une grande variété de microorganismes. D'après nos résultats, la souche PA, étant la bonne formatrice de biofilm à mono-espèce, enregistre le taux de cellules planctoniques le plus faible alors que la souche KP étant la faiblement formatrice ayant un taux de croissance le plus élevé. Ces chiffres indiquent que la proportion de cellules non fixées est variable d'une souche à l'autre et elle montre également une relation inverse entre la formation de biofilm et la croissance planctonique. Cette variabilité peut être en relation avec la capacité de chaque souche à adhérer sur polystyrène (surface hydrophobe) et former un biofilm. En plus, les bactéries non adhérentes sont relarguées au milieu et augmentent les absorbances des cellules planctoniques.

Une relation inversement proportionnelle entre les cellules planctoniques et les cellules sessiles a été aussi identifiée dans le cas de biofilm mixte. Par conséquent, la proportion des cellules non fixées la plus élevée correspond à la formation de biofilm la plus faible.

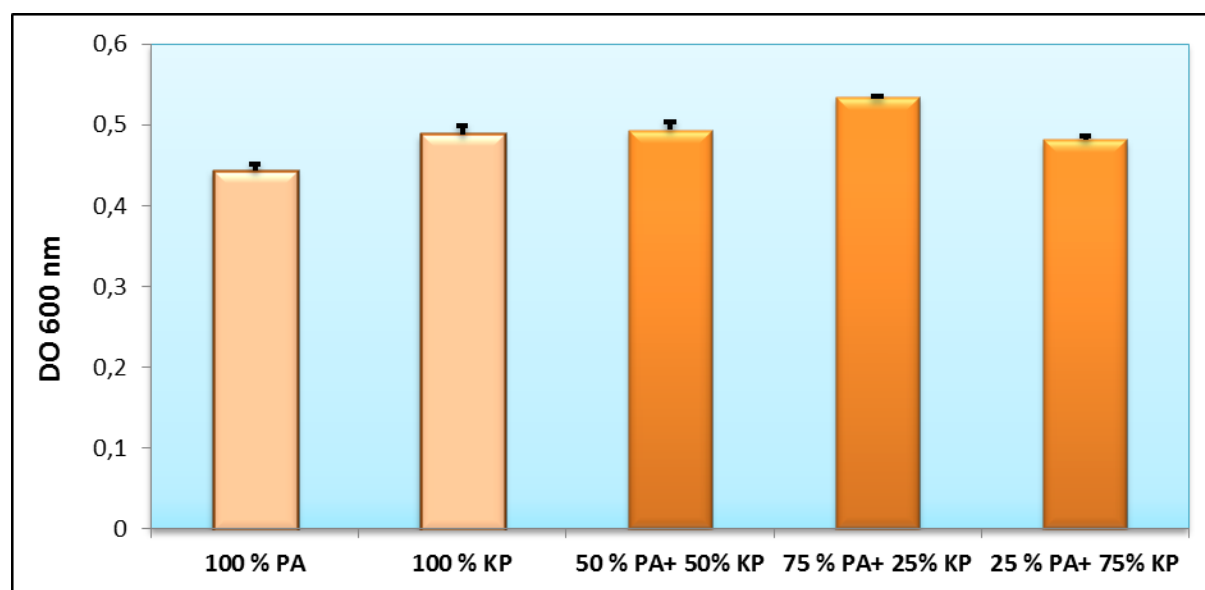


Figure 13. Croissance de *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* en bouillon LB sur polystyrène.

2.2. Tests de formation de biofilms en verre

Après culture en milieu LB, les données enregistrées ont également permis de mettre en évidence l'aptitude des bactéries étudiées à former des biofilms significativement plus importants sur surface hydrophile (le verre) en comparaison avec le polystyrène (Annexe 3).

La **figure 14** montre qu'en mode de biofilm mono-espèce, PA reste toujours la bonne formatrice de biofilm avec une valeur de $DO_{570} = 0,761$ contre KP qui a enregistré une $DO_{570}=0,741$.

De même, le profil de formation de biofilm mixtes sur le verre présente des différences minimales par rapport à celui obtenu avec le polystyrène. Contrairement au polystyrène, les concentrations égales de bactéries génèrent le biofilm le plus faible et la dominance de KP augmente pareillement la production de biofilm avec une valeur de $DO_{570}=0,894$ au regard de la dominance de PA avec une DO_{570} de 0,832.

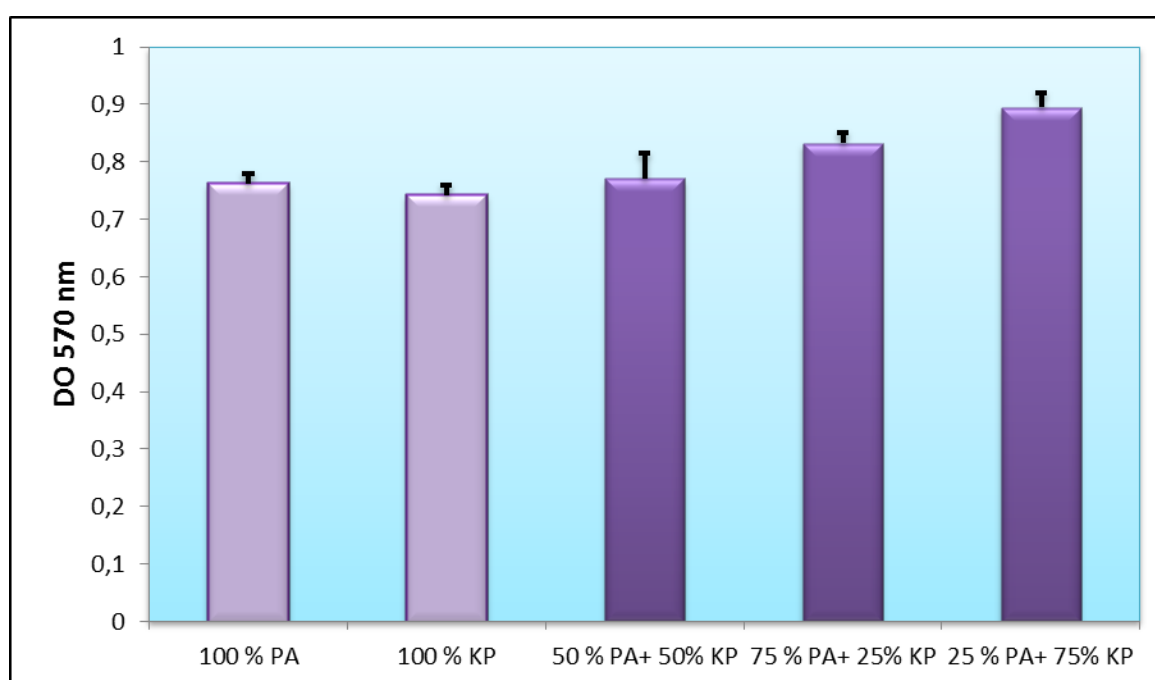


Figure 14. Formation de biofilms de *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* sur le verre.

Comme représenté dans la **figure 15**, les valeurs de DO_{600} obtenues après 24 heures d'incubation en milieu LB pour le verre montrent pour les biofilms mono-espèces un comportement semblable que celui observé avec le polystyrène. En effet, la valeur la plus élevée est notée pour KP ($DO_{600}=0,699$) à l'inverse de PA qui a enregistré la valeur la plus faible avec une absorbance de 0,675. Par conclusion, le taux de croissance de KA était toujours plus élevé que celui de PA dans des conditions de croissance planctonique.

En outre, des croissances relativement plus importantes sont également marquées pour les associations entre les deux bactéries par rapport aux bactéries cultivées seules mais

avec un comportement assez différent de celui avec le polystyrène. En effet et pour le cas des associations, la valeur la plus élevée est enregistrée pour le cas de la culture à 25% PA et 75% KP (0,791) et la plus basse pour la culture à 75% PA et 25% KP (0,671).

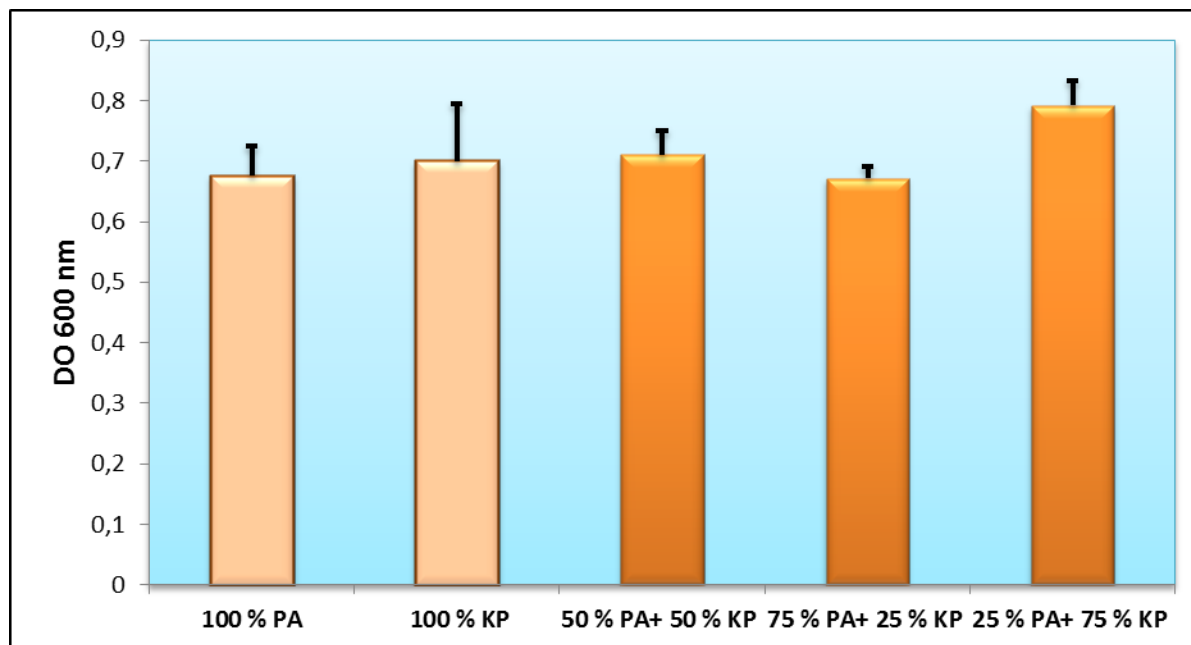


Figure 15. Croissance de *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* en bouillon LB sur le verre.

La plupart des biofilms naturels sont composés de plusieurs espèces microbiennes (Luca *et al.*, 2014). Des interactions telles que la compétition, le commensalisme, le mutualisme et le parasitisme sont courantes entre les membres de la communauté au sein d'un biofilm d'espèces mixtes, ce qui améliore la survie des microorganismes. Plusieurs chercheurs ont également signalé que les bactéries qui sont incapables de former elles-mêmes un biofilm peuvent former en synergie un biofilm avec d'autres espèces bactériennes (Dingding *et al.*, 2006 ; Chhibber *et al.*, 2015).

Les conditions qui permettent la formation d'un biofilm mixte ne sont pas clairement établies. Il a été suggéré que la mixité des populations est en partie dépendante de la nourriture. Ainsi, en présence de chlorobiphényle comme source de carbone, *Pseudomonas putida* peut se nourrir des métabolites produits par *Burkholderia*, et les deux espèces forment un biofilm mixte. En revanche, en présence de citrate, utilisable par les deux espèces, chacune formera son propre biofilm avec une structure radicalement différente (Filloux et Vallet, 2003).

On distingue différents types d'interactions qui ont des effets positifs ou négatifs pour les membres de la communauté bactérienne. On peut citer comme exemple bénéfique la

coopération dans les systèmes de dégradation de certains nutriments complexes, ou encore la production d'enzymes profitables à l'ensemble de la communauté de microorganismes (Tomlin *et al.*, 2005). A l'opposé, les différentes colonies de microorganismes occupant une même niche écologique entrent en compétition pour l'acquisition des ressources se trouvant dans le milieu. Deux mécanismes de compétition entre bactéries est la production de bactériocines et la baisse du pH (Irie et Parsek, 2008).

P. aeruginosa est un organisme omniprésent capable de former des biofilms sur de nombreuses surfaces biotiques et abiotiques et provoquant une grande variété d'infections parmi les quelles celles attribuées aux DM contaminés. Elle fait partie des bactéries modèles les plus étudiées dans le contexte de biofilm (Roux et Ghigo, 2006; Rochemonteix, 2009 ; Brandon *et al.*, 2013).

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).

K. pneumoniae et *P. aeruginosa* sont deux organismes formant des biofilms qui peuvent coexister lors d'infections des voies urinaires, des voies respiratoires et des brûlures et associés à des corps étrangers (Brandon *et al.*, 2013; Childers *et al.*, 2013).

Suivant les données de ce travail, l'association entre plusieurs bactéries engendre des biofilms considérables par rapport à ceux formés d'une seule bactérie. En détail, les résultats obtenus, indiquent que *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* sont capables de former des biofilms mixtes *in vitro* dont leurs densités sont non négligeables sur les deux supports ; le polystyrène et le verre malgré les légères modifications entre les deux. Nos résultats sont en bon accord avec ceux obtenus par plusieurs études (Stewart *et al.*, 1997 ; Brandon *et al.*, 2013 ; Chhibber *et al.*, 2015).

Cette association entre les deux bactéries est possible malgré la nature antagoniste de *P. aeruginosa* avec d'autres organismes. Cette bactérie utilise un certain nombre d'effecteurs pour acquérir un avantage concurrentiel sur les autres organismes, dans les cultures sessiles et planctoniques. Ces effecteurs comprennent l'élastase LasA et LasB (des protéases), *N*-homosérine lactone, la pyocyanine et les rhamnolipides, qui peuvent tuer ou entraver la croissance de bactéries concurrentes ou perturber et disperser des bactéries provenant de communautés de biofilms hétérogènes. Ces effets ont été démontrés avec divers types de

micro-organismes, dont *Candida albicans*, sensible à la phénazine, et *Staphylococcus aureus*, sensible à LasB. Cependant, il a été montré que *K. pneumoniae* est capable de former un biofilm stable avec *P. aeruginosa*, suggérant la présence de mécanismes de défense capables de résister à l'assaut de ces effecteurs de *P. aeruginosa* (Brandon *et al.*, 2013)

D'après Brandon *et al.* en 2013, la protéine de pointe fimbriale MrkD qui joue un rôle dans la physiologie du biofilm de *K. pneumoniae* et constitue un facteur important dans la pathogenèse, permet la compétition de *K. pneumoniae* avec *P. aeruginosa* dans un biofilm à espèces mixtes et fournit une défense contre les protéases microbiennes et dérivées de l'hôte. (Brandon *et al.*, 2013).

Dans une étude réalisée par Murga *et al.* en 1995, la variabilité de l'épaisseur des biofilms mono-espèce de *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*, et des biofilms mixtes formés par ces deux espèces ont été quantifiées. Cette étude confirme la caractérisation visuelle qualitative des biofilms de *P. aeruginosa* relativement épais, le biofilm mixte en tant qu'intermédiaire et les biofilms de *K. pneumoniae* à faible épaisseur (Murga *et al.*, 1995).

D'après les travaux de Siebel et Characklis en 1991 et Stewart *et al.* en 1997, *P. aeruginosa* n'a pas dominé la population microbienne dans le biofilm. En raison de sa excellente capacité de colonisation, cette bactérie construit la structure de base tandis que *K. pneumoniae* forme une structure en forme de tour au-dessus et persiste en raison de son taux de croissance le plus élevé. Une structure similaire a été également observée dans une autre étude effectuée par Chhibber (2015). En effet et lorsque le biofilm à double espèce a été formé sur le disque de polycarbonate, un film supérieur de *K. pneumoniae* recouvert le biofilm basal de *P. aeruginosa*. Il était clair que *P. aeruginosa* colonisait le substrat tandis que *K. pneumoniae* était principalement présente dans la couche superficielle de biofilm.

Une distribution spatiale similaire a été aussi révélée dans des biofilms mixtes à double espèce formés de ; *P. aeruginosa* et *Burkholderia cepacia* et d'autres de ; *P. aeruginosa* et *Agrobacterium tumefaciens*, dont ces deux espèces, chacune recouvert le biofilm basal de *P. aeruginosa* (Al-Bakri *et al.*, 2004; An *et al.*, 2006).

Conclusion

Conclusion

La plupart des bactéries favorisent un mode de vie où la population bactérienne se trouve fixée sur un support plutôt que libre dans le milieu environnemental. L'attachement sur une surface est une « stratégie de survie » qui permet à la bactérie de s'installer et de coloniser les surfaces telles que les implants médicaux invasifs. Après attachement sur les sondes urinaires et les cathéters veineux, les bactéries vont mettre en place et développer un biofilm. Ce dernier est responsable de nombreuses infections récalcitrantes et extrêmement difficile à l'éradiquer. La plupart des biofilms sont multi-espèces et nécessitent donc des stratégies complexes de traitement antimicrobien.

Cette étude, qui porte dans un premier temps sur la mise en évidence de biofilms mixtes colonisant deux DM à savoir les sondes urinaires et les cathéters veineux, a montré que durant la période de deux mois les espèces bactériennes identifiées constituant ces biofilms appartiennent aux bacilles à Gram négatif ; principalement des entérobactéries ainsi que des bacilles non fermentaires.

Dans un deuxième temps, l'étude *in vitro* de la capacité de formation de biofilms mono-espèces et des biofilms mixtes à double espèce entre *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*, suivant la méthode de coloration au cristal violet, a révélé que les deux bactéries ont l'aptitude à produire des biofilms en polystyrène et en verre. Néanmoins, *P. aeruginosa* a été considéré comme la bonne formatrice de biofilm mono-espèce en milieu LB après 24 heures d'incubation. En outre, l'ajout simultané des deux bactéries à différentes concentrations a permis de mettre en évidence des associations sous forme de biofilms mixtes ayant des densités considérables et que la dominance de *K. pneumoniae* améliore énormément la production de biofilm au regard de la dominance de *P. aeruginosa*. Cette dernière était la plus sensible à l'ensemble des ATB testés contrairement à *K. pneumoniae*.

Par ailleurs, les résultats obtenus ont révélé que, la proportion des cellules non fixées la plus élevée correspond généralement à la formation de biofilm la plus faible et vice versa et que le taux de croissance de *K. pneumoniae*, était toujours plus élevé que celui de *P. aeruginosa* dans des conditions de croissance planctonique.

Finalement, il s'avère donc nécessaire et important dans un premier temps de suivre un ensemble de mesures préventives dont les plus importantes sont le respect des règles d'hygiène et des procédures invasives, et la formation des personnels soignants. Dans un deuxième temps, de réaliser d'autres travaux sur les biofilms mixtes et de comprendre les interactions existantes entre les bactéries impliquées dans ces associations à fin d'identifier les meilleurs moyens visant la prévention et le traitement des infections chroniques liées aux dispositifs médicaux.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

A

- **Abubakar, A.A., Pukuma, M.S. et Abdulazeez, F.B. (2013).** Frequency of biofilm formation in toothbrushes and wash basin junks. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*, 6, 55.
- **Al-Bakri, AG., Gilbert, P. et Allison, DG. (2004).** Immigration and emigration of *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* between and within mixed biofilm communities. *Appl Microbiol.*, 96(3),455-63.
- **Alnasouri, M. (2010).** Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau Composition. Thèse de doctorat: Génie des Procédés et des Produits. Lorraine: Institut National Polytechnique de Lorraine, 160p.
- **An, D., Danhorn, T., Fuqua, C. et Parsek, MR. (2006).** Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 3828– 3833.
- **Anderl, JN., Franklin, MJ. et Stewart, PS. (2000).** Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 1818-1824.
- **Arciola, CR., Campoccia, D., Ehrlich, GD. et Montanaro, L. (2015).** Biofilm-Based Implant Infections in Orthopaedics. In: Donelli G, ed. *Biofilm-based Healthcare-associated Infections*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing, 29–46.

B

- **Badel-berchoux, S., Aurélie, C., Jérôme, G., Christian, P. et Thierry, B. (2017).** biofilms : mieux vaut prévenir que guérir. *RNB.Info.*, 7, 6-8.
- **Barakat, R., Goubet, I., Manon, S., Berges, T. et Rosenfeld E. (2014).** Unsuspected Pyocyanin Effect in Yeast under Anaerobiosis. *Microbiologyopen*, 3, 1-14.
- **Baudin M. (2017).** Couplage de rapporteurs génétiques et d'une molécule active pour l'étude de la dispersion de biofilms. Thèse de doctorat: Biologie. France: Université Paris-Saclay, 158p.
- **Battin, T.J., Kaplan, L.A., Denis Newbold, J. et Hansen, C.M.E. (2003).** Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature*, 426, 439–442.
- **Becker, P., Hufnagle, W., Peters, G. et Herrmann, M. (2001).** Detection of different gene expression in biofilm-forming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus* using micro representational-difference analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 6, 2958-2965.

- **Beech, I.B. et Sunner, J. (2004).** Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15, 181–186.
- **Bezoui M. (2016).** Biofilms bactériens et leur implication en pathologie humaine. Thèse de doctorat: Pharmacie. Rabat: Université Mohammed V- Rabat, 110 p.
- **Boks, N.P., Busscher, H.J., Van Der Mei, H.C. et Norde, W. (2008).** Bond-strengthening in staphylococcal adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces using atomic force microscopy. *Langmuir*, 24, 12990–12994.
- **Boles, BR., Thoendel, M. et Singh, PK. (2004).** Self-generated diversity produces insurance effects in biofilm communities. *PNAS*, 101(47),16630–16635.
- **Branda, SS., Vik, S., Friedman, L. et Kolter, R. (2005).** Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13, 20-26.
- **Bury- Moné S. (2007).** *Les biofilms*. Polycopié. Ecole Normale Supérieure de Cachan. 17 p.
- **Busscher, H.J., Van Der Mei, H.C. (2006).** Microbial Adhesion in Flow Displacement Systems. *Clin Microbiol Rev.*, 19, 127–141.

C

- **Carrière, C. et Marchan H. (2001).** Infections liées aux cathéters veineux centraux, 22 (8), 433-437.
- **Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D. et Buret, A. (1999).** The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol.*, 37, 1771–1776.
- **Chao, Y. et Zhang, T. (2011).** Optimization of fixation methods for observation of bacterial cell morphology and surface ultrastructures by atomic force microscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 381–392.
- **Chhibber, S., Bansal, Sh. et Kaur, S. (2015).** Disrupting the mixed-species biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO using bacteriophages alone or in combination with xylitol. *Microbiology*, 161, 1369–1377.
- **Childers, B. M., Van Laar, T. A., You, T., Clegg, S. et Leung, K. P. (2013).** MrkD1P from *Klebsiella pneumoniae* strain IA565 allows for coexistence with *Pseudomonas aeruginosa* and protection from protease-mediated biofilm detachment. *Infect Immun*, 81, 4112–4120.
- **Chmielewski, R.A.N. et Frank, J.F. (2003).** Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 22–32.
- **Christensen, B. B., Haagensen, J. A., Heydorn, A. et Molin, S. (2002).** Metabolic commensalism and competition in a two-species microbial consortium. *Appl Environ Microbiol.*, 68, 2495–2502.
- **Clutterbuck, AL, Woods, EJ, et al. (2007).** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol.*, 121 (1-2), 1-17.

- **Costerton JW (2004).** A short history of the development of the biofilm concept. *Methods of studying biofilms. Microbial biofilms*, 4-19.
- **Costerton, J.W (2007)** .The Biofilm Primer. Springer-Heidelberg. Book spring series on biofilms, 1.

D

- **Daddi Oubekka, S. (2012).** Dynamique réactionnelle d'antibiotiques au sein des biofilms de *Staphylococcus aureus* : apport de la microscopie de fluorescence multimodale. Sciences agricoles. Thèse de doctorat: Microbiologie. France: Université Paris Sud XI, 168p.
- **Davies, D.G. (2011).** Biofilm Dispersion, in: Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U. (Eds.), *Biofilm Highlights*. Springer Berlin Heidelberg, 1–28.
- **De Beer, D. et Stoodley, P. (2006).** Microbial biofilms, in: *The Prokaryotes*. Springer, 904–937.
- **De chalvet de rochermonteix, A. (2009).** les biofilms et la peau. Thèse de doctorat: Veterinaire. Alfort: Ecole nationale veterinaire d'Alfort, 124p.
- **Dobretsov, S., Teplitski, M. et Paul, V. (2009).** Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling*, 25, 413–427.
- **Doghri I. (2015).** Interactions moléculaires entre microorganismes au sein de biofilms en milieu marin : mise en évidence de biomolécules antibiofilm. Thèse de doctorat: Sciences agricoles. Rochelle: Université de La Rochelle, 223p.
- **Donlan R.M. (2002).** Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881–890.
- **Dolan R. M. et Costerton J. W. (2002)** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15, 167-193.
- **Dunne W.M. Jr. (2002).** Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (2), 155–166.

E

- **Ebrey, R., Hamilton, M.S. et Cairns, G. (2004)** Biofilms and hospital acquired infections. In: Ghannoum M, O'Toole GA, editors. *Microbial biofilms.*, 294-313.
- **Eiff von, C., Peters, G. et Heilmann, C. (2002).** Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis.*, 2, 677-685.
- **Elie, N. (2010).** infections urinaires nosocomiales.
- **Else, T.A., Pantle, C.R. et Amy, P.S. (2003).** Boundaries for Biofilm Formation: Humidity and Temperature. *Appl Environ Microbiol.*, 69, 5006–5010.

F

- **Filloux A. et Vallet I. (2003).** Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Medecine/Sciences*, 19, 77-83.
- **Flemming, H.-C. et Wingender, J. (2010).** The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8, 623–633.
- **Florence, E., Bernard, P. et Brigitte, C-B. (2010).** Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. Centre hospitalier universitaire Ambroise-Paré (AP-HP).(426), 51.
- **Freeman, DJ., Falkiner, FR. et Keane, CT. (1989).** Nouvelle méthode pour détecter la production de boues par des staphylocoques à coagulase négative. *J Clin Pathol.*, 42,872- 874.
- **Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S. et Stoodley, P. (2004).** Survival strategies of infectious biofilms *Trends in Microbiology*, 13, 34-40.

G

- **Garrett, T.R., Bhakoo, M. et Zhang, Z (2008).** Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science* ,18, 1049–1056.
- **Gilbert, P., Maira-Litran, T., McBain, AJ., Rickard, AH. et Whyte, FW. (2002).** The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Advances in Microbial Physiology*, 46, 203-256.
- **Goller, CC. et Romeo, T. (2008).** Environmental influences on biofilm development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 322, 37- 66.
- **Grasteau, A. (2011).** Sélection de mutations affectant la formation de biofilm chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Thèse doctorat en sciences vétérinaires option microbiologie. Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, p111.
- **Gutierrez, D., S. Delgado, D. Vazquez-Sanchez, B. Martinez, M. L. Cabo, A. Rodriguez, J. J. Herrera, et P. Garcia. (2012).** Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. *Appl Environ Microbiol.*, 78,8547-54.

H

- **Hahn, M.W. et Höfle, M.G. (2001).** Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 35, 113-121.
- **Hajjar, J., Verdeil, X., Astruc, K., Gentil-brevet, J., De bels, F. (2005).** Prévention des infections liées aux cathéters veineux périphériques.
- **Hall-Stoodley, L. et Stoodley, P. (2005).** Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol.*, 13, 7–10.
- **Harriott, M.M. et Noverr, M.C. (2011).** Importance of *Candida*–bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends in microbiology*, 19(11), 557-563.

- **Hojo, K., Nagaoka, S., Ohshima, T. et Maeda, N. (2009).** Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. *J. Dent. Res.*,88(11), 982–990.

I

- **Inkinen, J., Kaunisto, T., Pursiainen, A., Miettinen, I. T., Kusnetsov, J., Riihinen, K., et Keinanen-Toivola M. M. (2014).** Drinking water quality and formation of biofilms in an office building during its first year of operation, a full scale study. *Water Res*, 49, 83-91.
- **Irie, Y. et Parsek, MR. (2008).** Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 322, 67- 84.

J

- **Jamil, A., Riaz, S., Ashraf, M. et Foolad, M. (2001).** Voie de contamination des implants invasif *Crit. Rev. Plant Sci.*, 30 (5), 435 – 458.
- **Jefferson, K.K. (2004).** What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Ecology*, 236, 163-173.
- **Jouenne, T. (2008).** Biofilms bactériens. Techniques de l'Ingénieur, Bioprocédés, base documentaire. Techniques-ingénieur.fr.

K

- **Karatan, E. et Watnick, P. (2009).** Signals regulatory network and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev.*,73,310-347.
- **Karunakaran, E., Mukherjee, J., Ramalingam, B. et Biggs, C.A. (2011).** Biofilmology: a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 90, 1869-1881.
- **Klein, G. (2011).** Nouvelles molécules naturelles inhibitrices du développement de biofilms de bactéries marines. Thèse de doctorat: Microbiologie. Bretagne: Université européenne de Bretagne, 179 p.
- **Kone, T. (2012).** Etude expérimentale du couplage entre croissance bactérienne et transport d'un polluant organique en milieu poreux. Thèse de doctorat: Génie Civil. Lorraine: Université de Lorraine, 138 p.
- **Kuchma, SL., Connolly, JP. et O'Toole, GA. (2005).** A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 187(4), 1441-1454.

L

- **Lemon, KP., Earl, AM., Vlamakis, HC., aguilar, C. et Kolter, R. (2008).** Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, 1-16.

- **Lin, W., Yu, Z., Zhang, H., et Thompson, I. P. (2014).** Diversity and dynamics of microbial communities at each step of treatment plant for potable water generation. *Water Res*, 52, 218-30.
- **Liu, Y., Tay, J. H. (2002).** The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research*, 36, 1653-1665.
- **Luca, M.D., Maccari, G. et Nifosi, R. (2014).** Treatment of Microbial Biofilms in the Post Antibiotic Era: Prophylactic and Therapeutic Use of Antimicrobial Peptides and Their Design by Bioinformatics Tools *Pathog Dis.*, 70, 257–270.

M

- **MacLean, RJC., Bates, CL. et Barnes, MB. (2004).** Methods of studying biofilms. Ghannoum M & O'Toole GA Editors. *Microbial biofilms*, ASM Press, 379-413.
- **Maillet, M. (2013).** Principes de prise en charge des infections nosocomiales; DU Thérapeutiques anti-infectieuses.
- **Maitre, O. (2012).** Infection sur sonde urinaire Infection sur sonde urinaire; Île de France, 5-7.
- **Maki, D.G. et Tambyah, P.A. (2001).** Engineering out the risk for infection with urinary catheters. *Emerg Infect Dis*, 7(2), 342-47.
- **Martine, B. et Henry, B. (1997).** Infections urinaires nosocomiales; Service d'Urologie; CMC Foch; Suresnes; France, p, 674.
- **Martinez, LR. et Casadevall, A. (2007).** Cryptococcus neoformans biofilm formation depends on surface support and carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4592-4601.
- **Matz, C., McDougald, D., Moreno, A.M., Yung, P.Y., Yildiz, F.H. et Kjelleberg, S. (2005).** Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 102, 16819-16824.
- **McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D. et Kjelleberg, S. (2012).** Should we stay or 170 should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 39–50.
- **Metzler, Antoinette. (2016).** Developing a Crystal Violet Assay to Quantify Biofilm Production Capabilities of *Staphylococcus aureus*. Honors Research Thesis. Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for Graduation with Honors Research Distinction. Department of Animal Sciences. The Ohio State University.
- **Moons, P. et C. W. Michiels (2009).** Bacterial interactions in biofilms. *Crit Rev Microbiol.*, 35(3), 157-68.
- **Morgan, R., Kohn, S., Hwang, S. H., Hassett, D.J. et Sauer, K. (2006).** BdlA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 188, 7335–7343.

- **Murga, R., Stewart, PS. et Daly, D. (1995).** Quantitative analysis of biofilm thickness variability. *Biotechnol Bioeng*, 45,503-510.
- **Murray, CJ. et Lopez, AD. (1997).** Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet Lond. Engl.*,349(9064), 1498–1504.
- **Musk, DG., Banko, DA. et Hergenrother, PJ. (2005).** Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas eurogenosa*. *Chimistry and biology* , 12, 789-796.

P

- **Palmer, R. J. Jr., Kazmerzak, K., Hansen, M. C. et Kolenbrander, P. E. (2001).** Mutualism versus independence: strategies of mixed-species oral biofilms in vitro using saliva as the sole nutrient source. *Infect Immun*, 69, 5794–5804.
- **Palmer, J., Flint, S. et Brooks, J. (2007).** Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34, 577-588.
- **Pantaléon, V. (2015).** Le biofilm de *Clostridium difficile* : rôle des protéines de surface. Thèse de doctorat: Microbiologie et thérapeutiques anti-infectieuses. France: Université Paris-Sud 11, 174 p.
- **Parsek, MR. et Greenberg, EP. (2005).** Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology*, 13(1), 27-33.
- **Payet, S. (2017).** Méthode d'identification bactérienne par PCR quantitative appliquée à un modèle de biofilm oral pluri-espèces dynamique. Thèse de doctorat: Chirurgie. France: Université de Bordeaux, 82 p.
- **Percival, SL. et Bowler, PG. (2004).** Biofilms and their potential role in wound healing. *Wounds*, 16, 234-240.
- **Pinho Medeiros, A.C.(2016).** Etude expérimentale de la formation des biofilms sous conditions hydrodynamiques contrôlées. Thèse de doctorat: Mécanique des fluides. France: Université Grenoble Alpes, 179 p.
- **Ploux, L., Beckendroff, S., Nardin, M. et Neunlist, S. (2007).** Quantitative and morphological analysis of biofilm formation on self-assembled monolayer. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 57(2),174-181
- **Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T.T., Vidal, O., Lejeune, P. et Dorel, C. (2000).** Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ. Microbiol.*, 2, 450–464.
- **Prüß, B.M., Besemann, C., Denton, A. et Wolfe, A.J. (2006).** A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 188, 3731–3739.

Q

- **Queck, S-Y., Weitere, M., Moreno, AM. et al. (2006)** .The role of quorum sensing mediated developmental traits in the resistance of *Serratia marcescens* biofilms against protozoan grazing. *Environ. Microbiol.*, 8, 1017- 1025.

R

- **Ragon, M. (2011)**. Diversité et processus de colonisation microbienne sur des substrats minéraux. Thèse de doctorat: Ecologie microbienne. France: Université Paris Sud XI, 171 p.
- **Remy, P. Ph. (2015)**. Rôle de différents compartiments microbiens (biofilms, matières en suspension, sédiments de surface) et de leurs constituants (bactéries, polymères extracellulaires et biominéraux) sur la méthylation et la réduction de HgII. Thèse de doctorat: Sciences de la Vie et de la Santé. France: Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement, 238 p.
- **Reid, G., Howard, J. et Gan, B.S. (2001)**. Can bacterial interference prevent infection? *Trends Microbiol.*,9, 424–428.
- **Roux A. et Ghigo J.M. (2006)**. Les biofilms bactériens. *Académie vétérinaire de France*, 159(3), 261-268.
- **Renner, L.D. et Weibel, D.B. (2011)**. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull*, 36, 347–355.

S

- **Salaün S. (2009)**. Interactions entre la macroalgue brune *Laminaria digitata* et ses épibiontes bactériens : études moléculaire et spectroscopiques : capacité d'adhésion et de formation de biofilm. Thèse de doctorat: Biologie de santé. Bretagne: Université Européenne de Bretagne, 204 p.
- **Sammons, R.L., Kaur, D. et Neal, P.(2004)**. Bacterial survival and biofilm formation on conventional and antibacterial toothbrushes. *Biofilms*, 1, 123–130.
- **Sauer, K., Rickard, A.H. et Davies, D.G.(2007)**. Biofilms and biocomplexity. *Microbe*, 2, 347–353.
- **Schembri, M.A., Kjærgaard, K. et Klemm, P. (2003)**. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.*, 48, 253–267.
- **Schauder, S., Shokat K., Surette M. G., et Bassler B. L., (2001)**. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Microbiol.*, 41, 463-76.
- **Shurtleff, ME., Mader, JT. et Camper, AK. (2002)**. Molecular interactions in biofilms. *Chem. Biol.*, 9, 859–871.
- **Siebel, MA., Characklis, WG. (1991)**. Observations of binary population biofilms. *Biotechnol Bioeng*, 37, 778-789.

- **Simain,F., Rompen, E. et Heinen, E. (2010).** Biofilms bactériens et médecine dentaire. Service de Médecine Dentaire, CHU de Liège, 4000 Liège, Belgique. Rev., 65(10), 569-573.
- **Simoès, M., Simoès, LC. et Vieira, MJ. (2009).** Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. *Water Research*, 43(1), 229-237.
- **Spilf et l'Afu. (2002).** Infections urinaires nosocomiales de l'adulte, Conférence de Consensus Co-organisée.
- **Squinazi F. (2013).** Biofilm et Matériaux : des réseaux intérieurs de distribution de l'eau, 4-10.
- **Spormann, AM. (2008).** Physiology of microbes in biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, 17-36.
- **Stepanovic, S., Dragana, V., Veronika, H., Giovanni, D. B., Slobodanka, D., I., Irkovic, C. et Filip, R. (2007).** Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. *APMIS* ,115, 891-9.
- **Stewart, P.S., Camper, A.K. Handran, S.D., Huang, C. T. et Warnecke, M.(1997).** Spatial Distribution and Coexistence of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms. *Microbial Ecology*, 33(1), 2–10.
- **Sutherland, IW. (2001).** The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, 9(5), 222-227.

T

- **TASSE J. (2017).** Apport de l'antibiofilmogramme et de la mesure de la capacité de formation du biofilm dans la prise en charge des infections osteo-articulaires aux staphylocoques. Thèse de doctorat: Microbiologie. Lyon: Université Claude Bernard Lyon 1, 210 p.
- **Tenke, P., Kovacs, B., Jackel, M. et Nagy, E. (2006).** The role of biofilm infection in urology. *World J Urol*, 24, 13-20.
- **Tolker-Nielsen, T., Brinch, U.C., Ragas, P.C., Andersen, J.B., Jacobsen, C.S. et Molin, S., (2000).** Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *J. Bacteriol.* 182, 6482–6489.
- **Tomlin, KL., Malott, R.J. et al. (2005)** Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 5208-5218.
- **Tremblay Yannick, D.N., Hathroubi, S. et Jacques, M. (2014).** Les biofilms Bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *The canadian Journal of Veterinary Reaserch* , 78, 110-116.

V

- **Van Houdt, R. et Michiels, C.W. (2005).** Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res. Microbiol.*, 156, 626–633.
- **Verstraeten, N., Braekenn K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J. et Micheiels, J. (2008).** Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol.*, 16, 496-506.
- **Vieu G. (2014).** Diversité génétique des isolats de *Staphylococcus aureus* producteurs de toxine de Panton-Valentine isolés au CHU de Toulouse. Étude de 37 cas de patients à l'hôpital des enfants. Thèse de doctorat: pharmacie. Toulouse: Université Toulouse iii – Paul Sabatier.

W

- **Wagner, M., Manz, B., Volke, F., Neu, Th. R., et Horn, H. (2010).** Online assessment of biofilm development, sloughing and forced detachment in tube reactor by means of magnetic resonance microscopy. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(1), 172–181.
- **Wang, MS., Palmer, LB., Schwartz, JD. et Razatos, A. (2004).** Evaluating protein attraction and adhesion to biomaterials with the atomic force microscope. *Langmuir*, 20(18), 7753-7759.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Préparation des milieux de culture et des solutions

Annexe 1.1 : Préparation de LB agar (Sigma-Aldrich)

- LB agar.....35
g
- Eau distillée.....1000
ml

Annexe 1.2 : Préparation de LB broth (Sigma-Aldrich)

- LB broth.....20
g
- Eau distillée.....1000
ml

Annexe 1.3 : Préparation de la solution du Cristal Violet à 1% (Sigma-Aldrich)

- Cristal violet.....1
g
- Eau distillée.....100
ml

Annexe 1.4 : Préparation de la solution Éthanol-Acétone (75:25)

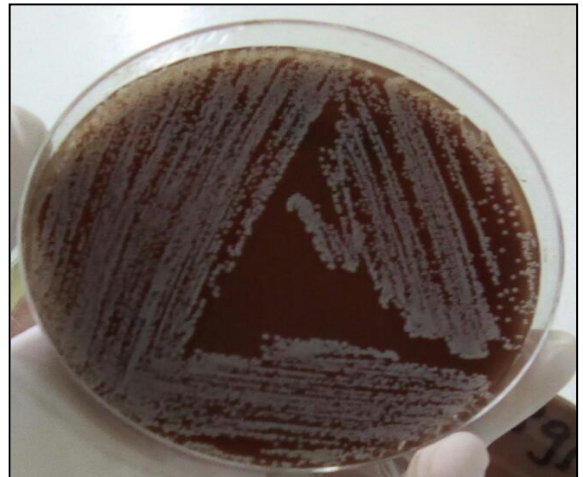
- Ethanol.....75
ml
- Acétone.....25
ml

Annexe 2 : Résultats de l'isolement et l'identification de *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*

Annexe 2.1 : Aspects de colonies sur les milieux d'isolement



K. pneumoniae sur Hektoen



P. aeruginosa sur gélose au chocolat

Annexe 2.2 : Aspects de colonies sur LB agar



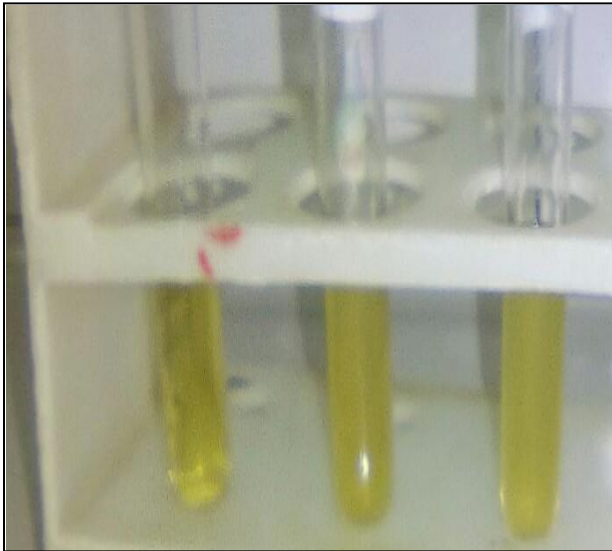
P. aeruginosa



K. pneumoniae

Annexe 3 : Résultats de la formation de biofilm en tubes

Annexe 3.1 : Aspects de cultures mono-espèces en LB broth

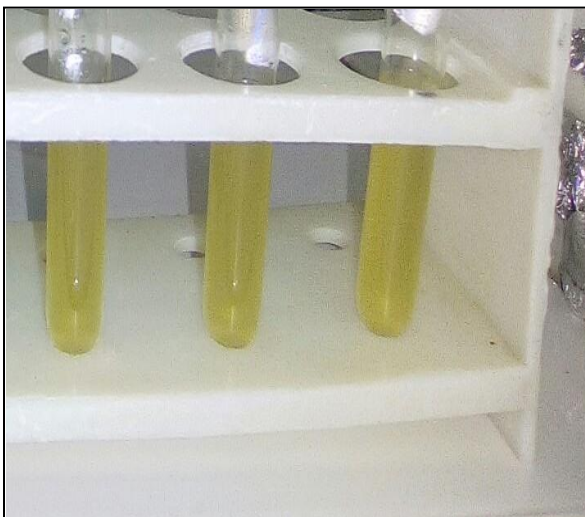


Tubes en polystyrène

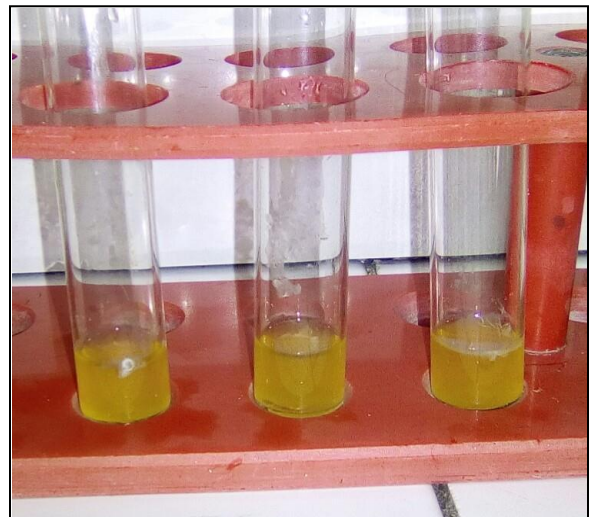


Tubes en verre

Annexe 3.2 : Aspects de cultures multi-espèces en LB broth







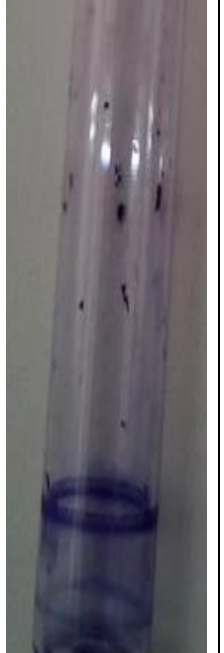





Tubes en polystyrène

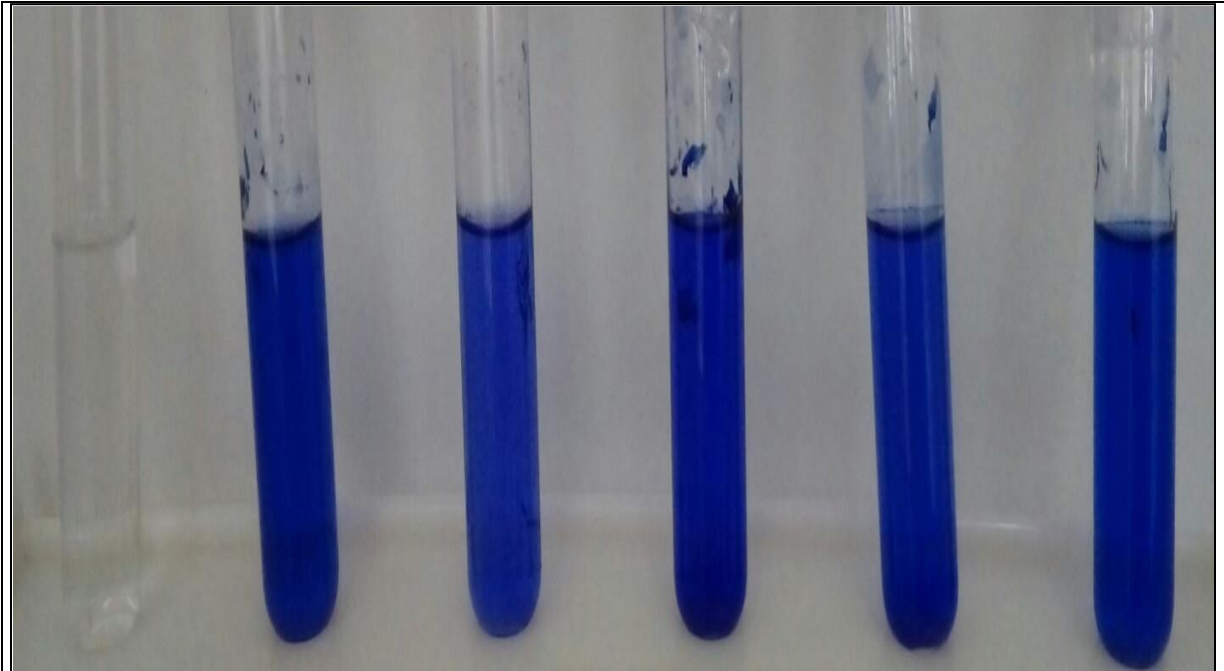


Tubes en verre

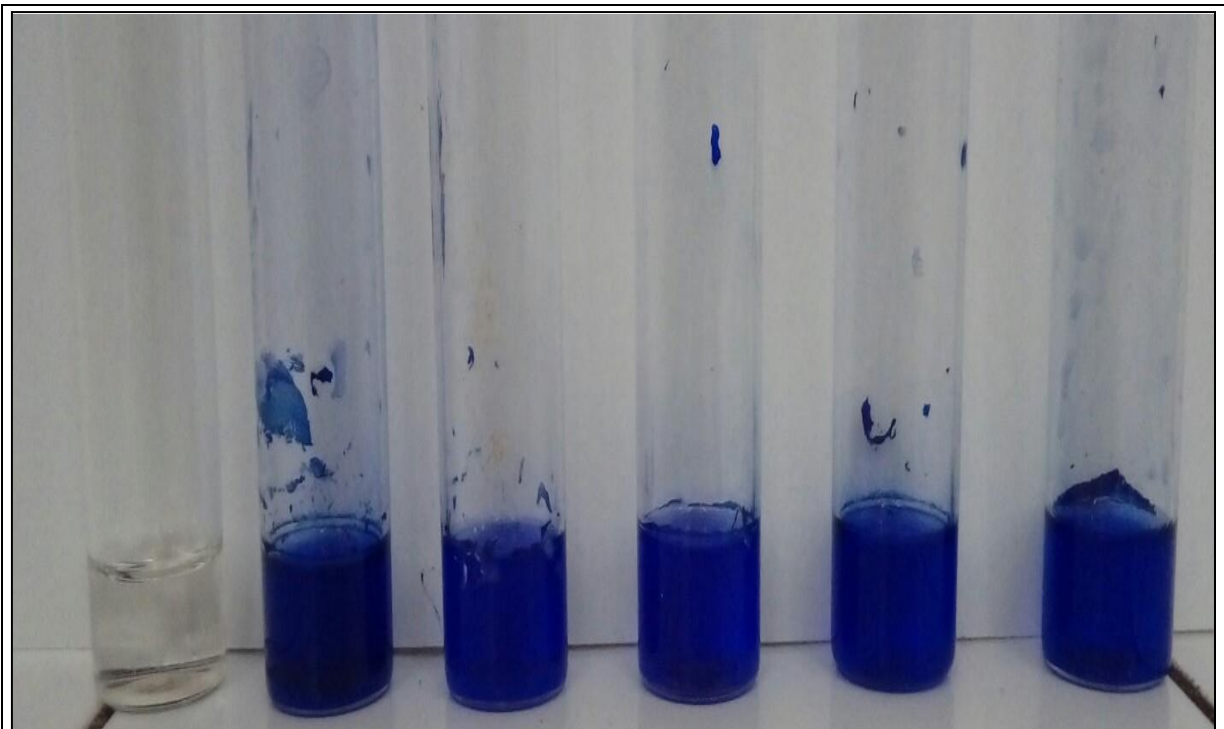
Annexe 3.3: Résultats de formation de biofilms après coloration au CV

				
PA 100%	KP 100%	PA50 + KP 50%	PA75% + KP 25%	PA 25% + KP 75 %
				
PA 100%	KP 100%	PA50 + KP 50%	PA75% + KP 25%	PA 25% + KP 75 %

Annexe 3.4: Solubilisation des biofilms par la solution Ethanol/Acétone.



Le blanc	KP 100%	PA 100%	KP 50%+ PA50	KP 75 % + PA 25%	KP 25%+PA75%
-----------------	----------------	----------------	---------------------	-----------------------------	-------------------------



Le blanc	KP 100%	PA 100%	KP 50%+ PA50	KP 75 % + PA 25%	KP 25%+PA75%
-----------------	----------------	----------------	---------------------	-----------------------------	-------------------------

Résumés

Résumé

L'implantation temporaire d'un dispositif médical (DM) est associée à un risque infectieux non négligeable. La physiopathologie de ces infections est étroitement liée à la constitution d'un biofilm sur ces corps étrangers. Ces biofilms bactériens sont extrêmement difficiles à éradiquer. De ce fait, la lutte contre ces biofilms reste un sérieux problème de santé publique. L'objectif de notre travail vise à identifier au préalable la flore bactérienne colonisant la surface des cathéters veineux et des sondes urinaires provenant des malades hospitalisés. Par la suite, étudier *in vitro* la capacité de formation de biofilms mono-espèces et de biofilms mixtes en tubes entre *Pseudomonas aeruginosa* (PA) et *Klebsiella pneumoniae* (KP) en appliquant la méthode de coloration au cristal violet (CV). Cette étude a montré que, durant la période de deux mois, toutes les espèces bactériennes identifiées, constituants des biofilm mixtes, sont des bacilles à Gram négatif. Ces bactéries font partie des entérobactéries et des bacilles non fermentaires. Par ailleurs, PA et KP sont capables de former des biofilms mono-espèces en polystyrène et en verre dont PA a donné des valeurs importantes et donc a été considérée comme la bonne formatrice de biofilm. En outre, l'association entre ces deux bactéries engendre des biofilms considérables par rapport à ceux formés d'une seule bactérie et que la dominance de KP engendre une formation de biofilm mixte notable par rapport à la dominance de PA. Une relation inversement proportionnelle entre les cellules planctoniques et les cellules sessiles a été également détectée. Des règles d'hygiène rigoureuse, la gestion adéquate des procédures invasives et la formation des personnels soignants ainsi que la réalisation des études supplémentaires sur d'autres biofilms mixtes sont absolument nécessaires pour limiter la colonisation des DM et donc les infections associées à ces DM.

Mots clés : Dispositif médical, cathéter veineux, sonde urinaire, biofilm mixte, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*.

Abstract

The temporary implantation of a medical device (MD) is associated with a significant risk of infection. The pathophysiology of these infections is closely related to the formation of a biofilm on these foreign bodies. These bacterial biofilms are extremely difficult to eradicate. As a result, the fight against these biofilms remains a serious public health problem. The objective of our work is to identify the bacterial flora colonizing the surface of venous catheters and urinary catheters of hospitalized patients. Subsequently, in vitro study the ability to form single-species biofilms and mixed biofilms between *P. aeruginosa* (PA) and *K. pneumoniae* (KP) by applying the crystal violet (CV) staining method on tube. This study showed that, during the two-month period, all identified bacterial species, components of mixed biofilm, are gram-negative bacilli. These bacteria are enterobacteria and non-fermentative bacilli. Moreover, PA and KP are capable of forming single-species biofilms made of polystyrene and glass, of which PA has given significant values and has been considered a good biofilm trainer. In addition, the association between these two biofilms compared to those produced by a single bacterium and the dominance of KP generics has noticeable mixed biofilm formation with respect to PA dominance. An inversely proportional relationship between planktonic cells and sessile cells was also detected. Rigorous hygiene rules, the proper management of invasive procedures, and the training of health care workers are of particular importance to the colonization of MD and therefore the infections associated with these MD.

Key words: Medical device, venous catheter, urinary catheter, mixed biofilm, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*.

المخلص

الوضع الموقت لجهاز طبي له خطر معدي كبير لا يمكن تقاويه . الفيزيوباثولوجيا لهذه الالتهابات مرتبطة ارتباط وثيق بتكوين البيوفيلم على هذه الأجسام الخارجية. هذا البيوفيلم البكتيري صعب جدا القضاء عليه و بالتالي محاربه تبقى مشكل جدي لقطاع الصحة العمومية . الهدف من عملنا هو تحديد مسبق للبكتيريا المستعمرة لمساحات القسطرات الوريدية و المسابير اليولية الآتية من المرضى بالمستشفى ، بعد ذلك دراسة في المخبر القدرة على تشكيل البيوفيلم أحادية البكتيريا و البيوفيلم المتكونة من بكتيريتين في أنابيب اختبار بين *K. pneumoniae* (KP) و *P. aeruginosa* (PA) مع تطبيق طريقه التلوين باستعمال الكريستال البنفسجي (CV). هذه الدراسة توضح أن في مدة قدرها شهرين السلالات البكتيرية المحددة و المسؤولة عن بناء البيوفيلم المختلط تنتمي إلى عصيات من نوع Gram سالب ، هذه البكتيرية تنتمي إلى *Entérobactéries* و العصيات الغير مخمرة . و من جهة أخرى البكتيريا KP و PA لهم القدرة على تشكيل البيوفيلم أحادي السلالة في البوليسثيرين و الزجاج، في هذه الحالة PA أعطت قيم كبيره وهامة وبالتالي اعتبرت بمثابة المشكلة للبيوفيلم الأهم زيادة على ذلك الجمع بين البكتيريتين أعطى البيوفيلم الأهم مقارنة بالمتكون من بكتيريا واحده و أن سيادة KP أعطت البيوفيلم المختلط الأكثر الأهميه مقارنة مع سيادة PA. بالاضافه إلى ذلك استنتجنا علاقة عكسية بين الخلايا العوالق و الخلايا اللاصقة. قواعد النظافة الصارمة ، الإدارة الجيدة للإجراءات الكافية لوضع الاجهزه الطبية التكوين الأمثل لممرضى الرعاية الصحية و كذلك القيام بدراسات اضافيه على أنواع أخرى من البيوفيلم المختلط هي بالتأكيد لازمة لتقليص تكون المستعمرات البكتيرية على الأجهزة الطبية وبذلك الالتهابات المرتبطة بهذه الأجهزة الطبية.

الكلمات المفتاحية: جهاز طبي، قسطرة وريدية، مسبار بولي، بيوفيلم مختلط، *K. pneumoniae*، *P. aeruginosa*

Thème: Recherche de biofilms mixtes sur implants médicaux

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en: **Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes**

Résumé

L'implantation temporaire d'un dispositif médical (DM) est associée à un risque infectieux non négligeable. La physiopathologie de ces infections est étroitement liée à la constitution d'un biofilm sur ces corps étrangers. Ces biofilms bactériens sont extrêmement difficiles à éradiquer. De ce fait, la lutte contre ces biofilms reste un sérieux problème de santé publique. L'objectif de notre travail vise à identifier au préalable la flore bactérienne colonisant la surface des cathéters veineux et des sondes urinaires provenant des malades hospitalisés. Par la suite, étudier *in vitro* la capacité de formation de biofilms mono-espèces et de biofilms mixtes en tubes entre *P. aeruginosa* (PA) et *K. pneumoniae* (KP) en appliquant la méthode de coloration au cristal violet (CV). Cette étude a montré que, durant la période de deux mois, toutes les espèces bactériennes identifiées, constituants des biofilm mixtes, sont des bacilles à Gram négatif. Ces bactéries font partie des entérobactéries et des bacilles non fermentaires. Par ailleurs, PA et KP sont capables de former des biofilms mono-espèces en polystyrène et en verre dont PA a donné des valeurs importantes et donc a été considérée comme la bonne formatrice de biofilm. En outre, l'association entre ces deux bactéries engendre des biofilms considérables par rapport à ceux formés d'une seule bactérie et que la dominance de KP engendre une formation de biofilm mixte notable par rapport à la dominance de PA. Une relation inversement proportionnelle entre les cellules planctoniques et les cellules sessiles a été également détectée. Des règles d'hygiène rigoureuse, la gestion adéquate des procédures invasives et la formation des personnels soignants ainsi que la réalisation des études supplémentaires sur d'autres biofilms mixtes sont absolument nécessaires pour limiter la colonisation des DM et donc les infections associées à ces DM.

Mots clés : Dispositif médical, cathéter veineux, sonde urinaire, biofilm mixte, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Ben Badis de Constantine.

Laboratoire de la Microbiologie Générale, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.

Jury d'évaluation :

Président du jury : MERGOUD Lilia	(Maître Assistante «A» - UFM Constantine).
Rapporteur : BOUCHLOUKH Warda	(Maître Assistante «A» - UFM Constantine).
Examinatrice : ABDELAZIZ Wided	(Maître Assistante «A» - UFM Constantine).

Date de soutenance : 24/06/2018