

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
**Université A. MIRA - Bejaia**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Microbiologie**  
**Filière : Sciences biologiques**  
**Option : Microbiologie Moléculaire et Médicale**



Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

*Thème*

*Détermination de la persistance des souches  
de bacilles à Gram négatif multirésistantes  
isolées de l'environnement hospitalier*

Présenté par :

**Hammad Anis & Aidrous Siham**

Soutenu le : **14 Juin 2016**

Devant le jury composé de :

M. Amir.A	MCB	Président
Mme. Belhadi K.	MAA	Promotrice
Melle. Mezhoud H.	MAB	Examinatrice

**Année universitaire : 2015 / 2016**

# Remerciements

- ❖ Nous tenons à exprimer notre gratitude et nos remerciements pour le bon dieu le tout puissant de nous avoir donné la force et le courage de terminer nos études
  
- ❖ Nous remercions vivement notre chère promotrice chargée du suivi de ce travail << Mme Belhadi >> pour ces conseils précieux, ses orientations et sa disponibilité.
  
- ❖ Nous remercions aussi les membres de jury qui ont accepté d'examiner et juger notre travail.
  
- ❖ Nous adressons nos remerciement a tous ceux qui ont contribué et toute l'équipe de laboratoire microbiologie
  
- ❖ Ainsi que les enseignants qui ont assuré notre formation pédagogique
  
- ❖ En fin a toute personne ayant contribué de près ou de loin a l'élaboration et l'achèvement de ce travail.

# DÉDICACES

Je dédie ce modeste travail

A

Mes très chers parents,

Qui n'ont pas cessé de m'encourager durant mes études.

Mon frère Massi et ma sœur Milissa

Toute ma famille.

Et toute personne que j'aime et qui m'aime

Ainsi qu'à tous ceux qui ont participé de loin ou de près  
à la réalisation de ce travail.

*Anis*



# **Dédicaces**

**Je dédie ce travail a :**

***A l'homme de ma vie, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études ,et qui a veillée tout au long de ma vie a m'encourager , a me donner l'aide et a me protéger ,mon soutien moral et source de joie et de bonheur, Mon père que j'adore***

***A la lumière de mes yeux, le symbole de tendresse, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur ma vie et ma réussite, Ma chère mère***

***La personne la plus adorable et la plus gentille « « porteur de sac à dot » » .qui ma beaucoup aidée, initiée et conseillé je ne serais jamais lui exprimé mes sincères et profonds remerciements.***

***A mon frère: Mouloud***

***A mes sœurs: Tassaadit, Nadia et Nassima et Samira***

***A Mon adoré vousvous qui n'a pas cessé de m'encourager***

***A mes chers cousins et cousines et toute ma famille.***

***A Mon bras droit Anis kp.***

***A tout mes amis de prêt et de loin, qui m'aiment et qui me respectent: Mouh, Aziz N, Japonais, Aicha Souad hanane , Khouloud , Soraya , thiziri ,rabab***

***A tout la promotion de MMM, SI***

***Enfin, à tous ceux qui sont contribué de près ou de loin a l'élaboration de ce travail.***

***Siham***

## Liste des abréviations

**BHIB:** Brain Heart Infusion Broth

**Cd:** Cadmium

**Hg:** Mercure

**LPS:** Lipopolysaccharides

**PIA:** Polysaccharide Intercellular Adhesin

**Pb :** Plomb

**RCA:** Rouge Congo Agar

**TM:** Méthode tube

**Zn:** Zinc

**CHU:** Centre Hospitalier Universitaire

**CMI :** Concentration Minimal Inhibitrice

**BLSE :** B-lactamase à Spectre Elargi

**SARM :** *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Effet de la température sur la croissance de <i>K. pneumoniae</i> .....	17
<b>Figure 2</b> : Effet du pH sur la croissance de <i>K. pneumoniae</i> .....	18
<b>Figure 3</b> : Persistance des souches de <i>K. pneumoniae</i> au file du temps dans différent milieux d'eau .....	20
<b>Figure 4</b> : Phénotype de production et non production de slime chez <i>K. pneumoniae</i> sur milieu RCA .....	21
<b>Figure 5</b> : Interprétation de la production de biofilm par la méthode TM.....	22
<b>Figure 6</b> : Croissance des souches de <i>K. pneumoniae</i> à différent concentration en sel de métaux .....	24
<b>Figure 7</b> : Taux de résistance de souches <i>K.pneumoniae</i> aux métaux lourds .....	25
<b>Figure 8</b> : Résultats obtenues pour l'étude des CMI des souches de <i>K.pnemoniae</i> vis-à-vis du désinfectant par la méthode des tubes.....	27

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Caractéristiques des souches de <i>K. pneumoniae</i> isolées de l'environnement hospitalier .....	8
<b>Tableau II</b> : Gammes de pH et températures étudiées selon Obiedat <i>et al.</i> (2014).....	9
<b>Tableau III</b> : Concentration critiques exprimant une résistance ou une sensibilité aux métaux lourds (DhakphalKar et chopad .,1994) .....	12
<b>Tableau IV</b> : Concentrations des métaux lourds utilisées.....	12
<b>Tableau V</b> : Croissances des souches de <i>K.pneumoniae</i> aux différentes températures.....	15
<b>Tableau VI</b> : Effet de la variation du pH sur la croissance des <i>K. pneumoniae</i> .....	17
<b>Tableau VII</b> : Résultats obtenues pour l'étude de persistance des souches de <i>K. pnemoniae</i> aux différentes eaux.....	19
<b>Tableau VIII</b> : Comparaison de deux techniques d'étude de la capacité des souches <i>K. pneumoniae</i> à former un biofilm.....	22
<b>Tableau IX</b> : Concentration minimales inhibitrices et profil de résistance des souches <i>Klebsiela pneumoniae</i> vis -à- vis des métaux lourds.....	23
<b>Tableau X</b> : Détermination de la dilution inhibitrice du désinfectant sur la croissance des souches <i>K. pneumoniae</i> .....	26

## Tableaux en annexes

<b>Tableaux I</b> : Résultats obtenues pour l'étude de persistance des souches de <i>K. pnemoniae</i> aux différentes eaux	
<b>Tableaux II</b> : Préparation des concentrations en sels de métaux lourds	

## SOMMAIRE

Liste des abréviations

Listes des figures

Liste des tableaux

Introduction générale .....1

## Matériel et méthodes

I-Collection des souches étudiées.....8

II-Etude de la capacité des souches de *K. pneumoniae* à survivre et à résisté aux variations des conditions environnementales.....9

II-1 Evaluation du l'effet des variations de températures et du pH sur la croissance des souches de *K. pneumoniae*.....9

II-2 Détermination de la durée de survie de *K. pneumoniae* sur différente eaux (eau distillée, d'eau de robinet, l'eau physiologique).....9

III-Evaluation de la formation de biofilm.....10

III-1 La méthode du Rouge Congo Agar .....10

III-2 La méthode en tube (TM) .....11

IV-Evaluation de la sensibilité des souches *K. pneumoniae* vis-à-vis des substances antibactériennes .....11

IV-1- Les métaux lourds.....11

IV-2-Etudes de l'efficacité d'un désinfectant de surfaces à usage hospitalier sur les croissances des souches de *K. pneumoniae* .....13

## RESULTATS

I-Etudes de persistances des souches de *Klebsiella pneumoniae* aux déférentes variations environnementales

I-1-Détermination du l'effet de la température sur la croissance des souches de *K. pneumoniae* .....15

I-2-Détermination d'effet des variations de pH sur la croissances des souches de *Klebsiella pneumoniae* .....17

<b>I-3-Détermination de la durée de survie de <i>K. pneumoniae</i> dans différentes eaux : Eau distillée, eau de robinet et l'eau physiologique.....</b>	<b>19</b>
<b>II- Détermination de la capacité des souches de <i>K. pneumoniae</i> à former un biofilm</b>	
<b>II-1- Méthode de Rouge Congo Agar (RCA) .....</b>	<b>21</b>
<b>II-2-Méthode des tubes TM.....</b>	<b>22</b>
<b>II-3-Corrélations entre les deux méthodes RCA et TM.....</b>	<b>22</b>
<b>III-Etudes de la résistance des souches du <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux agents antimicrobiens métaux lourds et au désinfectant hospitalier</b>	
<b>III-1-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) aux métaux lourds.....</b>	<b>23</b>
<b>III-2-Phénotypes de résistance aux métaux lourds.....</b>	<b>25</b>
<b>III-3-Etude de sensibilité des souches de <i>K. pneumoniae</i> au désinfectant hospitalier par la méthode des tubes.....</b>	<b>25</b>
<b>Discussions .....</b>	<b>28</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>33</b>

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

### Introduction

L'hôpital est un lieu où l'on traite mais c'est également un lieu où le risque d'infection est très important et où les germes deviennent de plus en plus résistants. De ce fait, les infections contractées au niveau de l'hôpital sont reconnues comme des problèmes majeurs de santé publique de par leur fréquence, leur coût et leur gravité qui touche aussi bien les patients et leurs entourages que l'ensemble des professionnels de santé (**Hosein et al., 2002**).

Les surfaces inertes ou vivantes jouent un rôle important dans les infections nosocomiales, elles sont régulièrement colonisées par des microorganismes qui sont d'origines divers et peuvent être issus des patients, du personnel soignant ou des visiteurs (**Méité et al., 2010**). Elles constitueraient donc une niche écologique de bactéries multirésistantes pouvant être un réservoir à partir duquel différentes infections peuvent se développer (**Zenati et al., 2016**). La survie et éventuellement la multiplication de ces bactéries conditionnent la nature, l'importance de la colonisation environnementale et la capacité de l'environnement à devenir un réservoir dans lequel le microorganisme persiste et peut être transmis (**Talon, 1999**).

Les microorganismes responsables des infections nosocomiales peuvent persister sur des surfaces sèches inanimées pendant plusieurs mois. Dans l'ensemble, les bactéries à Gram positifs telles qu'*Enterococcus* spp. *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) et *Streptococcus* sp. peuvent survivre pendant plusieurs mois (4 à 7 mois) sur ces dernières (**Neely et Maley, 2000**). Par contre les bacilles à Gram négatif telles que *Acinetobacter* spp., *E. coli*, *Klebsiella* sp., *P. aeruginosa*, *S. marcescens* ou *Shigella* sp. peuvent aussi survivre pendant 5 semaines à 30 mois sur ces dernières (**Bloomfield et Scott, 1997**). Ces espèces se trouvent généralement parmi les plus fréquemment isolées de patients présentant des infections nosocomiales (**Kramer et al., 2006**).

*K. pneumoniae* est un bacille à Gram négatif aéro-anaérobie facultatif, de 0.3 à 1.0µm de diamètre sur 0.6 à 6µm de longueur et se présentant de manière isolée, ou groupés par deux ou en courtes chaînes (**Sekhri, 2011**). Elle se développe sur les milieux classiques d'isolement pour entérobactéries ( Drigalski, Hektoen, Mac Conkey, EMB) et présente des colonies rondes bombées, d'aspect plus ou moins muqueux lisses, brillantes, parfois filantes à l'anse de platine après 18 à 24 h d'incubation à 37°C, et présentant les caractères généraux de la famille des *Enterobacteriaceae* (**Clave, 2013**). Elle est naturellement présent dans l'environnement

naturel (l'eau, le sol et les végétaux) (**El Fertas et al., 2012**), dans le tractus gastro-intestinal, dans les cavités naturelles de l'homme (**Bellifa et al., 2016**) et elle persiste dans l'environnement hospitalier sur les surfaces et les dispositifs médicaux et de ce fait elle peut être facilement transmise entre les patients et le personnel soignant (**Azimi et al., 2015**).

*K. pneumoniae* est un pathogène opportuniste qui infecte les patients immunodéprimés hospitalisés ou souffrant de maladies sous-jacentes graves. Ces infections bactériennes peuvent conduire à des complications, y compris les infections des voies urinaires, les septicémies et les pneumonies chez les personnes âgées ou chez les patients présentant des facteurs prédisposants (**Bellifa et al., 2016**). Alors qu'elles étaient limitées à l'environnement hospitalier, ces bactéries multirésistantes sont devenues un problème majeur d'infections communautaires touchant des personnes ayant peu ou pas de contact avec l'environnement hospitalier, leur émergence n'a cessé d'augmenter un peu partout dans le monde (**Philippon et Arlet., 2006**).

La majorité des souches de *K. pneumoniae* produit une capsule de nature polysaccharidique ; elle donne aux colonies sur gélose une apparence plus ou moins muqueuse caractéristique, Sur les 82 antigènes capsulaires, 77 constituent une base de reconnaissance internationale (**Sahly et al., 2007**). Les souches les plus souvent pathogènes pour l'homme et les animaux appartiennent aux types capsulaires k1 et k 2, plus rarement k 3 et k 4. (**Hennequin et al., 2012**). Les souches de sérotype k 1 sont hyper muqueuses et deux gènes sont impliqués dans la synthèse de la capsule. Le gène mag A (mucoviscosity-associated gen A) se caractérise par un étirement de la colonie provoquant la formation d'un file de plus 5 cm de longueur. Le deuxième gène, rmpA (regolator of mucoïd phynotype) est associé aux infections invasives et qui active la synthèse d'un polysaccharide extracellulaire différent de la capsule et participe aux caractères hypermuqueux des isolats (**Chikhani, 2012**).

La capsule confère à *K. pneumoniae* un fort pouvoir invasif en protégeant la bactérie de la phagocytose. Les LPS qui sont formés de lipide A de structure oligosaccharidique, et qui correspondent à l'endotoxine des bactéries à Gram négatif et participe au pouvoir pathogène. Sa libération massive dans la circulation au cours des bactériémies conduit au choc endotoxinique, et l'antigène "O" qui est le composant du lipopolysaccharide et dont 9 types ont été identifiés (**Chikhani, 2012**).

Différentes adhésines ont été mises en évidence chez *K. pneumoniae*. Le terme d'adhésine est utilisé pour la dénomination de molécules variées impliquées dans l'adhésion des bactéries aux cellules de l'hôte. Ces molécules jouent un rôle essentiel dans la première étape du processus infectieux. Les propriétés d'adhésion des entérobactéries sont généralement médiées par différents types de pili ou fimbriae, dans deux types les plus rencontrés chez cette espèce sont : des fimbriae de type 1 et 3 (**Hennequin et al., 2007 ; Stahlhut et al., 2012**).

-Les fimbriae de type 1 sont les mieux connus et sont présents chez la majorité des entérobactéries. Ils ont la plus grande capacité d'adhésion. Ils sont impliqués dans la colonisation des tractus respiratoire et urinaire (**Struve et al., 2008**).

- Les propriétés des fimbriae de type 3 sont moins bien connues. Ils sont impliqués dans l'adhésion de *K. pneumoniae* à différents types cellulaires, par exemple aux épithéliums urinaire et respiratoire, du fait que ces structures semblent avoir un rôle dans la formation du biofilm (**Sebghati et al., 1998**).

Les souches de *K. pneumoniae* sont aptes à synthétiser des sidérophores (systèmes de chélation du fer) de type aérobactine (hydroxamate) et entérochéline (phénolate) qui favorisent la multiplication bactérienne dans les tissus. (**Sekhri, 2011**).

La famille la plus importante des antibiotiques utilisée en médecine humaine est la famille des  $\beta$ -lactamines qui ciblent la paroi bactérienne et se fixe sur les PLP (Protéines de liaison aux pénicillines) afin d'inhiber la synthèse du peptidoglycane. Des mécanismes de résistance ont été développés chez les bactéries, parmi les quelles la production d'une enzyme dite  $\beta$ -lactamase qui dégrade les  $\beta$ -lactamines (**Cavallo et al., 2004**). Elles peuvent être classées en deux groupes sur la base des différences dans leur mécanisme catalytique : les  $\beta$ -lactamases à serine qui sont subdivisées en trois classes moléculaires A, C et D et les méthallo- $\beta$ -lactamases (classe B) qui ont une activité liée à la présence d'un ou deux ions  $Zn^{+2}$  dans leur site actif (**Bushe et Jacob, 2010**).

La classe A inclut les pénicillinases, inhibées par l'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam, telle que les BLSE de type CTX-M, les oxacillinases comme l'OXA-11 de classe D et les nouvelles carbapénémases KPC ; la classe B rassemble les méthalloenzymes résistantes à l'acide clavulanique mais inhibées par l'EDTA ; la classe C regroupe les céphalosporinases (AmpC) insensibles à l'acide clavulanique, mais inhibée par la cloxacilline comme l'enzyme CMY et FOX ; la classe D rassemble les oxacillinases, hydrolysant la

cloxacilline et peu être inhibées par l'acide clavulanique, elle constitue une famille extrêmement composite en terme des spectre d'hydrolyse tel que l'OXA-1 (**Bush et Jacoby, 2010**).

*K.pneumoniae* présente une résistance naturelle de bas niveau aux pénicillines par la production des pénicillinases fortement inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam. Ces enzymes appartiennent au sous-groupe 2b selon la classification fonctionnelle de Bush-Jacoby et de la classe A selon la classification d'Ambler (Bush et Jacoby, 2010). Ces dernières sont des B-lactamases chromosomique SHV-1 (**Chaves et al., 2001 ; Haeggman et al., 2004**). Hydrolysant certaine B-lactamines telle que l'ampicilline, la ticacilline (**Bonnet, 2006**).

L'association de multiples mécanismes de résistance (efflux, imperméabilité, inactivation enzymatique) crée à son tour des bactéries multirésistantes comme par exemple les souches de *K.pneumoniae* qui présentent une aptitude particulière à acquérir des plasmides déterminants la production de BLSE (**Abid et al., 2006**). des nouvelles  $\beta$ -lactamases de type CTX-M a été décrite chez *K.pneumoniae* dans plusieurs pays, parmi les quels, le CTX-M-1 retrouvé en Algérie et en l'inde (**Nedjai et al., 2012 ; Parveen et al., 2012**). Le CTX-M-15 décrit au Japan et au Canada (**Kanamori et al., 2011 ; Denisuik et al., 2013**). Dans une étude réalisée en Algérie sur la contamination de l'environnement hospitalier par des entérobactéries de  $\beta$ -lactamases au niveau de deux hôpitaux, cinq souches sont des *K.pneumoniae* isolées des surfaces inanimées et des services (**Touati et al., 2007**).

La plupart des microorganismes dans la nature favorisent un mode de vie en communautés où se trouvent fixées sur un support plutôt que libre et isolées dans le milieu environnemental. L'attachement sur une surface est une « stratégie de survie » qui permet à la bactérie de s'installer et de coloniser un environnement (**Fillox et al., 2003**). L'état planctonique pourrait se réduire au passage de la bactérie d'une surface à l'autre (**Donlan, 2001**). Après attachement sur un support, les bactéries vont mettre en place et développer une communauté organisée à laquelle William Costerton a donné le nom de « biofilm » (**Fillox et al., 2003**).

Le biofilm est un ensemble de microorganismes, formé de la même espèce ou d'espèces différentes, qui vivent en symbiose et forment une communauté. Il est constitué d'un ensemble de cellules et de microcolonies associées entre elles et à des surfaces biotiques (peau, tube digestif des animaux ou racines et feuilles des plantes) et abiotiques (roche,

canalisation, surface alimentaires ou prothèse, cathéter, valves cardiaques) (**Branger et al., 2007**).

La formation d'un biofilm et sa croissance ultérieure se produit souvent en même temps que la production d'un vaste réseau de polymères exo-cellulaires (exopolysaccharides) adhésives et protectrice qu'elles sécrètent, c'est une structure vivante en perpétuel remaniement qui facilite l'adhésion des bactéries aux cellules filles et à la surface (**Bellifa, 2016**).

Les bactéries semblent initier la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale telle que le manque d'oxygène et de nutriments (**Annous et al. 2009**). Les biofilms peuvent se développer sur une grande variété de surfaces incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, ou tout autre support retrouvé dans le sol ou dans les milieux aquatiques. On distingue généralement cinq étapes de formation de biofilm : l'adhérence réversible, l'adhérence irréversible, le développement précoce du biofilm, la maturation du biofilm et le détachement des bactéries (**Talaro, 2008**).

Le biofilm et la source d'infection nosocomiale persistante, y compris les infections des voies respiratoires supérieures, urogénitales, et elles sont difficiles à traiter car le biofilm et comme un bouclier qui protège les bactéries contre les agents antimicrobiens (**Afreenish, 2011**). Pour prévenir les infections nosocomiales et assurer l'hygiène des surfaces, l'utilisation de traitements nettoyants/désinfectants efficaces est essentielle. Si l'élimination des cellules à l'état planctonique semble satisfaisante, elle est moindre et non normalisée dans le cas des cellules sous forme de biofilm (**Chihib et al., 2012**). Les hôpitaux utilisent une grande quantité de désinfectants et détergents afin d'éliminer les micro organismes pathogènes (**Dettenkofer, 2004**).

Les biofilms présentent une résistance aux antibiotiques, par diverses méthodes telles que la limitation de la pénétration de l'antibiotique à l'intérieur du biofilm, diminution du taux de croissance et l'expression de gènes de résistances (**Amy et Kim, 2001**). Les biofilms sont enfermés dans une matrice d'exopolymère qui peut limiter la diffusion des substances et des agents antimicrobiens. Les exopolysaccharides chargés négativement sont très efficaces dans la protection des cellules contre les antibiotiques chargés positivement tel que les aminoglycosides (**Amy et Kim, 2001**). Les fluoroquinolones pénètrent facilement (petite taille) à l'intérieur du biofilm et les pompes d'efflux représentent un mécanisme de résistance général et peuvent être impliquées dans la résistance aux agents antimicrobiens des biofilms (**Amy et Kim, 2001**).

La majorité des désinfectants exercent leur action essentiellement au niveau de la membrane cytoplasmique et doivent donc traverser la paroi. Les bactéries à Gram négatifs (*Pseudomonas aeruginosa*) sont ainsi plus résistantes que les bactéries à Gram positifs. Les mycobactéries (*Mycobacterium tuberculosis*), dont la membrane externe est très épaisse, sont encore plus résistantes. La formation de biofilm est également un mécanisme de résistance (**Massicotte et al., 2009**). Les surfaces sont pour cette raison nettoyées et désinfectées quotidiennement en général ou plusieurs fois par jour dans certains locaux. Deux techniques sont généralement proposées :

- soit un « bionettoyage en trois temps » qui impose une étape de nettoyage utilisant un détergent, une étape de rinçage à l'eau claire suivie de l'application d'un désinfectant
- soit le « bionettoyage en un temps » avec un produit dit détergent désinfectant qui s'utilise en une seule application (**Rouillon et al., 2006**).

Les métaux lourds sont présent dans tous les compartiments de l'environnement, à la fois parce qu'ils sont naturellement présents et proviennent de la dégradation des roches ou des émissions volcaniques (sources naturelles) ou parce que certaines activités minières et industrielles de l'homme favorisent leur dispersion (source anthropique) (**Amir, 2005**). On distingue les métaux ayant un rôle biologique, ils sont essentiels et nécessaires à de faibles doses, ce sont les oligo-éléments comme le fer, qui est présent dans de nombreux cytochromes. D'autres, par contre sont non essentiels et éventuellement toxique (plomb et Argent). Cependant, même les métaux essentiels peuvent devenir toxiques s'ils sont présents à de fortes concentrations, on parle alors d'effet antagoniste (**Nies, 1999**).

Ces composés provoquent divers effets nuisibles tels que l'allongement de la phase de latence, l'inhibition des activités enzymatiques, l'altération de la structure de l'ADN, la modification de la composition et de la structure des populations microbiennes, et la réduction de la diversité microbienne (**Habi, 2009**).

Les bactéries ont développés une résistance aux métaux que se soit sur le plan génétique ou biochimique. Elle peut être codée par le chromosome, le plasmide ou le transposon avec l'implication d'un ou de plusieurs gènes. Au niveau biochimique, les microorganismes montrent une diversité dans les types de mécanismes de résistances qui se produisent seuls ou en diverses combinaisons (**Rouch et al., 1995**). Le Système d'efflux représentent la catégorie la plus importante des mécanismes de résistance aux métaux chez les bactéries (**Monchy, 2007**). En exportons les métaux toxiques des cytoplasmes. (**Bruins et al.,**

**2000**). La Résistance par séquestration consiste en l'accumulation de métaux lourds dans le cytoplasme pour éviter une exposition aux composants cellulaires essentiels (**Silver et Phung, 1996**). la résistance par imperméabilité comprend la modification de la structure de la paroi cellulaire, de la membrane ou de l'enveloppe des microorganismes (**Bruins et al., 2000**).

Aujourd'hui malgré tous les efforts qui sont entrepris pour améliorer l'hygiène hospitalière, les infections nosocomiales posent encore un risque important pour les patients (**Dettenkofer, 2004**). *Klebsiella pneumoniae* présente une multirésistance aux antibiotique et constituant l'une des problématiques actuelles au niveau des structures hospitalières en raison de leur diffusion et leur virulence (**Natoubi et al., 2012**).

L'ampleur des infections nosocomiales est liée à la capacité des souches à survivre plus ou moins longtemps dans l'environnement hospitalier (surface, paillasses, sol...). Dans cette optique que nous avons étudié la capacité des souches de *K. pneumoniae* à persister et à survivre aux différentes variations des conditions environnemental à travers l'étude de :

- 1- L'effet de la température et du pH sur la croissance des souches de *Klebsiella pneumoniae*
- 2- Détermination de la durée de survie des *K.pneumoniae* dans différentes milieux dépourvus de nutriment (eau distillée, d'eau de robinet, l'eau physiologique)
- 3- Capacité des souches à former un biofilm
- 4- Etude de la sensibilité des souches de *k.pneumoniae* aux métaux lourds sur milieux solide
- 5- Détermination de l'efficacité d'un désinfectant de surface sur la croissance des souches *K.pneumoniae*.



## Matériel et méthodes

Cette étude est réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie de l'Université A. MIRA – Bejaia, durant une période de trois mois allant du mois du Février jusqu' au mois d'Avril 2016.

### I: Collection de souches étudiées:

Les 20 souches de *Klebsiella pneumoniae* étudiées font partie d'une collection de souches d'entérobactéries appartenant au laboratoire d'Ecologie Microbienne. Ces souches sont isolées à partir des surfaces de l'environnement hospitalier au niveau de 3 CHU (Sétif, Béjaia et Constantine) par Mme BELHADI entre 2012 et 2014 dans le cadre de la préparation d'une thèse de doctorat.

Les souches de *K. pneumoniae* sont ré-isolées à partir des tubes de conservation sur gélose Mac Conkey ou gélose nutritive puis incubés à 37°C pendant 24h. Le tableau I regroupe la caractérisation moléculaire des gènes de résistance au  $\beta$ -lactamines et des Séquence Type (ST) ainsi que les données concernant les sites, l'année et les lieux d'isolement de ces souches.

**Tableau I : Caractéristiques des souches de *K. pneumoniae* étudiées**

Code	Hôpital	Services	Date	Sites d'isolement	Gènes de résistances aux $\beta$ -lactamines	ST
BAR80A	Bej	Réanimation	2013	Stéthoscope	CTX-M-15,TEM-1,SHV	147
BAR32A	Bej	Réanimation	2013	Table de chevet	CTX-M-15,TEM-1,SHV	147
BAR100	Bej	Réanimation	2013	Interrupteur	CTX-M-15,TEM-1,SHV	147
BAR1	Bej	Réanimation	2013	Bordure du lit	CTX-M-15,TEM-1,SHV	147
BAR34	Bej	Réanimation	2013	Poignée de porte	CTX-M-15,TEM-1,SHV	147
AR16A	Bej	Réanimation	2013	Interrupteur	CTX-M-15,TEM-1,SHV	147
AR16B	Bej	Réanimation	2013	Poignées de porte	CTX-M-15,TEM-1,SHV	147
CINF6	Const	Infectieux	2014	Drap	CTX-M-15,TEM-1,SHV	147
MI157	Const	Médecine	2014	Téléphone	CTX-M-15,SHV	147
MIF13B	Const	Médecine	2014	Robinet de la salle d'eau	CTX-M-15,TEM-1,SHV	147
SR75	Sétif	Réanimation	2013	Drap	CTX-M-15,TEM-1,SHV	20
MI203	Sétif	Médecine	2012	Table de chevet	CTX-M-15,TEM-1,SHV	23
MI30	Sétif	Médecine	2012	Interrupteur	CTX-M-15,SHV	1426

Code	Hôpital	Services	Date	Sites d'isolement	Gènes de résistances aux $\beta$ -lactamines	ST
MI35R	Sétif	Médecine	2012	Poignées de porte	CTX-M-15,SHV	1426
MI29	Sétif	Médecine	2012	Poignées de porte	CTX-M-15,SHV	1426
MI28	Sétif	Médecine	2012	Table de chevet	CTX-M-15,SHV	1426
MI27	Sétif	Médecine	2012	Bordure du lit	CTX-M-15,SHV	1426
MI26	Sétif	Médecine	2012	Drap	CTX-M-15,SHV	1426
BAR91	Bej	Réanimation	2013	Poignées de porte	CTX-M-15,TEM-1,SHV	1426
CINF94	Const	Infectieux	2014	Drap	CTX-M-15,SHV	1426

## **II-Etude de la capacité des souches de *Klebsiella pneumoniae* à survivre et à résister aux variations des conditions environnementales.**

### **II-1 : Evaluation de l'effet des variations de température et du pH sur la croissance des souches de *K. pneumoniae***

Selon les travaux de **Obiedat et al.,( 2014)** 6 gammes de Températures et 5 gammes de pH sont choisies pour étudier l'effet des variations environnementales sur la croissance des souches *K.pneumoniae*. Les différentes souches *K.pneumoniae* sont repiquées sur une gélose nutritive par la méthode des stries, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune. Les colonies ont servi à préparer une suspension bactérienne.

#### **a- Préparation de la suspension bactérienne et ensemencement des boîtes**

Une seule colonie de chaque souche est ajoutée à 10 ml de bouillon nutritif. La suspension bactérienne obtenue est étalée sur une gélose nutritive à l'aide d'une anse en plastique (10ul) afin de déterminer l'effet des variations environnemental (température et pH) sur la croissance et de déterminer la capacité de ces dernières à persister sur des surfaces inertes hospitalières. La présence ou l'absence de la croissance ainsi que l'aspect des colonies est notée pour chaque souche après incubation à différentes températures, et à 37°C pour le pH pendant 24h .Les gammes de température et de pH testées sont représentées dans le tableau II.

Tableaux II: Gammes de pH et de températures étudiées selon Obiedat *et al.*,(2014)

Paramètres	Les gammes testées					
pH	4,5	5,1	6,1	7,1	8,1	
T°	18°C	22°C	24°C	28°C	37°C	44°C

## II-2 Détermination de la durée de survie de *K. pneumoniae* sur différentes eaux (eau distillée, d'eau de robinet, l'eau physiologique)

A partir des cultures jeunes de 18 h, une colonie de chaque souche est suspendue dans 10ml de milieu à tester (eau distillée, eau de robinet, eau saline [Na Cl] à 9g/ml). Après 24h d'incubation à 37°C, un ensemencement sur gélose PCA est effectué pour chaque milieu et chaque souche.

Les milieux sont ré-incubés encore 24h puis ensemencés sur la gélose PCA jusqu'à épuisement du nombre de colonies sur les boîtes de Pétri. La viabilité des *K. pneumoniae* est présentée comme importante si le nombre de colonies était inférieur ou égal à 10 unités formant colonies et mineure si le nombre était plus de 50 unités formant colonies (Obiedat *et al.*,(2014).

## III-Evaluation de la formation de biofilm

### III-1 La méthode du Rouge Congo Agar

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

#### a- Préparation de la gélose à base de Rouge Congo

Le milieu est préparé avec 38g/L de bouillon cœur cerveau (BHIB), 20g/L de saccharose, 0,8 g/L de Rouge Congo et 10 g/L d'agar. Le milieu est autoclavé à 115°C pendant 15 minutes puis les boîtes sont coulées, séchées et ensemencées avec des colonies jeunes de 24h.

**b- Lecture**

Après 24 heures d'incubation à 37°C, la production de slime est caractérisé par l'apparition de colonies noires à surface rugueuse contre des colonies rouges à surface lisse pour les souches non productrices (**Ziebuhr et al., 2001**). Les souches de phénotypes variables donnaient des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir (**Nasr et al. 2012**).

**III-2 La méthode en tube (TM)**

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

**a- Technique :**

A partir d'une culture de 18-24h, on ensemence une colonie dans 10 ml de BHIB supplémenté de 1% de saccharose. Après 24h d'incubation à 37°C, les tubes sont lavés avec du tampon phosphate salin (PBS) (pH=7,2) puis séchés. Chaque tube est ensuite coloré avec le cristal violet (0,1%) pendant 15 minutes. L'excès du colorant est enlevé et les tubes sont lavés une autre fois avec l'eau distillée stérile, puis séchés (**Afreenish et al., 2011**).

**b- Lecture :**

La formation du biofilm est considérée positive quand un film visible double la paroi et le fond du tube. La formation d'un anneau à l'interface liquide n'est pas indicative de la formation du biofilm (**Mathur et al., 2006**).

**IV-Evaluation de la sensibilité des souches *K. pneumoniae* vis-à-vis des substances antibactériennes**

**IV-1 Les métaux lourds**

Les métaux lourds utilisés sont choisis selon leur utilisation comme oligo-éléments (zinc) dans le déroulement des processus biologiques et d'autres ne sont pas nécessaires à la vie mais utilisés comme détergents, désinfectants et dans l'industrie (mercure, plomb, cuivre cadmium) surtout en milieu hospitalier (**Casas, 2005**).

Ces métaux sont utilisés sous forme de sels hydrosolubles. Pour évaluer la sensibilité des souches de *K. pneumoniae*, nous avons tenu compte des travaux de Dhakphalkar et chopad

(1994). Les souches qui poussent à des concentrations supérieures aux valeurs critiques (Tableau III) sont considérées résistantes (**Dhakphalkar et chopad, 1994**).

Tableau III : Concentrations critiques exprimant une résistance ou une sensibilité aux métaux lourds (**Dhakphalkar et chopad ,1994**).

Métaux	Concentrations critiques (mM) (Cc)	Concentrations critiques (µg/ml) (Cc)
Hg	0,1	20,6
Cu	10	635
Zn	10	654
Pb	10	2072
Cd	1	112,4

CMI > Cc : souche résistante, CMI < Cc : souche sensible, Cc : concentration critique

#### a- Détermination des concentrations minimales inhibitrices vis-à-vis des métaux lourds

Les concentrations en sels de métaux utilisés pour la préparation des solutions mères sont les suivantes :

- Sulfate de cuivre (II) (CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O)= 0,5g /ml
- Acétate(II) de plomb : Pb(OOCCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 3H<sub>2</sub>O)=0,1g/ml
- Sulfate de cadmium :(3CdSO<sub>4</sub>, 8H<sub>2</sub>O)=0,1g/ml
- Chlorure de mercure (II) :(HgCl<sub>2</sub>)=10g/ml
- Sulfate de zinc :(ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O)=0,5g/ml

A partir des solutions initiales de sels de métaux lourds, des volumes bien déterminés sont prélevés et ajustés avec le milieu Mueller Hinton en surfusion à un volume final de 140ml. Les Concentrations et volumes nécessaires pour la préparation des différentes solutions est donnés dans le tableau IV :

Tableau IV : Concentrations des métaux lourds utilisées

Métaux	Concentrations (µg /ml)					
Hg	10	20.06	30	40	80	160
Cu	400	635	800	2400		
Pb	1000	1500	2072	2500	3000	
Cd	50	100	112.4	150	200	400
Zn	200	400	654	800	1000	

Dans une éprouvette stérile de 100ml, des volumes de la solution mère sont introduits puis compléter à 140ml avec de la gélose Muller Hinton en surfusion pour avoir les concentrations finales voulues. Le milieu est ensuite reparti dans des flacons puis autoclavés à 120°C pendant 20 minutes. Après homogénéisation, une série de boîtes de Pétri est coulée pour chaque concentration puis séchée.

Une suspension bactérienne préparée a été utilisée pour ensemercer en spot et à raison de 10µl les différents milieux. Ainsi, trois répétitions sont réalisées pour chacune des concentrations.

Après incubation à 37°C/24h, la présence ou l'absence d'une croissance est notée pour chaque souche et pour chaque concentration en sels de métaux. Ainsi, la concentration minimale inhibitrice correspondant pour chaque métal est déterminée par la plus faible concentration inhibant la croissance des souches étudiées (**Deshpand et al., 1993**).

### **IV-2 Etudes de l'efficacité d'un désinfectant de surfaces à usage hospitalier sur la croissance des souches de *K. pneumoniae***

#### **a- Caractéristique du désinfectant étudié:**

ANIOS DVA HPH est un détergent-désinfectant pour les surfaces et dispositifs médicaux, nettoyé par voie aérienne, et réunissant trois principes actifs antimicrobiens : Ethanol (222,4 mg/g), didecyldiméthylammonium chloride, phenoxyethanol, N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine. Il est utilisé à l'hôpital pour le nettoyage des sols et des surfaces.

#### **b- Préparation des suspensions bactériennes :**

Les souches bactériennes sont ensemençées sur gélose Mac Conkey et à partir d'une colonie, un bouillon nutritif de 5ml est ensemençé puis incubé à 37°C pendant 24h.

Soixante microlitres (60µl) de la culture sont repiqués dans un bouillon nutritif de 2 ml, et incubé à 37 °C pendant deux heures pour obtenir une culture en phase exponentielle de croissance. 200µl de cette culture sont ajoutés à 1,8 ml de bouillon nutritif à 37 °C pour obtenir la suspension de travail. (**Rouillon et al., 2006**).

**c-Préparation des dilutions du désinfectant:**

On prend 50 µl du désinfectant brute et on ajoute 9.95ml d'eau distillée pour avoir la dilution 1/200, puis on Prend 2ml de cette dilution est l'ajoutée a 2ml d'eau distillée afin d'obtenir la dilution 1/400.et on effectue la même chose pour obtenir la dilution 1/800, 1/1600, 1/3200 et 1/6400.

**d-Technique :**

Cette technique nous permet de définir la zone d'activité du désinfectant avec cinq dilutions du ANIOS DVA HPH incluant et encadrant la dilution cible du désinfectant hospitalier (**Rouillon et al., 2006** ).

1,8 ml de la suspension de travail sont distribués dans des tubes à hémolyse puis 200 µl de chaque dilution de désinfectant (de 1/200 à 1/6400) sont ajoutés. Pour chaque souche deux tubes témoins de stérilité sont préparés. Le premier tube contient 1,8ul de la suspension de travaille et 200ul de bouillon nutritif, et le deuxième tube contient 1.8ml de bouillon nutritif et 200 µl du désinfectant.

Les tubes sont incubés à 37 °C pendant 24 heures. Trois répétitions sont réalisées pour chaque dilution. L'absence de trouble du milieu de culture dans deux tubes permet de déterminer la dilution du désinfectant suffisante pour empêcher le développement de la souche étudiée. (**Rouillon et al., 2006**).

## I-Etudes de persistances des souches de *K. pneumoniae* aux différentes variations environnementales

### I-1-Détermination de l'effet de la température sur la croissance des souches de *K. pneumoniae*

Le tableau N°V représente la croissance des souches de *K. pneumoniae* à différentes gammes de températures, on remarque 2 groupes selon l'aspect des colonies et le degré de leurs croissances.

Le premier groupe présente les souches à petites colonies inclut trois souches (Mi 28, Mi 203, Inf94) qui ne montrent aucune croissance à 18°C, et une faible croissance à 20°C et 22°C et une croissance modérées sur les gammes allant de 24°C jusqu'à 44°C. Par contre les souches du deuxième groupe représentent les souches à grandes colonies avec une croissance faible à 18°C, une croissance modérée à 20°C et à 22°C et à partir de 24°C les colonies sont plus volumineuse et plus abondantes avec une forte croissance.

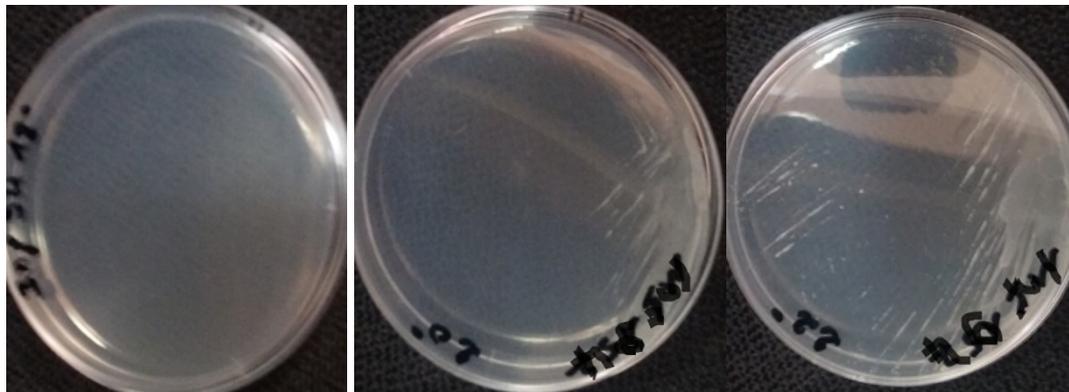
**Tableaux N°V : Croissance des souches de *K. pneumoniae* à différentes températures**

Groupes	Souches	Température TC°					
		18°C	20°C	22°C	24°C	28°C	44°C
G1	Mi 28	-	+	++	++	++	++
	Inf 94	-	+	++	++	++	++
	Mi 203	-	+	++	++	++	++
G2	Mi 27	+	++	++	+++	+++	+++
	Bar 32	+	++	++	+++	+++	+++
	Inf 06	+	++	++	+++	+++	+++
	Sr 75	+	++	++	+++	+++	+++
	Bar 16b	+	++	++	+++	+++	+++
	Bar 80	+	++	++	+++	+++	+++
	Bar 34	+	++	++	+++	+++	+++
	Mi 29	+	++	++	+++	+++	+++
	Bar 100	+	++	++	+++	+++	+++
	Mi 157	+	++	++	+++	+++	+++
	Bar 01	+	++	++	+++	+++	+++
	Mi 26	+	++	++	+++	+++	+++
	Mi 13b	+	++	++	+++	+++	+++
	Bar 91	+	++	++	+++	+++	++ +
	Mi 35	+	++	++	+++	+++	+++
Bar 16a	+	++	++	+++	+++	+++	

- : aucune croissance, + : faible croissance, ++ : croissance modérée, +++ : bonne croissance

La figure 1 montre le taux de croissance des souches de *K. pneumoniae* à différents T°C pour le premier et deuxième groupe

**Groupe : 01**



Inf94 (18°C)

Inf94 (20°C)

Inf94 (22°C)



Inf94 (24°C)

Inf94 (28°C)

Inf94 (44°C)

**Groupe : 02**



Mi157 (18°C)

Mi157 (20°C)

Mi157 (22°C)



Mi 157 (24°C)

Mi 157 (28°C)

Mi 157 (44°C)

**Figure 1 : Effet de la température sur la croissance des souches de *K. pneumoniae***

**I-2-Détermination d'effet des variations de pH sur la croissance des souches de *K. pneumoniae***

Les résultats obtenus pour l'étude de l'effet du pH sur la croissance des souches de *K. pneumoniae* sont résumés dans le tableau N°VI. Les souches du premier groupe montrent une faible croissance avec des petites colonies à pH 5.1 jusqu'à 8.1. Par contre les souches du deuxième groupe présentent une faible croissance à pH 5.1 excepté la souche inf06 qui est modérée vis-à-vis des gammes de pH allant de 6,1 jusqu'à 8.1. En derniers les souches de troisième groupe présentent une forte croissance à pH 5,1 et une croissance modérée à pH 6,1 jusqu'à 8,1. Aucune croissance n'est observée à pH 4,5 pour toutes les souches.

**Tableaux N°VI : Effet de la variation du pH sur la croissance des souches de *K. pneumoniae***

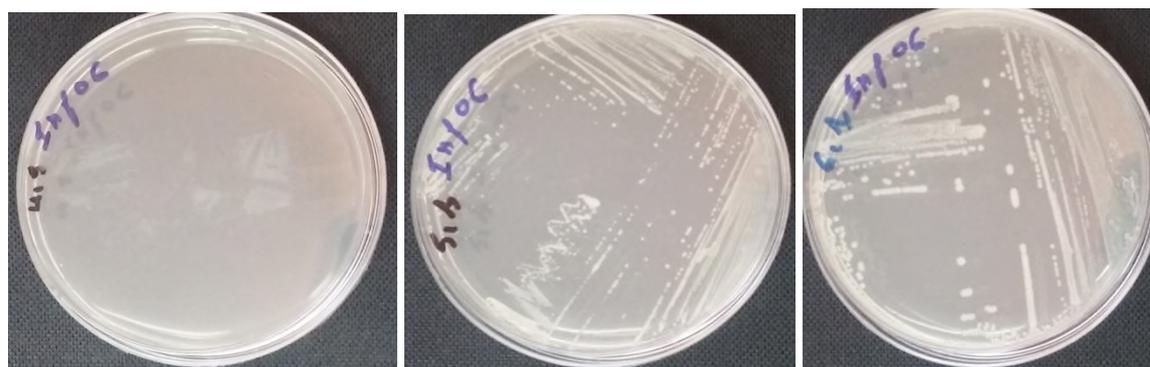
Groupe	Souches	pH				
		4,5	5,1	6,1	7,1	8,1
G1	Mi 136	-	+	+	+	+
	Bar91	-	+	+	+	+
	Mi26	-	+	+	+	+
	Bar01	-	+	+	+	+
	Mi29	-	+	+	+	+
	Bar34	-	+	+	+	+
G2	Mi23	-	+	++	++	++
	Inf06	-	++	++	++	++
	Bar16b	-	+	++	++	++
	Mi157	-	+	++	++	++
	Mi35	-	+	++	++	++
	Bar80	-	+	++	++	++

Tableaux N°VI : Effet de la variation du pH sur la croissance des souches de *K. pneumoniae* (suite)

Groupe	Souches	pH				
		4.5	5.1	6.1	7.1	8.1
Groupe 3	Sr75	-	+++	+	+	+
	Bar100	-	+++	+	+	+
	Mi27	-	+++	+	+	+
	Mi28	-	+++	+	+	+
	Bar16a	-	+++	+	+	+
	Mi30	-	+	+	+	+
	Bar32	-	++	+	+	+
	Inf94	-	++	+	+	+

- : Aucune croissance, + : Faible croissance, ++ : Croissance modérée, +++: Croissance fort

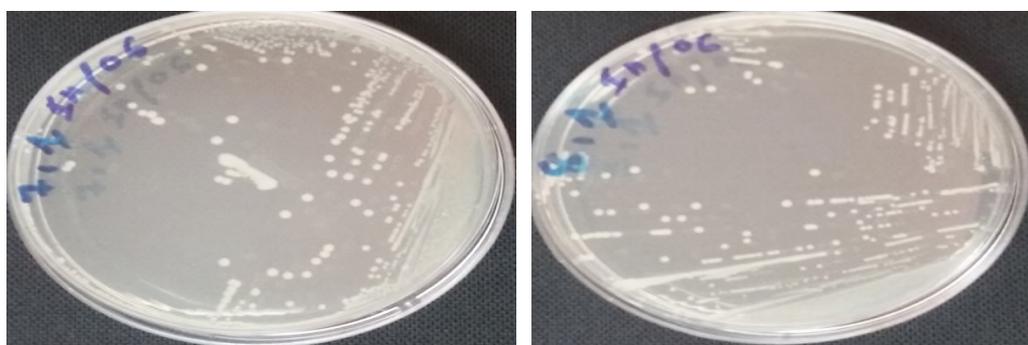
La figure ci-dessous montre le taux et l'aspect de la croissance des souches de *K. pneumoniae* à différents pH testés.



pH 4,5 (inf06)

pH 5,1 (inf06)

pH 6,1 (inf06)



pH 7,1 (inf06)

pH 8,1 (inf06)

Figure 2 : Effet du pH sur la croissance de *K.pneumoniae* de la souche (Inf06)

### I-3 Détermination de la durée de survie des souches de *K. pneumoniae* dans différentes eaux : Eau distillée, eau de robinet et l'eau physiologique

La croissance et la persistance des souches de *K. pneumoniae* dans les différents milieux d'eaux testés a montré une décroissance progressive du nombre de colonies au fil du temps allant entre 50 jours jusqu'à l'absence total de croissance (Tableau annexe N°III).

Leurs durée de survie dans l'eau (physiologique, eau de robinet et eau distillée) est variable selon les souches. On remarque que la durée de survie dans l'eau distillée ne dépasse pas 5 jours pour la souche mi35 et de 4 jours pour la souche bar80. D'autres souches ne croient plus ou bout de 1 jour pour les souches bar16b, bar100, bar32 mi203 et bar91. Par contre dans l'eau de robinet la souche bar80 a persisté 8 jours et 7 souches ont seulement résisté 24h. En revanche la survie des souches de *K. pneumoniae* dans l'eau physiologique est meilleure car elles persistent jusqu'à 10 jours pour la souche Mi29 et la souche Bar34. Par contre les autres souches (Bar 91, Bar 100, Mi 26, Bar01), ont une durée variable allant de 2 jours à 9 jours (tableau N°VII).

**Tableaux N°VII: Persistance des souches de *K. pneumoniae* dans différentes eaux**

Les souches	Durée de survie de <i>K. pneumoniae</i> dans les différentes eaux		
	Eau physiologique	Eau distillée	Eau de robinet
Mi27	-	3 jours	1jour
Mi26	3 jours	2 jours	-
Mi157	2 jours	2 jours	1 jour
Mi35	-	5 jours	6 jours
Bar 91	5 jours	3 jours	7 jours
Bar16b	1jour	1jour	-
Bar100	3 jours	3 jours	2 jours
Bar 32	3 jours	1 jour	5 jours
Bar01	9 jours	1 jour	2 jours
Bar 80	5 jours	4 jours	8 jours
Bar 34	10 jours	2 jours	2 jours
Inf 94	2 jours	2 jours	-
Inf 06	3 jours	1 jour	1 jour
Mi13b	1jour	3 jours	1jour
Mi203	2 jours	1 jour	1 jour
Mi30	-	2 jours	1 jour
Mi28	7 jours	4 jours	5 jours
Mi29	10 jours	3 jours	5 jours
Bar16a	1 jour	2 jours	1 jour
Sr75	-	-	4 jours

La figure ci-dessous montre le taux de croissance des souches de *K. pneumoniae* dans les différents milieux testés au fil des jours



Eau physiologique (1j, Bar100) eau distillée (1j, Bar100) eau de robinet (1j, Bar100)



Eau physiologique (3j, Bar100) Eau distillée (3j, Bar100) Eau de robinet (2j, Bar100)

**Figure 3 : Persistance des souches de *Klebsiella pneumoniae* au fil du temps dans différents milieux d'eaux**

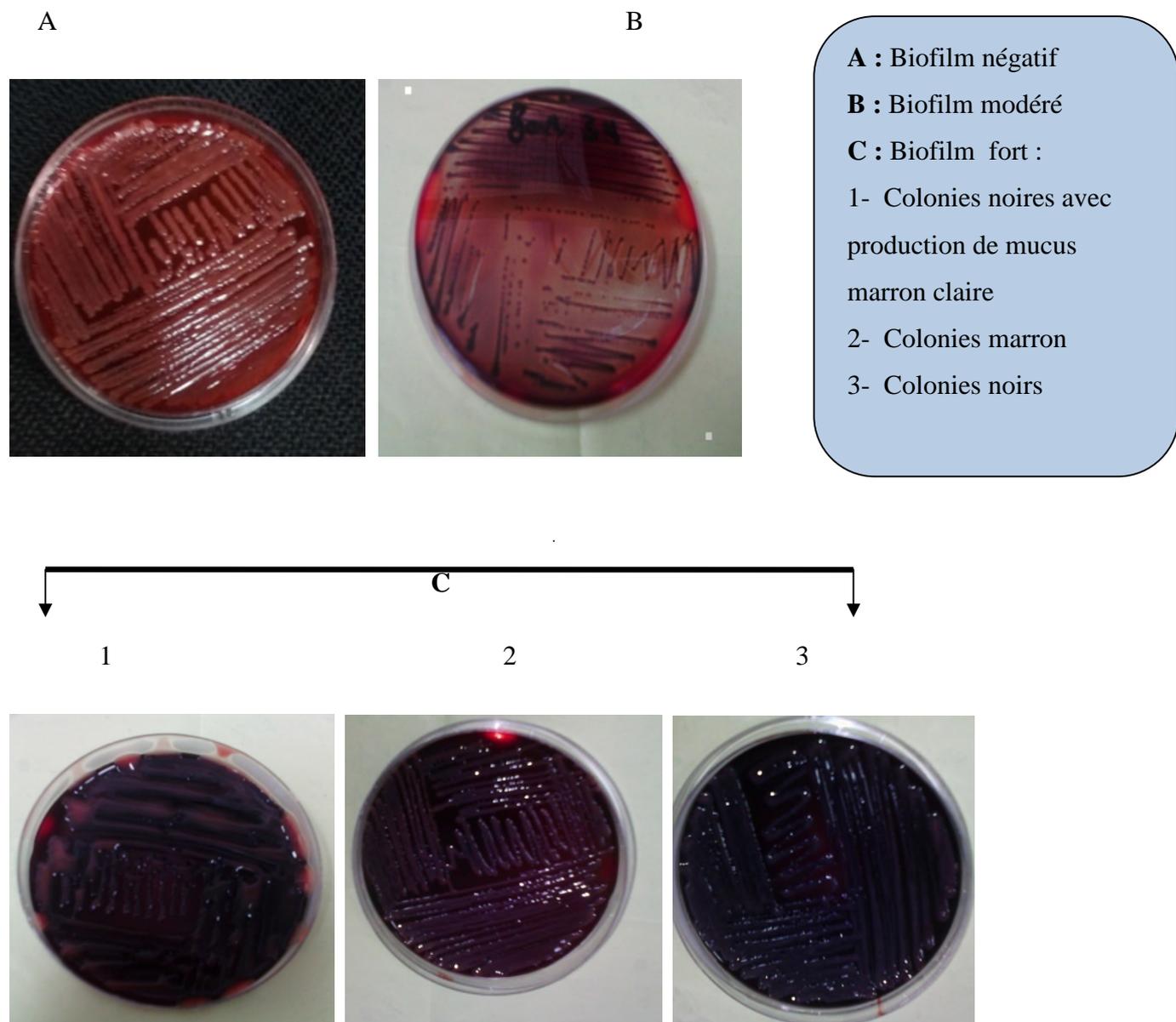
## **II-Détermination de la capacité des souches de *K. pneumoniae* à former un biofilm**

Les souches de *K. pneumoniae* étudiées ont été testées pour mettre en évidence leur capacité à former des biofilms par deux techniques : méthode de Rouge Congo Agar (RCA) et méthode en tube (TM).

### **II-1-Méthode de Rouge Congo Agar (RCA)**

La recherche de la production de slime sur gélose BHIB additionné de Rouge Congo a révélé que 18 souches sont productrices de slime avec deux phénotypes à savoir une

production forte et une production modérée. Uniquement 3 souches (Mi157, Mi26, Mi27) sont négatives (figure 4).



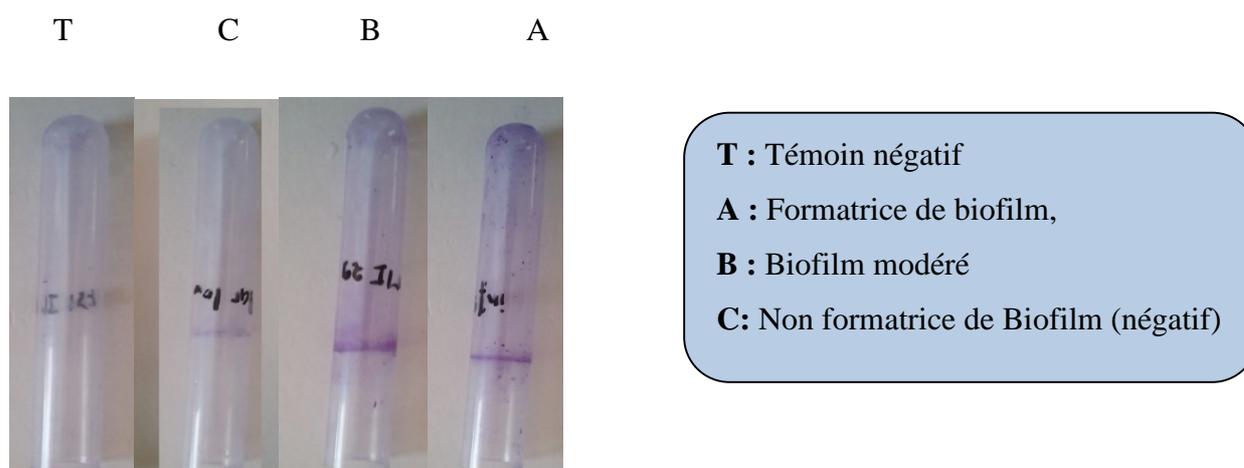
**Figure 4 : Phénotype de production et non production de slime chez *K. pneumoniae* sur milieu RCA**

## II-2-Méthode des tubes (TM)

Selon la technique TM et sur l'ensemble des vingt souches testés, 06 souches sont fortement formatrices de biofilm (C), 13 souches étaient modérément formatrices de biofilm

(B) et une souche est révélée non formatrice de biofilm représenté dans la figure 5 (C, B, A respectivement).

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



**Figure 5** : Interprétation de la production de biofilm par la méthode TM

### II-3-Corrélation entre les deux méthodes RCA et TM

Le tableau ci dessous montre que 13 souches de *K. pneumoniae* ont une capacité modérée à former un biofilms, 6 souches ont une capacité forte et une souche ne forme pas de biofilm par la méthode TM. Par contre la méthode RCA a révélé que 3 souches ne forment pas de biofilm, 12 souches sont modérées et 5 souches sont fortement formatrice de biofilm.

**Tableau N°VIII : Comparaison de deux techniques d'étude de la capacité des souches de *K. pneumoniae* à former un biofilm**

Techniques	Nombres des souches de <i>K. pneumoniae</i>		
	Négatif	Modéré	Fort
<b>TM</b>	1	13	6
<b>RCA</b>	3	12	5

### III-Etudes de la résistance des souches de *K. pneumoniae* aux agents antimicrobiens : métaux lourds et désinfectant hospitalier

#### III-1-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) vis-à-vis des métaux lourds

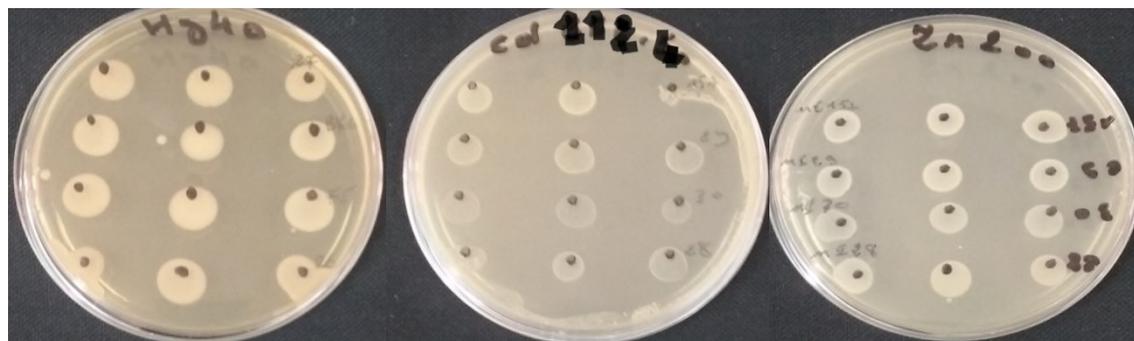
Les 20 souches ont fait l'objet d'une détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) ainsi que l'évaluation de leur résistance vis-à-vis de cinq métaux lourds. Les résultats obtenus montrent que ces souches présentent des CMI variable allant de 112.4 à 150 µg/ml pour le cadmium, de 20.06 à 80 µg/ml pour le mercure, de 200 à 400 µg/ml pour le zinc, de 1000 à 2500 µg/ml pour le plomb, par contre toutes les souches sont inhibées à 400 µg/ml en présence de cuivre (tableaux N°IX).

**Tableaux N°IX : Concentration minimales inhibitrices et profil de résistance des souches *K. pneumoniae* vis -à- vis des métaux lourds**

Souches	Métaux									
	Cu		Hg		Zn		Cd		Pb	
	CMI	S/R	CMI	S/R	CMI	S/R	CMI	S/R	CMI	S/R
<b>MI157</b>	400	S	80	R	400	S	150	R	1500	S
<b>MI 29</b>	400	S	40	R	200	S	112.4	R	1500	S
<b>MI 30</b>	400	S	40	R	200	S	150	R	1500	S
<b>MI 28</b>	400	S	40	R	200	S	150	R	1500	S
<b>MI 27</b>	400	S	40	R	200	s	150	R	1500	S
<b>Bar 16a</b>	400	S	40	R	200	S	150	R	1500	S
<b>Sr 75</b>	400	S	40	R	200	S	112.4	R	1500	S
<b>Mi26</b>	400	S	40	R	200	S	112.4	R	1500	S
<b>Mi35</b>	400	S	40	R	200	S	150	R	2500	R
<b>Bar01</b>	400	s	40	R	200	S	150	R	1500	S
<b>Bar100</b>	400	S	40	R	200	S	112.4	R	1500	S
<b>Bar16b</b>	400	S	40	R	200	S	112.4	R	1500	S
<b>Mi32</b>	400	S	40	R	200	S	150	R	1500	S
<b>Bar 35</b>	400	S	30	R	200	S	150	R	1000	S
<b>Bar 80</b>	400	S	20.06	R	400	S	150	R	1000	S
<b>Mi13b</b>	400	S	20.06	R	200	S	150	R	1500	S
<b>Bar94</b>	400	S	30	R	200	S	150	R	1000	S
<b>Mi203</b>	400	S	40	R	200	S	112.4	R	1500	S
<b>Inf 91</b>	400	S	40	R	200	S	112.4	R	1500	S
<b>Inf 06</b>	400	S	40	R	200	S	150	R	1500	S

Les concentrations sont exprimées en µg/ml Hg : mercure, Cu : cuivre, Zn : zinc, Pb : plomb, Cd : cadmium

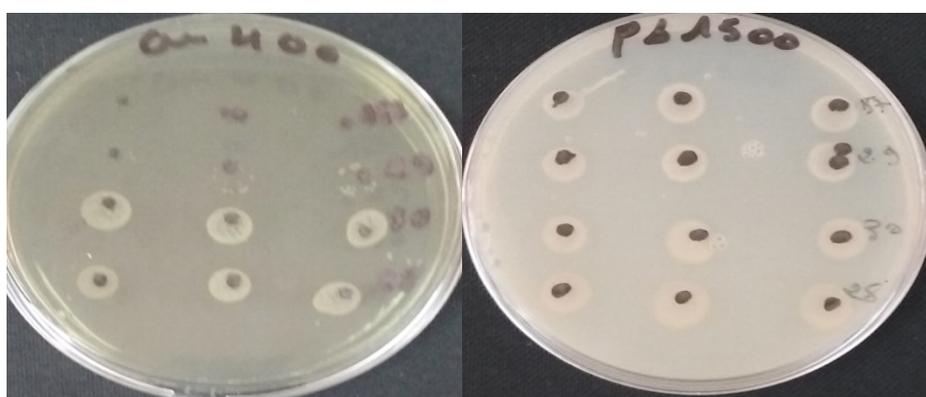
La figure ci dessous est choisie à titre d'exemple pour montrer la tolérance de quelques souches de *K. pneumoniae* vis-à-vis des différentes concentrations en sels de métaux testés.



[Mercure] = 40µg/ml

[Cadmium] = 112, 4µg/ml

[Zinc] = 200µg/ml



[Cuivre] = 400µg/ml

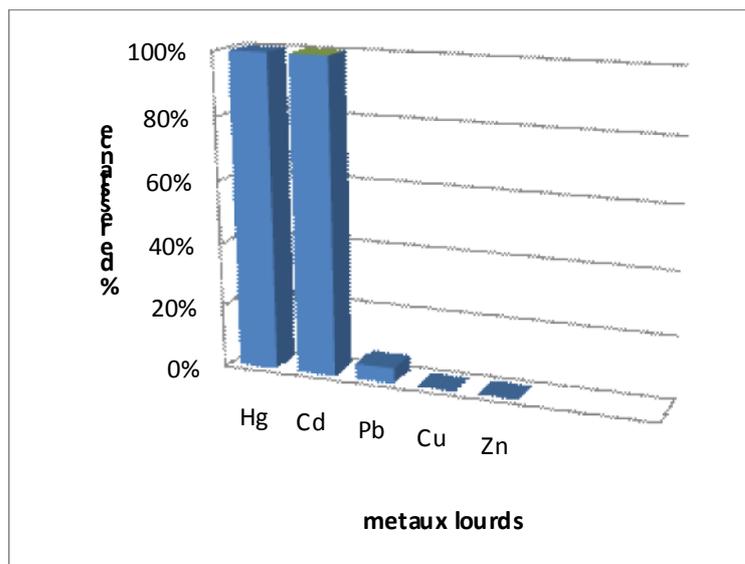
[Plom] = 1500µg/ml

**Figure 6 : Croissance des souches de *K. pneumoniae* à différentes concentrations en sel de métaux**

### III-2 Phénotypes de résistance aux métaux lourds

Les 20 souches de *K. pneumoniae* isolées de l'environnement hospitalier sont qualifiées de résistantes (R) ou de sensibles (S) en se référant aux travaux de DhakephalKar et Chopade (1994) (voir matériel et méthodes).

La figure 7 montre une tendance générale à la sensibilité chez les souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de l'environnement hospitalier vis-à-vis des métaux lourds. On remarque que toutes les souches sont sensibles au Cuivre et au zinc et résistante au mercure et au cadmium et 5% présente une résistance à l'acétate de pl



**Figure 7 : Taux de résistance des souches de *K. pneumoniae* aux métaux lourds**

Hg : mercure, Cu : cuivre, Zn : zinc, Pb : plomb, Cd : cadmium

### III-3-Etude de la sensibilité des souches de *K. pneumoniae* au désinfectant hospitalier par la méthode des tubes

La méthode des tubes a permis de définir la dilution cible du désinfectant utilisé pour la désinfection des surfaces en réanimation au niveau du CHU de Khelil Amran (tableau N°X). La dilution cible est de 1/200.

Pour les 20 souches de *K. pneumoniae* étudiées aucune croissance bactérienne n'est observée en présence d'ANIOS DVA HPH à l'état brut à l'exception de la souche mi157. Une croissance est observée pour les dilutions testées à l'exception de la dilution 1/200 qui semble efficace sur 7 souches (MI26, Mi35, Bar 16a, Bar 16b, Bar 01, Bar 80, Bar 35).

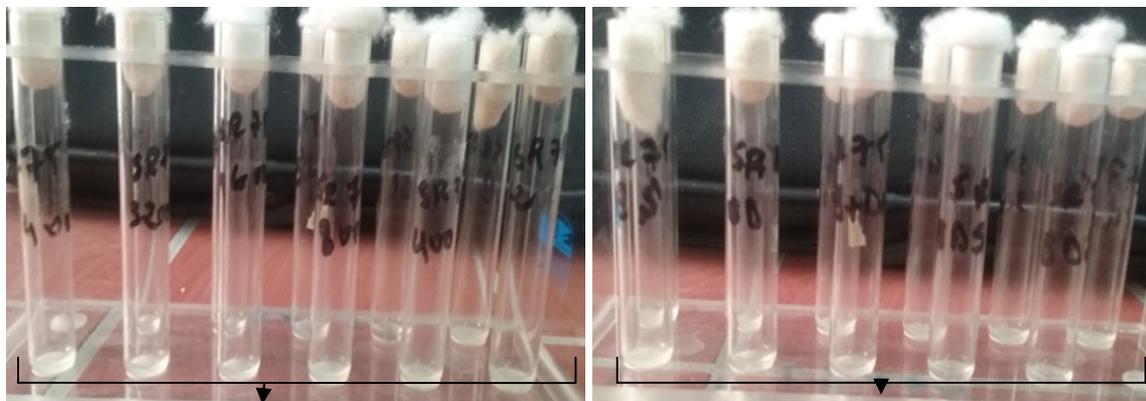
**Tableau N°X : Détermination de la dilution inhibitrice de la croissance des souches *K. pneumoniae***

Les souches	Bouillon/ souches	Bouillon/ désinfectant	Bouillon /souches Désinfectant	Les dilutions					
				1 /200	1/ 400	1/ 800	1/ 1600	1/ 3200	1/ 6400
<b>Code</b>	<b>BS</b>	<b>BD</b>	<b>BDS</b>						
Sr 75	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Mi 203	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Mi 27	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Mi 26	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Mi 28	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Mi 30	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Mi 32	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Mi 35	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Mi 13b	+	-	-	+	+	+	+	+	+

Inf 94	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Bar 91	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Bar16a	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Bar16b	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Bar100	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Mi 157	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Bar 01	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Inf 06	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Bar 80	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Bar 35	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Bar 32	+	-	-	+	+	+	+	+	+

+ : présence de croissance, - : absence de croissance

La figure ci dessous est choisie à titre d'exemple pour montrer l'effet du désinfectant sur la croissance des souches de *K. pneumoniae*.



Les dilution :1/200, 1/400, 1/800, 1/1600

bouillon+souche, bouillon+désinfectant,

1/3200, 1/6400

bouillon+souche+désinfectant

Figure 8 : effet du désinfectant sur la croissance des souches de *K.pneumoniae* par la méthode des tubes pour la souche Sr75



L'hygiène hospitalière est un problème très fréquent qui se pose dans tous les services d'un l'hôpital et le non respect de cette mesure va conduire à des maladies ou des dégâts sanitaires au sein de l'hôpital. L'utilisation massive d'antibiotiques pendant plusieurs décennies a sûrement contribué à sélectionner les souches bactériennes les mieux adaptées à l'environnement hospitalier.

La température interne des bactéries est directement dépendante de celle de l'environnement dans lequel elles évoluent, puisqu'elles sont incapables de réguler leur température (**Georlette et al., 2004**). Les bactéries ont la capacité de coloniser des environnements extrêmement différents, souvent caractérisés par des changements brutaux de température et de pH. Les bactéries doivent être alors capables de s'adapter à l'environnement hostile dans lequel elles évoluent (**Bjelic et al., 2008**). Selon les conditions environnementales, une bactérie peut être présente dans deux états:

- l'état végétatif, durant lequel sont assurées des biosynthèses équilibrées permettant la croissance de la population bactérienne (**Bulard, 2012**).
- l'état de repos, caractérisé par un minimum d'échanges avec le milieu extérieur assurant la survie bactérienne sans multiplication (**Bulard, 2012**).

L'environnement au sens large du terme, c'est-à-dire la température, le temps d'exposition, la présence d'antibiotiques, la concentration bactérienne et les conditions de flux sont également des facteurs influençant l'adhésion bactérienne. Le pH et la force ionique, en modifiant l'état de la surface (qui est plus ou moins hydrophobe, et plus ou moins chargée suivant le pH, influent par conséquent sur l'adhésion bactérienne (**Bulard, 2012**).

Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent que les températures testées (18°C, 20°C, 22°C, 24°C, 28°C, 44°C) favorisent une bonne croissance et multiplication des souches de *K. pneumoniae* testées. Ces souches montrent qu'elles sont capables de survivre et de s'adapter à des températures au dessus de la température optimale de croissance (37°C) et à basse température (18°C) excepté pour trois souches. La température est importante non seulement parce qu'elle affecte l'activité métabolique et enzymatique des bactéries, mais aussi parce qu'elle influence certains paramètres physicochimiques (pH) et présente un effet sur la production de flagelles et, ainsi sur l'adhésion (**Pandiani, 2012**). Tsuji et al. (1992) ont rapporté que des souches hospitalières de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *P.*

*aeruginosa* et *A. calcoaceticus* sont peu affectées par les variations du pH du milieu et présentent une large gamme de température de croissance (25, 30, 37, 42°C) et sont tuées en 30 min à 60 °C ou 70 °C.

Un résultat similaire est rapporté par **Obeidat et al. (2014)** sur des souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées de l'environnement hospitalier vis à vis de l'effet des variations de température et de pH sur la croissance et la survie de ces dernières ou une bonne croissance est observée à 37°C, 42°C et 45°C et pH (5.5 à 8) et aucune croissance n'est observé à 4°C comparé aux souches de même espèce isolées d'infections nosocomiale (moins de 23 jours).

Dans une autre étude réalisée sur la survie de *E. coli* dans une eau épurée pour lagunage a montré que les faibles valeurs de température (4°C et 13°C) favorisent la survie de cette souche et qu'un pH alcalin de 9.6 entraîne une forte diminution de leur temps de survie (**Mezrioui et Baleux, 1992**).

La survie des bactéries à Gram positif tel que les staphylocoques résistant à la méticilline et des bactéries à Gram négatif tel que *Pseudomonas* est de 145 jours sur différents tissus hospitaliers, la survie la plus longue étant observée sur les draps est montre le danger que représentent ces bactéries dans les infections nosocomiales. Cette survie prolongée des souches bactériennes pathogènes sur les différents tissus hospitaliers constitue un vrai péril infectieux intra-hospitalier (**Auajjar et al .,2006**).

L'usage de l'eau en milieu hospitalier est très varié: alimentaire, sanitaire et médical. L'eau, que ce soit en milieu communautaire ou hospitalier, peut être contaminée par de nombreuses bactéries multirésistantes, elle serait un vecteur privilégié de nombreuses pathologies d'origine bactérienne, pouvant ainsi engendrer des infections chez des patients fragilisés ou immunodéprimés (**Bekkari et al., 2016**). Les résultats que nous avons obtenus sur la durée de survie des souches de *K. pneumoniae* dans différentes sources d'eaux (pauvre en éléments nutritionnel) confirme que ces dernières peuvent persister 8jours dans l'eau distillée, 4jours dans l'eau de robinet et jusqu'a 10 jours dans l'eau saline (9 g/l) mais reste inférieurs à la duré de survie de souches environnemental de *A. baumannii* dans les mêmes condition (**Obeidat et al., 2014**). La détection de bactéries potentiellement pathogènes dans le système de distribution d'eau potable en milieu hospitalier telles que *E. coli*, *Acinetobacter*

sp. confirme que ces dernières peuvent survivre longtemps dans le réseaux d'eau potable et pourrait être une source d'infections nosocomiales (**Bekkari et al., 2016**).

Les bactéries productrices de biofilms sont responsables de nombreuses infections qui sont difficiles à éradiquer. Ils présentent une résistance aux antibiotiques, par diverses méthodes telles que une pénétration limitée de l'antibiotique dans les biofilms, une diminution du taux de croissance des cellules bactérienne et l'expression des gènes de résistance (**Afreenish et al., 2011**).

La capacité des souches de *Klebsiella pneumoniae* à s'adhérer et à former des biofilms est évaluée par deux méthodes. Un résultats significatif de production forte et modérée de biofilm est obtenu par la méthode rouge Congo agar (25%, 60%) et la méthode en tube (30%, 65%). *K. pneumoniae* est fréquemment rencontré en milieu hospitalier et infecte généralement les patients avec des dispositifs médicaux ((**Branger et al., 2007**). Les biofilms sont associés à de nombreuses conditions médicales, y compris les dispositifs médicaux, la plaque dentaire, les infections des voies respiratoires supérieures, la péritonite et les infections urogénitales (**Afreenish et al., 2011**). Une récente étude réalisée en Algérie par (**Bellifa, 2016**) sur 100 souches de *k.pneumoniae* isolées a partir des sondes urinaire , a montrée que la persistance de ces isolats dans l'hôpital est due a leurs capacité a s'adhérer au cathéters urinaires et surfaces et aussi a leurs capacité de former de biofilm sur les sondes urinaires .

*Klebsiella pneumoniae*, est une des espèces les plus communes connues pour produire les B-lactamases à spectre étendu (BLSE) (**Pitout et al ., 2005**). Les  $\beta$ -lactamases à Spectre étendu (BLSE) sont très dynamiques et constituent un problème croissant en raison de leur activité d'hydrolyse contre les céphalosporines de troisième génération tels que céfotaxime, ceftazidime, et le monobactame aztréonam souvent utilisés dans le traitement de la majorité des infections acquises aux hôpitaux (**Romero et al., 2005**)

Ceci pourrait certainement avoir une relation entre la production des BLSE et la formation du biofilm. Cette coorelation a déjà été retenue par Melzer *et al* en 2008 ; sur un total de 150 souches de *K. pneumoniae* (113 étaient isolées des crachats, 24 isolées à partir de l'urine, sept du sang et six prélèvements des plaies), les souches productrices de BLSE avaient une capacité de former le biofilm. Ils ont conclu que dans le cas de maladies respiratoires ou les infections des voies urinaires par *K. pneumoniae*, associées aux dispositifs médicaux, la production de BLSE et la formation du biofilm devraient être considérés dans la thérapie antimicrobienne (**Dechen et al., 2009**).

Les bactéries à Gram positifs et à Gram négatifs ont la capacité de former des biofilms. Les bactéries couramment impliquées comprennent *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa* (Afreenish et al., 2011). Les souches de *K. pneumoniae* sont de très bonnes productrices de biofilm ce qui augmente leur pouvoir pathogène et leurs résistances aux agents antimicrobiens. (Bellifa, 2014).

Les microorganismes qui croissent dans un biofilm sont intrinsèquement plus résistants aux agents antimicrobiens que les cellules planctoniques (Amy et Kim, 2001) ce qui confirme les résultats que nous avons obtenus vis à vis des antibiotiques, des métaux lourds et des désinfectants testés. Des concentrations élevées d'agent antimicrobiens sont nécessaires pour inactiver ces derniers, comme la résistance aux antibiotiques qui peut augmenter de 1000 fois (Afreenish et al., 2011).

Dans cette étude, nous avons conclu que la méthode en tube (TM) semble plus fiable comparée à celle du rouge Congo avec une souche négative contre 3 souches respectivement (tableau VIII). La technique TM est la plus fiable pour la détection de la formation de biofilm chez des souches cliniques (Afreenish et al., 2011). Baqai et al. (2008) ont testé la méthode en tube pour détecter la formation de biofilms chez les uropathogènes, d'après leurs résultats, 75% des isolats sont formatrices de biofilm. Une autre étude réalisée sur 128 isolats de *S. aureus*, la méthode de Rouge Congo n'a détecté que 3,8% comme étant producteurs de biofilm (Knobloch et al., 2002). La méthode TM et RCA sont utilisées comme un procédé de criblage général pour la détection de bactéries productrices de biofilm au laboratoire (Bellifa, 2016).

Afin de limiter la formation des biofilms et de diminuer le taux de contamination et la propagation des BMR, des mesures préventives doivent être prises en considération comme, l'application stricte des règles d'asepsie, des mesures d'hygiène et le bon choix des biomatériaux (Massicotte et al., 2009).

Certains polluants de l'environnement tels que les métaux lourds, composés hautement persistants et non biodégradables, engendrés par des activités diverses, se sont révélés être un véritable fléau aussi bien sur le plan toxicologique, écologique. Ils jouent un rôle important dans le maintien et la prolifération de la résistance aux antibiotiques (Baker et al., 2006).

Dans cette étude 20 souches de *Klebsiella pneumoniae* sont testées vis-à-vis des métaux lourds, afin de déterminer leurs CMI et résistances en milieu solide en utilisant des spots. Les métaux lourds sont des facteurs qui peuvent avoir une grande influence sur ces souches, et par conséquent sur les valeurs des CMI.

Les métaux lourds sont connus pour leur large spectre d'activité antimicrobienne contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, les champignons, les protozoaires et certains virus, y compris les souches résistantes aux antibiotiques. L'argent peut être utilisé pour réduire les infections dans le traitement des zones brûlées, afin de prévenir la colonisation bactérienne sur les dispositifs médicaux, ainsi que dans les tissus et pour le traitement de l'eau sur une variété de matériaux (le verre, le titane et les polymères) comme désinfectant (Monteiro et al., 2009).

En Algérie, les travaux menés par Touati et al (2010) sur des souches d'entérobactéries productrices de BLSE isolées de l'environnement hospitalier ont montré que les valeurs indicatives de la tolérance aux métaux variaient de 100 à 400 mg/ml pour le Cd, 1600 à 4000 mg/ml pour le Pb, de 40 à 320 mg/ml pour le Hg, 1600 à 3200 mg/ml pour le Cu et 800 mg/ml pour le Zn. Toutes les souches étaient résistantes au cuivre, cinq au cadmium, quatre au mercure et deux pour le plomb, alors que toutes les souches étaient sensibles au zinc. Ces résultats sont différents de ceux que nous avons obtenus durant notre étude et qui montrent que toutes les souches de *K.pneumoniae* sont sensibles au cuivre et au zinc par contre elles sont toutes résistantes au mercure et au cadmium. Une souche seulement est résistante au plomb. Les CMI des souches sont de 20,06 à 80 µg/ml pour le mercure, 400µg/ml pour le cuivre, 1000 à 1500 µg/ml pour le plomb, 112,4 à 150 µg/ml pour le cadmium et 200 à 400 µg/ml pour le zinc.

Faili et al. (2000) ont observé chez des souches de *K. pneumoniae* isolées des eaux usées des CMI de 240,72 et 449,6 µg/ml vis à vis du mercure et du cadmium respectivement. Ces résultats sont supérieures à ceux que nous avons obtenus et qui est de 40µg/ml et de 150µg/ml pour le cadmium et le mercure respectivement, alors que l'inverse est observée dans le cas du zinc où les CMI des souches environnementales de *K. pneumoniae* sont supérieures dans le cas du cuivre (400µg/ml) et du zinc (200-400µg/ml). Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus par Karbasizadeh et al. (2003) chez des souches d'entérobactéries isolées des

infections nosocomiales ou des CMI de 3200µg/ml, 1750µg/ml et de 400µg/ml sont observées respectivement vis à vis du plomb, du cadmium et du cuivre.

Les bactéries peuvent acquérir une résistance de plus en plus importante aux désinfectants, à chaque fois qu'ils sont utilisés avec le même produit et avec la même concentration (**Bekkari et al., 2016**). Les techniques d'étude de la sensibilité des bactéries aux désinfectants sont normalisées mais l'application de ces normes est fastidieuse et n'est pas envisageable pour de nombreuses souches (**Dusseau et al., 2001**). Nous avons recherché la dilution efficace d'un désinfectant de surface (ANIOS DVA HPH) utilisé en réanimation au niveau du CHU Aamriw de Béjaïa contre des souches de *K.pneumoniae* isolées des surfaces par la macrotechnique en tubes en présence de cinq dilutions choisies. Cette technique dérivée de techniques proposées par plusieurs auteurs pour des indications similaires (**Girardoet et al., 1989**).

Cette étude montre que (35 %) des souches de *K. pneumoniae* poussent à la dilution 1/200 contrairement aux travaux rapportés par Rouillon *et al.* (2006) ou aucune croissance n'est observée en présence de Surfanios® dilué à 1/200 pour les souches de *P. aeruginosa* par contre une bonne croissance est observée vis à vis des autres dilutions chez les deux espèces étudiées dans deux études. L'utilisation du désinfectant à l'état brute présente une meilleure efficacité sur toutes les souches à l'exception de la souche (MI157). L'activité antibactérienne, des six souches vis-à-vis d'un désinfectant à base du chlore a montré que le désinfectant a été inefficace sur les souches de *Pasteurella haemolytica* et de *Lactobacillus*, lorsqu'il est utilisé à l'état pur et inefficace sur toutes les souches lorsqu'il est employé à l'état dilué (**Bekkari et al., 2016**). Ces résultats confirment la capacité des souches hospitalières à résister aux produits antimicrobiens utilisés en particulier lorsque ces derniers sont dilués quotidiennement avant utilisation et que les doses et le mode d'emploi ne sont pas respectés par les agents d'entretien. En effet les souches résistantes ont une grande capacité d'adaptation aux conditions environnementales et l'utilisation d'un produit biocide à des doses sub-létales constitue un des facteurs favorisant l'émergence de souches résistantes (**Crepay, 2005**).

L'ampleur des infections nosocomiales est liée à la capacité des souches bactériennes à survivre plus ou moins longtemps dans l'environnement hospitalier (surfaces, paillasses, sol, murs, tables d'opération, air, matériel médical, tissus, etc...)

La prévention reste le seul moyen pour limiter le risque d'infections nosocomiales reposant sur la maîtrise des règles d'hygiène et d'asepsie. Et l'utilisation des méthodes de

désinfection et du nettoyage des surfaces et des matériaux médicaux afin de diminuer la population des bactéries multirésistantes (**Mounier et al., 2009**).

La lutte contre les infections nosocomiales et en particulier celles liées aux germes de l'environnement hospitalier, fait partie des priorités des établissements de santé. Parmi les habitats possibles pour les bactéries, les surfaces (organiques ou inorganiques) sont les plus importantes car les nutriments s'y trouvent souvent en quantité beaucoup plus importante que dans un milieu liquide. Les bactéries ont en effet la capacité de s'adapter très facilement à leur environnement et d'en tirer le meilleur parti afin de se développer et de proliférer (**Bulard, 2012**).

Au cours de cette présente étude qui c'est faite sur 20 souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de l'environnement hospitalier afin de déterminer le degré de persistance et leurs capacité à s'adapter et à survivre aux différentes variations des conditions naturelle ou elles se retrouvent sur les différentes surfaces et dispositifs médicaux.

L'étude de l'effet de la température et du pH montre que toutes les souches poussent à différentes gamme de températures allant de 18°C à 44°C excepté 3 souches à 18°C et à différentes gamme de pH allant de 5,1 à 8,1. aucune souches ne poussent à pH 4,5.

La capacité des souches de *K. pneumoniae* a survivre au manque de nutriment dans les trois types d'eaux testées à savoir l'eau de robinet, l'eau distillée et l'eau physiologique est de 1jour jusqu'a 10 jours dans le cas de l'eau physiologique. Cette persistance dans le temps confirme que ces souches peuvent survivre longtemps dans des conditions défavorables.

Les souches de *K. pneumoniae* étudiées montrent une capacité de formation de biofilm démontré par les deux techniques utilisées à savoir la méthode en tube et la méthode avec le rouge de Congo ou 90% des souches sont capables de s'adhérer et à former un biofilm sur les différentes surfaces ou elles ont été isolées.

L'étude de l'effet d'un désinfectant de surface à usage hospitalier (ANIOS) sur la croissance des souches montre que ce dernier est plus efficace à l'état brut que dilué. Toutes les souches poussant à différentes dilutions et uniquement 7 souches sont sensible à la dilution 1/200.

Toutes les souches de *K. pneumoniae* sont sensibles au cuivre et au zinc par contre elles sont toutes résistantes au mercure et au cadmium et une souche seulement est résistante au plomb. Les CMI des souches sont de 20,06 à 80 µg/ml pour le mercure, 400µg/ml pour le cuivre, 1000 à 1500 µg/ml pour le plomb, 112,4 à 150 µg/ml pour le cadmium et 200 à 400 µg/ml pour le zinc.

Les résultats de cette étude attirent une attention particulière sur le degré de persistance des souches *K. pneumoniae* sur la contamination des surfaces inanimés à proximité des patients dans nos hôpitaux. Ainsi, la maîtrise de la contamination des surfaces hospitalières passe par la réalisation des contrôles microbiologiques régulier afin de déterminer leurs degré de contaminations, l'écologie microbienne et de comprendre les mécanismes impliqués dans leurs persistance, leurs modes de transmission et leurs capacités à survivre et causer des infections dans les établissements de santé.

Les résultats obtenus au cours de notre étude restent préliminaires et méritent d'être exploités et complétés par :

- L'élargissement de l'étude sur la flore composant l'écologie bactérienne de nos hôpitaux
- L'évaluation de l'efficacité des produits désinfectants, détergents et antiseptiques utilisés dans les structures hospitalières pour le nettoyage et la désinfection des locaux et déterminer les mécanismes de résistances à ces derniers.
  
- L'étude des mécanismes génétique par des techniques de biologie moléculaire les gènes impliqués dans la résistance aux métaux lourds et recherché également les mécanismes impliqués dans la co-résistance avec les antibiotiques.
  
- Il serait intéressant de rechercher par des techniques de biologie moléculaires les gènes responsables de la formation de biofilm.

## A

**Auajjar N., Attarassi B., Elhaloui N., Badoc A. (2006).** Multirésistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* et *Staphylococcus aureus* et survie sur divers tissus hospitaliers. Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux. 145 : 61-76.

**Annous B., Fratamico P. et Smith J.L. (2009).** Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do. Journal of Food Science. 74 (1):24-37.

**Audurier A., Fennetau A., Laudat P., Mereghetti L. (1998).** L'air à l'hôpital. In: Hygiène Hospitalière . Presses Universitaires de Lyon. 387-399.

**Amir S. (2005).** Contribution à la valorisation des boues de stations d'épuration par compostage : devenir des micropolluants métalliques et organiques et bilan humique du composte. Doctorat de L'institut National Polytechnique de Toulouse. 341p.

**Afreenish H., Javaid U., Kaleem f., Omair M., Khalid A., Iqbal M. ( 2011)** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. Brazilian journal of Infection Diseases. 15 (4):1413-8670.

**Amy L. et Kim L. (2001).** Biofilms and Planktonic Cells of *Pseudomonas aeruginosa* Have Similar Resistance to Killing by Antimicrobial. Journal of Bacteriology. 183(23): 6746-6751.

**Azimi L., Talebi M., Pourshafie M. R., Owlia P., Rastegar L.A. (2015).** Characterization of carbapenemases in extensively drug resistance *Acinetobacter baumannii* in a burn care center in Iran. International Journal of Molecular and Cellular Medicine. 4: 46-53.

**Abid. F, Boutefnouchet N, Dekhil M, Bouzerna N. (2006).** *Klebsiella pneumoniae* productrices de beta-lactamases a spectre élargi (BLSE) isolées dans les hôpitaux de la ville de Annaba, Algérie. Scientific Study and Researctch. 2:1582-540.

## B

**Belbel Z (2014).** Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées dans les hôpitaux de la ville d'Annaba. Thèse de Doctorat .Algérie. p 108.

**Bloomfield S.F. et Scott E. (1997).** Cross-contamination and infection in the domestic environment and the role of chemical disinfectants. *Journal of Applied Microbiology*.83:1-9.

**Branger A., Richer M.M., Roustel S. (2007).** *Microchimie et alimentation. Edit Educagri, Paris*, 343 p.

**Bekkari H., Touijer H., Berrada S., Ettaybi M., Benchemsi N., Maniar S., El Ouali Lalami A. (2016).** Evaluation de la contamination des eaux utilisées en milieu hospitalier : Effets d'antibiotiques et de désinfectant usuels sur les germes isolés. Maroc. Laboratoire de Biotechnologie, Faculté des Sciences Dhar EL Mahraz, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Maroc.11 : 34-39.

**Baqai R., Aziz M., et Rasool G. (2008 ).** Urinary tract infection in diabetic patients and biofilm formation of uropathogens. *Journal Pakistan*. 17(1):7-9.

**Bjelic S., Brandsdal B.O. (2008).** Cold adaptation of enzyme reaction rates. *Biochemistry* 47(38): 10049-10057.

**Brisse S., Duijkeren E.V. (2005).** Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. *Veterinary Microbiology*. 105: 307-312.

**Bellifa S., Hassaine H., Kara I., Terki W.D., M'hamedi I., Lachachi M., Benamar I., Morghad T., Gaouar S. (2016)** Study of Biofilm Production and Antimicrobial Resistance Pattern of *Klebsiella Pneumoniae* Isolated from Urinary Catheter at the University Hospital of Tlemcen Laboratory of Food, Biomedical and Environmental Microbiology University of Tlemcen. Tlemcen, Algeria. 3(2): 13-17.

**Bruins M.R., Kapil S., Oehme F.W. (2000).** Microbial Resistance to Metals in the Environnement. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 45: 198-207.

**Baker A.C., Wright M.S., Stepanauskas R., Mc Arthur J.V. (2006).** Co-selection of Antibiotic and Metal Resistance. *Trends in Microbiology*. 14:176-182

**Bulard E. (2012).** L'adhésion bactérienne sondée a l'échelle moléculaire . Thèse de doctorat. Autre [cond-mat.other]. Université Paris Sud - Paris XI. P 25.

**Bonnet R. (2006)**  $\beta$ -lactamase et entérobactéries. chapitre 15. Livre AntibioGramme. 2 :143.

**Bush K, Jacoby GA.(2010).** Updated Functional Classification of b-lactamases. Agents Chemother.3: 969-976.

## C

**Cavallo J.D., Fabre R., Jehl F., Garrabé E. (2004)** Betalactamines Beta-lactam antibiotics. Elsevier .1:129-202.

**Chaves J., Ladona M.G, Segura C., Coira A., Reig R. et Ampurdanés A. (2001).**SHV-1 b-lactamase Is Mainly a Chromosomally Encoded Species-Specific Enzyme in *Klebsiella pneumonia*. Antimicrobial Agents And Chemotherapy.10:2856-2861.

**Chikhani N.K. (2012).** *Klebsiella pneumonia* pathogène nosocomial résistance et virulence. Thèse de doctorat Université Pierre et Marie Curie Paris 6. P13 14.

**Crepy M.N. (2005).** Dermatoses professionnelles aux détergents. Documents pour le Médecin du Travail N° 103, 3<sup>ème</sup> trimestre. 72: 375-84.

**Chihib N., Abdallah M., Benoliel. et Dhulster P. (2012).** Les biofilms et l'hygiène des surfaces en milieu hospitalier et alimentaire. 7 :959-964.

**Casas S. (2005).** Modélisation de la bioaccumulation de métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu, Zn) Chez la moule, *Mytilus galloprovincialis*, en milieu méditerranéen. Thèse de doctorat Université du sud Toulon Var. France. 341p.

**Clave N. (2013).** Laboratoire de Bactériologie Hygiène CHU de Toulouse - Institut Fédératif de Biologie.1-2.

## D

**Denisuik AJ. Lagacé-Wiens PRS ,Pitout JD, Mulvey MR, SimmerPJ,Tailor F,Karlowsky JA, Hoban DJ,Adam HJ ,Zhanel GG .(2013).** Molecular epidemiology of extended-spectrum b-lactamase, Ampc b-lactamase and carbapenemase producing *Escherichia coli* and *klebsiella pneumonia* isolated from Canadian hospitals over a 5year period. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 68:57-65.

**Dettenkofer M., Wenzler S., M.D., Amthor S., Antes G., Motschall E., Franz D. Daschner.M.D. (2004).** Does disinfection of environmental surfaces influence nosocomial infection rates? A systematic review. 32(2): 84-9.

**Donlan R.M. (2001).** Biofilms and Device-Associated Infections. Centers for Disease Control and Prevention. 7(2): 277.

**Donlan R.M, Costerton W. (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews. 15(2):167-93.

**Dhakephalkar P.k. and Chopade B.A. (1994).** High levels of multiple metal resistance and its correlation to antibiotic resistance in environmental isolates of *Acinetobacter*. Bio Metals. 7: 67-74.

**Deshpande L. M., Kapadnis B. P. and Chopade B. A. (1993).** Metal resistance in *Acinetobacter* and its relation to B-lactamase production. Bio Metals. 6: 55-59.

**Dechen C.T., Das S., Adhiakari L., Pal R., Singh T.S.K. (2009).** Extended spectrum beta lactamases detection in gram negative bacilli of nosocomial origin. Journal of Global Infectious Diseases. 1(2):22-28.

**Dusseau J.Y., Luu D.D., Foissaud V., Marchetti B., Ducl G., Clavier B., et Calop J. (2001)** Évaluation de sept laveurs–désinfecteurs d’endoscopes : activité bactéricide des désinfectants, efficacité antibactérienne des couples laveur–désinfecteur–produits. Pathologie et biologie. 49:23-32.

## **E**

**El Fertas-Aissani R, Messai Y, Alouache S, Bakour R. (2012).** Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. Pathologie Biologie. 3048 : P 8.

## **F**

**Fillox A. et Vallet I. (2003).** Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. Medical Sciences.19 : 77-83.

**Faili B.K., Taoufik J., Zeroual Y., Dzairi F.Z., Talbi M. et Blaghen M. (2000).** Waste Water Bacterial Isolates Resistant to Heavy Metals and Antibiotics. *Curr Microbiology*.41: 151-156.

## G

**Georlette D, Blaise V, et al. (2004).** "Some like it cold: biocatalysis at low temperatures." *Fems Microbiology Reviews*. 28(1): 25-42.

**Girardo P., Reverdy M.E., Martra A. et Fleurette J. (1989).** Determination of bacterial minimum concentrations of 3 antiseptics and 1 disinfectant on 580 Gram-negative bacilli. *Pathologie Biologie* 37: 605-611

## H

**Hennequin C., Robin F., Cabrolier N., Bonnet R. et Forestiera C. (2012).** Characterization of a DHA-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain Involved in an Outbreak and Role of the AmpR Regulator in Virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 288-294.

**Hennequin C. et Forestier C.( 2007).** Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. *Research in Microbiology*. 158: 339-347.

**Habi S. (2009).** Etude de la Métallo-résistance et de l'Halo-tolérance des Entérobactéries Isolées des Eaux de Surface de la Région de Sétif. Thèse de doctorat l'université Farhat Abbas, Setif .Algérie. 4-20.

**Hosein I.K., Hill D.W., Jenkins L.E, et Magee J.T. (2002).** Clinical significance of the emergence of bacterial resistance in the hospital environment. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 90-97.

## K

**Knobloch J.K., Horsetkotte M.A., Rohde H. et Mack D. (2002).** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology*. 191(2):101-6.

**Kanamori H., Navarro R.B., Yano H., Sombrero L.T., Lupisan S.P., Olvedab R.M., Arai K., Kunishima H., hirakatac Y. et Kaku M. (2011).** Molecular characteristics of extended-spectrum B-lactamas in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from the Philippines. *Acta Tropica*. 120: 140-145.

**Karbasizaed V., Badami N. et Emtiazi G. (2003).** Antimicrobiol, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran. *African Journal of Biotechnology*. 2 (10): 379-383.

**Kramer A., Ingeborg S. et Günter K. (2006).** How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces ?. *BMC Infectious Diseases*. 2: 1-8.

## M

**Méité S., Boni-Cissé C., Monemo P., Mlan Tanoa A.P. Faye-Ketté H. et Dosso H. (2010).** Surveillance microbiologique des surfaces au niveau d'un établissement hospitalier de niveau Tertiaire : exemple du CHU de Yopougon, abidjan, Cote Divoire. *International journal of pharmacy and biological science*. 11 (1): 73-81.

**Massicotte R, Bédard S, Boudreault S, Dumont J, Marchand R (2009)** Environnement .Désinfectants et désinfection en hygiène et salubrité: principes fondamentaux. P 51.

**Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay D.J., Fatma T. et Rattan A. (2006).** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*.24: 25-29.

**Monteiro J., Santos A.F. (2009).** First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumonia* strains in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.53:333-334.

**Monchy, S. (2007).** Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidus metallidurans*. Thèse de Doctorat. Université Libre de Bruxelles. 99p.

**Mezrioui N., Baleux B. (1992).** Effet de la température du pH et rayonnement solaire sur la survie de différentes bactéries d'intérêt sanitaire dans une eau usée épurée par lagunage. *Journal of Water Science*. 5 :573-591.

## N

**Natoubi S, Barguigua A, Amghar S, Hilali A, Baghdad N, Timinouni M, Zerouali K.,** Émergence de *Klebsiella pneumoniae* productrice de carbapénèmase à l'hôpital régional Hassan II Settat, Maroc. 83:1-9.

**Neely A.N., Maley M.P. (2000).** Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabric and plastic. *Journal of Clinical Microbiology*.38:724-726.

**Mounier M., Pestourie N. et Denis F. (2009).** Les détergents et les désinfectants : rôle en médecine (1<sup>re</sup> partie). 11(3) : 177-184.

**Nies DH. (1999).** Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51 :730-750.

**Nasr S.A., AbuShady H.M., Hussein H.S. (2012).** Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 1110-8630.

## O

**Obeidat N., Jawdat F., Al-Bakri A., Shehabi A. (2014).** Major biologic characteristics of *Acinetobacter baumannii* isolates from hospital environmental and patients' respiratory tract sources. *American Journal of Infection Control*.42:401-4.

## P

**Philippon A. et Arlet G. (2006).** B-Lactamases de bacilles à Gram négatif: le mouvement perpétuel. *Annales de biologie clinique*.64. 37-51.

**Pandiani F. (2012).** Mécanismes d'adaptation aux basses températures de croissance de la bactérie pathogène : rôle des hélicase à ARN. Thèse de doctorat. P22.

**Pitout J.D., Nordmann P., Laupland K. et Poirel L. (2005).** Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended spectrum betalactamases (ESBL) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56:52–9.

## R

**Rouillon S., Ourdanabia S., Jamart S., Hernandez C. et Meunier O. (2006).** Étude de l'efficacité d'un produit détergent désinfectant Pour sols et surfaces sur les souches bactériennes isolées à partir de l'environnement hospitalier. *Pathologie Biologie*. 54 .325-330.

**Rouch, D.A., Lee, B., Morby, A.P. (1995).** Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *Journal of Industrial Microbiology*. 14: 132-141.

**Romero L, Lopez L, Bano JR, Martinoz M, Pascual A. (2005).** Long term study of frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing ESBLs. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 11:625–631.

## S

**SEKHRI-ARAFI N. (2010).** Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *Klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Benbadis de Constantine. Thèse de doctorat. P24-25.

**Stahlhut S.G., Struve C., Krogfelt K.A., Reisner A. (2012).** Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunology Medical and Microbiology*. 65 ;350–359.

**Silver S., Phung T. (1996).** **Bacterial Heavy Metal Resistance: New surprises.** *Annual Review of Microbiology*. 50: 753-89.

**Sebghati T.A., Korhonen T.K., Hornick D.B. et Clegg S.(1998).** Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. *Infection Immunity*. 66:2887-2894.

**Struve C., Bojer M. et Krogfelt K. A. (2008).** Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infection Immunity*. 76:4055-4065.

**Sahly H., Podschun R., Oelschlaeger T., Greiwe M., Parolis H., Hasty D., Orkekow J. et Sela S. (2000).** Capsule Impedes Adhesion to and Invasion of Epithelial Cells by *Klebsiella pneumoniae*. *Infection And Immunity*.68: 6744-6749.

## **T**

**Talon D. (1999)**The role of the hospital environment in the epidemiology of multiresistant bacteria. *Journal of Hospital Infection*. 43: 13-17.

**Touati A., Benallaoua S., Djoudi F., Madoux J., Brasme L. et De Champs C.( 2007).** Characterisation of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains isolated from hospital environments in Algeria. *Microbial Drug Resistance*.13(2): 85-89.

**Tsuji A, Kaneko Y, Takahashi K, Ogawa M, Goto S. (1982)** Les effets de la température et du pH sur la croissance de huit et neuf espèces entériques glucose non fermentant de bâtonnets Gram-négatives. 26(1), 15-24

**Talaro, Kathleen, Park (2008).** *Foundation in Microbiology: Basic Principles*, McGraw-Hill, New York.

**Touati A., Zenati K., Brasme L., Benallaoua S. et De Champs C. (2010).** Extended-spectrum b-lactamase characterisation and heavy metal resistance of Enterobacteriaceae strains isolated from hospital environmental surfaces. *Journal of Hospital Infection*. 75:78-79.

## **Z**

**Zenati.k , Touati A, Bakour S , Sahli F, Rolain J.M ,2016** Characterization of NDM-1- and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates from inanimate Surfaces in a hospital environment in Algeria. *Journal of Hospital Infection*. 92(1):19-26.

**Ziebuhr W., Lobner I., Krimmer V., Hacker J. (2001).** Methods to detect and analyse phenotypic variation in biofilm-forming. *Methods in Enzymology*. 336: 195-203.

## **Annexe 01 : composition des milieux de culture pour 1l d'eau distillée**

**(Le Minor et Richard ,1993)**

### **1-Composition de la gélose Mac Conky**

Peptone de caséine .....	17g
Peptone de viande .....	0.03g
Lactose.....	10g
Mélange de sels biliaires.....	0.15g
Rouge neutre.....	0.03g
Chlorure de sodium .....	0.05g
Cristal violet .....	0.001g
Agar.....	10g
PH.....	7.4

### **2- Composition de la gélose Mueller Hinton**

Infusion de viande de bœuf.....	300g
Hydrolysate de caséine.....	17.5g
Amidon.....	1.5g
Agar.....	17g
PH.....	7.4

### **3- Composition du Bouillon nutritif**

Macération de viande.....	10g
Peptone tryptique .....	0.05g
NaCl ou KCl.....	0.05g

### **4- composition du Bouillon Coeur-Cervele (BHIB)**

Infusion de cervelle de veau.....	12.5g
Infusion de cœur de bœuf.....	5.0g
Peptone.....	10.0g
Glucose.....	2.0g
Chlorure de sodium.....	2.0g
Phosphatase di sodique.....	5g
pH= .....	7.4

### 5- Composition de la gélose Plate Count Agar (PCA)

Tryptone.....	5,0 g
-Extrait autolytique de levure.....	2,5 g
Glucose.....	1,0 g
Agar agar bactériologique.....	12,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2

**Annexe N°2 : Résultats obtenues pour l'étude de persistance des souches de  
*K.pneumoniae* aux différentes eaux**

Les souches	Résultats obtenues après 24h		
	Eau physiologique	Eau distillée	Eau de robinet
Mi27	–	22	>50
Mi26	>50	30	–
Mi157	20	>50	1
Mi35	–	>50	14
Bar 91	>50	>50	>50
Bar16b	1	2	–
Bar100	40	39	>50
Bar 32	>50	>50	>50
Bar01	>50	>50	>50
Bar 80	>50	>50	>50
Bar 34	>50	>50	5
Inf 94	>50	41	–
Inf 06	>50	>50	13
Mi13b	27	>50	>50
Mi203	>50	11	1
Mi30	–	>50	18
Mi28	>50	>50	>50
Mi29	>50	>50	>50
Bar16a	>50	>50	>50
Sr75	–	–	>50

Souches	Après 48h		
	Eau physiologique	Eau distillée	Eau de robinet
Mi27	–	10	–
Mi26	>50	28	–
Mi157	05	40	–
Mi35	–	>50	8
Bar 91	>50	26	>50

Bar100	45	35	25
Bar 32	>50	–	13
Bar01	>50	–	>50
Bar 80	>50	>50	>50
Bar 34	>50	21	1

Souches	Après 48h		
	Eau physiologique	Eau distillée	Eau de robinet
Inf 94	>50	3	–
Inf 06	10	–	–
Mi13b	-	29	–
Mi203	>50	–	–
Mi30	–	21	–
Mi28	>50	>50	28
Mi29	>50	44	>50
Bar16a	–	>50	–
Sr75	–	–	>50

Souches	Résultats après 72h		
	Eau physiologique	Eau distillée	Eau de robinet
Mi27	–	5	–
Mi26	30	–	–
Mi35	–	19	3
Bar 91	>50	16	38
Bar100	10	20	–
Bar 32	18	–	15
Bar01	>50	–	–
Bar 80	19	06	>50
Bar 34	23	–	–
Inf 06	12	–	–
Mi13b	–	20	–
Mi28	>50	>50	15
Mi29	>50	15	>50

Sr75	-	-	>50
------	---	---	-----

Souches	Après 96h		
	Eau physiologique	Eau distillée	Eau de robinet
Mi35	-	17	11
Bar 91	24	-	41
Bar 32	-	-	1
Bar01	>50	-	-
Bar 80	>50	20	>50
Bar 34	7	-	-
Mi28	>50	>50	28
Mi29	40	-	>50
Sr75	-	-	34

Souches	Après 120h		
	Eau physiologique	Eau distillée	Eau de robinet
Mi35	-	4	12
Bar 91	9	-	21
Bar 32			4
Bar01	>50	-	-
Bar 80	10	-	>40
Bar 34	31	-	-
Mi28	33	-	12
Mi29	>50	-	32

Souches	Après 148h		
	Eau physiologique	Eau distillée	Eau de robinet
Mi35	-	-	17
Bar 91	-	-	19
Bar01	>50	-	-
Bar 80	-	-	>50

Bar 34	>50	–	–
Mi28	>50	–	–
Mi29	>50	–	–

Souches	Après 172h		
	Eau physiologique	Eau distillée	Eau de robinet
Bar 91	–	–	15
Bar01	>50	–	–
Bar 80	–	–	29
Bar 34	>50	–	–
Mi28	40	–	–
Mi29	35	–	–

Souches	Après 196h		
	Eau physiologique	Eau distillée	Eau de robinet
Bar01	35	–	–
Bar 80	–	–	1
Bar 34	4	–	–
Mi29	29	–	–

Souches	Après 220h		
	Eau physiologique	Eau distillée	Eau de robinet
Bar01	17	–	–
Bar 34	10	–	–
Mi29	19	–	–

Souches	Après 248h		
	Eau physiologique	Eau distillée	Eau de robinet
Bar 34	3	–	–
Mi29	11	–	–



### Annexe 03 : Préparation des concentrations en sels de métaux lourds

**Zinc** : la concentration de la solution mère est 0,5g/ml

Znso <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	M(Zn)	VSM (ml)	VMH (ml)
200	879.51	0,176	99,824
400	1759,01	0,352	99,648
654	2875,99	0,575	99,425
800	3518,03	0,704	99,296
1000	4397,54	0,880	99,120

**Cadmium** : la concentration de la solution mère est de 0,1g/ml

Cd <sup>+2</sup>	{Cd <sub>3</sub> }	VSM (ml)	VMH (ml)
50	114.10	0.114	99.886
100	228.21	0.228	99.772
112.4	256.50	0.257	99.743
150	342.31	0.342	99.658
200	456.41	0.456	99.544
400	912.83	0.913	99.087

**Plomb** : la concentration de la solution mère est de 0.1g/ml

Pb <sup>2+</sup>	(OCCH <sub>3</sub> ) <sub>2,3</sub>	VSM (ml)	VMH ( ml )
1000	1830.83	1.831	98.169
1500	2746.25	2.746	97.254
2072	3793.48	3.793	96.207
2500	4577.08	4.577	95.423
3000	5492.49	5.492	94.508

**Mercure** : la concentration de la solution mère est de 10mg/ml

HgCl <sub>2</sub>	m (Hg)	VSM ( ml)	VMH (ml)
10	13.54	0.135	99.865
20.06	27.16	0.272	99.728
30	40.62	0.406	99.594
40	54.16	0.542	99.458
80	108.33	1.083	98.917
160	216.66	2.167	97.833

**Cuivre** : la concentration de la solution mère est de 0,25g/ml

CuSo <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	m (Cu)	VSM (ml)	VMH (ml)
400	1572.33	0.629	99.371
653	2496.07	0.998	99.002
800	3144.65	1.258	98.742
1600	6289.31	2.516	97.484
2400	9433.96	3.774	96.226
3200	12578.62	5.031	94.969

**Objectif :** *K. pneumoniae* est un pathogène opportuniste à fort potentiel épidémique fréquemment impliqué dans des infections sévères. Cette étude a pour objectifs d'évaluer le degré et la capacité de survie de 20 souches de *K. pneumoniae* isolées à partir des surfaces inertes de l'environnement hospitalier et leur capacité à former des biofilms .

**Méthodologie:** L'étude de l'effet des variations de la température et du pH sur la croissance des souches de *K. pneumoniae* est étudiée sur milieu solide ainsi que leur capacité à survivre dans différentes conditions hostiles de nutriment dans l'eau selon Obeidat et al. (2014). La détermination de la sensibilité des souches à certains agents antibactériens tels que les métaux lourds et vis-à-vis d'un désinfectant de surfaces (ANIOS DVA HPH) est réalisée par la méthode en spots sur gélose MH et par la méthode en tubes en déterminant leurs CMI. Enfin, l'étude de la capacité des souches de *K. pneumoniae* à former un biofilm est réalisée par deux méthodes RCA et TM.

**Résultats :** Les souches de *K. pneumoniae* étudiées montrent une grande capacité à survivre à différentes gammes de pH (5,1 à 8,1) et de température (18°C à 44°C). La durée de survie de ces souches dans les 3 types d'eaux dépourvues de nutriments est de 24h jusqu'à 10 jours. Ces souches montrent également une capacité à former des biofilms à l'exception de 3 souches. En outre, l'évaluation de la sensibilité de ces souches vis-à-vis des métaux lourds révèle quelles sont résistantes au cadmium et au mercure et sont sensibles au zinc et au cuivre, seule une souche est résistante au plomb. L'étude de l'efficacité des dilutions du désinfectant montre qu'aucune souche n'est résistante au désinfectant brut et seulement 7 souches sont sensibles à la dilution 1/200.

**Mots clés :** *K. pneumoniae*, Métaux lourds, Désinfectant, Biofilm, Environnement hospitalier, persistance.

**The aim of this study :** *K. pneumoniae* is an opportunistic pathogen with high epidemic potential frequently associated with severe infections. The aim of this study was to characterize the potential of these strains to survive and persist in different environmental conditions and their ability to form biofilms on inanimate surfaces in the hospital environment.

**Methodology :** The study of the effect of the temperature and the pH on the growth of these strains and their ability to survive in different water media are studied according to the method reported by Obeidat et al. (2014). Determining the sensitivity of the strains to some antibacterial agents such as heavy metals and disinfectant (ANIOS DVA HPH) is achieved by the method of spots on MH agar and by the tube method by determining their CMI. Finally, the study of the ability of *K. pneumoniae* strains to form a biofilm is performed by two methods RCA and TM.

**Results:** The *K. pneumoniae* strains studied show a high capacity to grow at different pH (5.1 to 8.1) and temperatures (18 ° C to 44 ° C) and to survive in the 3 types of water from 24 to 10 days. These strains also show the ability to form biofilms except for 3 strains. The evaluation of the sensitivity of these strains to heavy metals shows that all of these strains are resistant to cadmium and mercury and are sensitive to zinc and copper. The study of the effectiveness of the disinfectant shows that no strain grew in the presence of crude disinfectant and only 7 strains are sensitive to 1/200 dilution.

**Keywords:** *K. pneumoniae*, heavy metals, Disinfectant, Biofilm, hospital environment, persistence.