

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Faculté de Médecine

Année 2016

THÈSE N°

L'étude du biofilm de souches de *Escherichia coli* permet-elle de différencier les infections urinaires des bactériuries non pathologiques en pédiatrie ?

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement

le 13 mai 2016

par

Ludivine FANTHOU

née le 18/10/1987, à Périgueux.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Mme le Professeur Anne LIENHARDT-ROUSSIE Président
Mme le Professeur Marie-Cécile PLOY Juge
Mr le Professeur Laurent FOURCADE Juge
Mr le Professeur Vincent GUIGONIS Juge
Mr le Docteur Fabien GARNIER Directeur de thèse
Mme le Docteur Sandra DA RE Membre invité

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Faculté de Médecine

Année 2016

THÈSE N°

L'étude du biofilm de souches de *Escherichia coli* permet-elle de différencier les infections urinaires des bactériuries non pathologiques en pédiatrie ?

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement

le 13 mai 2016

par

Ludivine FANTHOU

née le 18/10/1987, à Périgueux.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Mme le Professeur Anne LIENHARDT-ROUSSIE.....Président
Mme le Professeur Marie-Cécile PLOY Juge
Mr le Professeur Laurent FOURCADE Juge
Mr le Professeur Vincent GUIGONIS..... Juge
Mr le Docteur Fabien GARNIER.....Directeur de thèse
Mme le Docteur Sandra DA RE Membre invité

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Denis VALLEIX

ASSESEURS : Monsieur le Professeur Jean-Jacques MOREAU
Monsieur le Professeur Pierre-Marie PREUX

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS :

ABOYANS Victor (CS)	CARDIOLOGIE
ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
ALDIGIER Jean-Claude (SUR. 31.08.2016)	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD Françoise (CS)	MEDECINE INTERNE
ARNAUD Jean-Paul (SUR. 31.08.2016)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
AUBARD Yves (CS)	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
AUBRY Karine	O.R.L.
BEDANE Christophe (CS)	DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE
BERTIN Philippe (CS)	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre (CS)	O.R.L.
BORDESSOULE Dominique (CS)	HEMATOLOGIE
CAIRE François	NEUROCHIRURGIE
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE Pierre (CS)	RADIOTHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre (CS)	PSYCHIATRIE d'ADULTES

COGNE Michel (CS)	IMMUNOLOGIE
CORNU Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIO- VASCULAIRE
COURATIER Philippe (CS)	NEUROLOGIE
DANTOINE Thierry (CS)	GERIATRIE et BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT
DARDE Marie-Laure (CS)	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
DESCAZEAUD Aurélien	UROLOGIE
DES GUETZ Gaëtan	CANCEROLOGIE
DESSPORT Jean-Claude	NUTRITION
DRUET-CABANAC Michel (CS)	MEDECINE et SANTE AU TRAVAIL
DUMAS Jean-Philippe (SUR. 31.08.2018) (CS)	UROLOGIE
DURAND-FONTANIER Sylvaine	ANATOMIE (CHIRURGIE DIGESTIVE)
ESSIG Marie (CS)	NEPHROLOGIE
FAUCHAIS Anne-Laure (CS)	MEDECINE INTERNE
FEUILLARD Jean (CS)	HEMATOLOGIE
FOURCADE Laurent (CS)	CHIRURGIE INFANTILE
GAINANT Alain (SUR. 31.08.2017)	CHIRURGIE DIGESTIVE
GUIGONIS Vincent	PEDIATRIE
JACCARD Arnaud	HEMATOLOGIE
JAUBERTEAU-MARCHAN Marie-Odile	IMMUNOLOGIE
LABROUSSE François (CS)	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LAROCHE Marie-Laure	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne (CS)	PEDIATRIE

LOUSTAUD-RATTI Véronique	HEPATOLOGIE
MABIT Christian	ANATOMIE
MAGY Laurent	NEUROLOGIE
MARQUET Pierre (CS)	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
MATHONNET Muriel	CHIRURGIE DIGESTIVE
MELLONI Boris (CS)	PNEUMOLOGIE
MOHTY Dania	CARDIOLOGIE
MONTEIL Jacques (CS)	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
MOREAU Jean-Jacques (CS)	NEUROCHIRURGIE
MOUNAYER Charbel	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
NATHAN-DENIZOT Nathalie (CS)	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
NUBUKPO Philippe	ADDICTOLOGIE
PARAF François (CS)	MEDECINE LEGALE et DROIT de la SANTE
PLOY Marie-Cécile (CS)	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PREUX Pierre-Marie	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
ROBERT Pierre-Yves (CS)	OPHTALMOLOGIE
SALLE Jean-Yves (CS)	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
SAUTEREAU Denis (CS)	GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE
STURTZ Franck (CS)	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE et MALADIES METABOLIQUES
TREVES Richard (SUR. 31.08.2018)	RHUMATOLOGIE
TUBIANA-MATHIEU Nicole (SUR. 31.08.2018) (CS)	CANCEROLOGIE
VALLEIX Denis (CS)	ANATOMIE (CHIRURGIE GENERALE)

VERGNENEGRE Alain (CS)	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
VERGNE-SALLE Pascale	THERAPEUTIQUE
VIGNON Philippe	REANIMATION
VINCENT François (CS)	PHYSIOLOGIE
VIROT Patrice (SUR. 31.08.2016)	CARDIOLOGIE
WEINBRECK Pierre (CS)	MALADIES INFECTIEUSES
YARDIN Catherine (CS)	CYTOLOGIE et HISTOLOGIE

PROFESSEUR ASSOCIE DES UNIVERSITES À MI-TEMPS DES DISCIPLINES MEDICALES

BRIE Joël	CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE et STOMATOLOGIE
------------------	--

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AJZENBERG Daniel	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
BARRAUD Olivier	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
BOURTHOUMIEU Sylvie	CYTOLOGIE et HISTOLOGIE
BOUTEILLE Bernard	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
CHABLE Hélène	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
DURAND Karine	BIOLOGIE CELLULAIRE
ESCLAIRE Françoise	BIOLOGIE CELLULAIRE
HANTZ Sébastien	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
JESUS Pierre	NUTRITION
LE GUYADER Alexandre	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIO- VASCULAIRE
LIA Anne-Sophie	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE

MARIN Benoît	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
MURAT Jean-Benjamin	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
QUELVEN-BERTIN Isabelle	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
TCHALLA Achille	GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT
RIZZO David	HEMATOLOGIE
TERRO Faraj	BIOLOGIE CELLULAIRE
WOILLARD Jean-Baptiste	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE

P.R.A.G

GAUTIER Sylvie	ANGLAIS
-----------------------	---------

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

BUCHON Daniel	MEDECINE GENERALE
----------------------	-------------------

PROFESSEURS ASSOCIES À MI-TEMPS DE MEDECINE GENERALE

DUMOITIER Nathalie	MEDECINE GENERALE
---------------------------	-------------------

PREVOST Martine	MEDECINE GENERALE
------------------------	-------------------

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES À MI-TEMPS

MENARD Dominique	MEDECINE GENERALE
-------------------------	-------------------

PAUTOUT-GUILLAUME Marie-Paule	MEDECINE GENERALE
--------------------------------------	-------------------

PROFESSEURS EMERITES

ADENIS Jean-Paul	du 01.09.2015 au 31.08.2017
-------------------------	-----------------------------

MERLE Louis	du 01.09.2015 au 31.08.2017
--------------------	-----------------------------

MOULIES Dominique	du 01.09.2015 au 31.08.2017
--------------------------	-----------------------------

VALLAT Jean-Michel	du 01.09.2014 au 31.08.2017
---------------------------	-----------------------------

Le 1^{er} novembre 2015

ASSISTANTS HOSPITALIERS UNIVERSITAIRES

BLANC Philippe	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
CHUFFART Etienne	ANATOMIE
DONISANU Adriana	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
FAYE Piere-Antoine	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
FREDON Fabien	ANATOMIE
KASPAR Claire	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
LEGRAS Claire	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
MANCIA Claire	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
MATHIEU Pierre-Alain	ANATOMIE (ORTHOPEDIE-TRAUMATOLOGIE)
OLOMBEL Guillaume	IMMUNOLOGIE
SERENA Claire	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION

CHEFS DE CLINIQUE - ASSISTANTS DES HOPITAUX

ARDOUIN Elodie	RHUMATOLOGIE
ASSIKAR Safaë	DERMATOLOGIE-VENERELOGIE
BIANCHI Laurent	GASTRO-ENTEROLOGIE (A compter du 12 novembre 2015)
BORDES Jérémie	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
BOURMAULT Loïc	OPHTALMOLOGIE
BUISSON Géraldine	PEDOPSYCHIATRIE
CASSON-MASSELIN Mathilde	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE

CAZAVET Alexandre	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
CHATAINIER Pauline	NEUROLOGIE
CHRISTOU Niki	CHIRURGIE DIGESTIVE
COSTE-MAZEAU Perrine	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE (SURNOMBRE du 01 .11.15 au 20.02.16)
CYPIERRE Anne	MEDECINE INTERNE A
DAIX Thomas	REANIMATION
DIJOUX Pierrick	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
DOST Laura	OPHTALMOLOGIE
EVENO Claire	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
GANTOIS Clément	NEUROCHIRURGIE
GARDIC Solène	UROLOGIE
GONZALEZ Céline	REANIMATION
GSCHWIND Marion	MEDECINE INTERNE B
HOUMAÏDA Hassane	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE (A compter du 02 novembre 2015)
JACQUES Jérémie	GASTRO-ENTEROLOGIE
KENNEL Céline	HEMATOLOGIE
LACORRE Aymeline	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
LAFON Thomas	MEDECINE d'URGENCE
LAVIGNE Benjamin	PSYCHIATRIE d'ADULTES
LE BIVIC Louis	CARDIOLOGIE
LE COUSTUMIER Eve	MEDECINE INTERNE A

LEGROS Emilie	PSYCHIATRIE d'ADULTES
LERAT Justine	O.R.L.
MARTIN Sylvain	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
MATT Morgan	MALADIES INFECTIEUSES
MESNARD Chrystelle	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
MONTCUQUET Alexis	NEUROLOGIE
PAPON Arnaud	GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT
PETITALOT Vincent	CARDIOLOGIE
PONTHIER Laure	PEDIATRIE
ROGER Thomas	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
SAINT PAUL Aude	PNEUMOLOGIE
SCOMPARIN Aurélie	O.R.L.
TAÏBI Abdelkader	CANCEROLOGIE
TRIGOLET Marine	PEDIATRIE

CHEF DE CLINIQUE – MEDECINE GENERALE

RUDELLE Karen

CHEF DE CLINIQUE ASSOCIE – MEDECINE GENERALE

(du 1^{er} novembre 2015 au 31 octobre 2016)

LAUCHET Nadège

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

BALLOUHEY Quentin
CHIRURGIE INFANTILE
(du 01.05.15 au 30.04.19)

CROS Jérôme
ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
(du 01.05.14 au 31.10.18)

Remerciements

Je remercie :

Dr Fabien GARNIER, pour votre aide, vos conseils, vos relectures successives, ainsi que votre sympathie et votre motivation permanente, qui ont permis de mener à bien ces recherches. Merci d'avoir encadré ce travail comme vous l'avez fait.

Dr Sandra DA RE, pour votre aide, votre patience et votre soutien. Pour toutes vos précieuses explications au cours des différentes étapes. Merci pour le temps que vous avez consacré à ce travail.

Pr Vincent GUIGONIS, pour avoir proposé ce travail. Pour votre soutien, votre écoute et vos précieux conseils. Merci de m'avoir accompagné tout le long de cette formation.

Pr Anne LIENHARDT-ROUSSIE, pour avoir accepté de présider ce jury. Merci de m'avoir permis d'accéder à cette formation de pédiatrie.

Pr PLOY et Pr FOURCADE, pour avoir accepté d'être présent, de lire et de juger ce travail.

Chaque sénior de pédiatrie, qui m'a accompagné et formé au long de ces quatre années. Merci de vos conseils et du partage de vos connaissances.

Mes collègues internes de pédiatrie, d'Alexandra L., première rencontrée, jusqu'à la promotion de garçons fraîchement arrivés (bon courage, mesdames !), pour leur amitié, leur soutien, et tous les bons moments partagés. Plus particulièrement, Audrey M, Audrey N., Rachel, Angélique, Thomas, toujours présents et partants pour de bons moments.

Tous mes collègues du laboratoire de recherche, pour leur patience, leur aide et leur sympathie.

Je remercie aussi :

Fanfan, pour ton amour si précieux, ta patience, ton aide et ton soutien permanents, pour tout ce que tu fais chaque jour pour moi, pour nous. Ta seule présence m'aide à croire en un bel avenir. Que nos projets se réalisent et que nous continuions à en construire chaque jour, main dans la main, en regardant loin devant. Je t'aime.

Maman, pour ton amour et ton soutien inconditionnels. Pour les sacrifices réalisés. Mais aussi pour tous ces moments de rire, de jeu, de chamailleries. Merci d'être ce que tu es, ce qui m'a permis d'en arriver là. Tu es mon souffle. Que tu poursuives dans cette voie du bonheur, tant mérité. Je t'aime.

Nono, pour ton amour, ton soutien, tes rires, pour être cette fabuleuse petite sœur. « Une petite sœur est une personne qui, en grandissant, devient votre meilleure amie ». Tu as confirmé ce proverbe, ma meilleure amie si précieuse. Que tout ce que tu m'as apporté te soit rendu au centuple (Théo, à toi de jouer !). Je t'aime.

Papa, pour ton amour et ton soutien, même si tu ne le sais pas toujours... Je t'aime.

Mamina... De là où tu es, je sais que tu m'accompagneras dans cette étape importante. J'espère te rendre fière. Merci pour toute cette joie, ces souvenirs d'enfance, ces moments partagés, ces goûters fabuleux, ton appétit d'ogresse et ton amour tout aussi grand... Tu me manques, je t'aime.

Fab', pour ta présence, la joie que tu amènes à la maison, le bonheur que tu mets dans les yeux de maman, l'amour que tu nous portes. Je t'aime.

Bruno et Mimi, pour votre soutien, votre sympathie, votre joie.

Marion, Raphaëlle, Fanny, pour ces rires, ces soirées et tous les autres bons moments partagés, passés et à venir.

Jute et Delphine, Dada et Aurélie, Dom et Cha (ainsi que Téano et Naïa), Chacha (ainsi que Philippe, Chloé et Camille, bien sûr), pour votre joie de vivre, votre amitié, votre soutien, les moments partagés. En espérant en avoir de nombreux autres. A très bientôt !

Droits d'auteurs



Cette création est mise à disposition selon le Contrat : « **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** » disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Table des matières

Introduction.....	14
1. Contexte	16
1.1. Infections urinaires chez l'enfant	16
1.1.1. Prévalence et facteurs de risque.....	16
1.1.2. Méthodes de recueil des urines	18
1.1.3. Aspects bactériologiques	18
1.2. Biofilms	20
1.2.1. Définition et description.....	20
1.2.2. Biofilms et infections urinaires.....	21
1.2.3. Modalités d'analyse.....	24
2. Matériel et méthodes	25
2.1. Définitions	25
2.2. Population d'étude	26
2.3. Mise au point du protocole.....	26
2.4. Quantification du biofilm	28
2.5. Analyses statistiques	28
3. Résultats	29
3.1. Caractéristiques de la population	29
3.1. Détermination du protocole par l'étude de différents paramètres.....	32
3.1.1. Choix de la microplaque.....	32
3.1.2. Choix du milieu de culture.....	32
3.1.3. Choix du temps de culture en microplaque.....	33
3.1.4. Choix de l'inoculum pour la formation de biofilm.....	33
3.1.5. Choix de l'atmosphère	34
3.1.6. Choix de la température.....	34
3.1.7. Protocole d'analyse.....	35
3.2. Capacité des souches à former du biofilm.....	35
3.3. Comparaison des infections urinaires et des bactériuries non pathologiques.....	36
3.4. Comparaison des sous-groupes.....	36
3.5. Effet d'un antécédent d'infection urinaire.....	37
4. Discussion	39
Conclusion.....	43
Références bibliographiques.....	44
Annexe : Préparation du milieu M63B1	49

Introduction

Les infections urinaires sont fréquentes durant l'enfance et représentent une part importante des dépenses de santé [1,2]. En 2003, pour 500 fillettes suivies en consultation dans le cadre d'infections urinaires récidivantes, le service d'urologie de Montpellier estimait le coût à 300 000 euros [3]. En 2015, aux urgences pédiatriques du CHRU de Limoges, 1,6% des consultations ont abouti au diagnostic d'infection urinaire. Parmi ces patients, 40% ont été hospitalisés (données non publiées).

Le diagnostic d'infection urinaire nécessite l'association d'une symptomatologie compatible et d'une culture d'urine positive. Il concerne 7% des enfants âgés de moins de deux ans fébriles sans point d'appel clinique et 7,8% des enfants âgés de deux à dix-neuf ans ayant des symptômes évocateurs d'une infection urinaire, qu'ils soient fébriles ou non [4]. Les récurrences surviennent dans un tiers des cas d'infection urinaire, chacune augmentant le risque de séquelles rénales permanentes [2]. Une bactériurie asymptomatique peut être identifiée chez 0,7% des enfants apyrétiques âgés de deux à vingt-quatre mois [5] et jusqu'à 3% chez les enfants d'âge préscolaire [6]. Celle-ci ne nécessite aucun traitement anti-infectieux chez l'enfant car elle est de résolution spontanée dans la majorité des cas [6]. Cependant, elle peut être responsable d'un diagnostic erroné d'infection urinaire et, par conséquent, d'une prescription injustifiée d'antibiotique [5].

En France comme dans les autres pays d'Europe, les résistances microbiennes se sont rapidement majorées au cours de la dernière décennie pour de nombreuses bactéries [7]. En 2002, moins de 0,1% des souches de *Escherichia coli* étaient résistantes aux céphalosporines de troisième génération, alors que ce taux atteignait 10% en 2012 [8]. Il semble alors indispensable de réduire le nombre des antibiothérapies injustifiées. A l'échelle des infections urinaires, ceci nécessite une distinction formelle entre les infections vraies (cystites et pyélonéphrites) nécessitant une antibiothérapie et les bactériuries asymptomatiques ou les contaminations d'échantillon, ne justifiant aucune thérapeutique anti-infectieuse.

Les souches de *E. coli* uropathogènes (UPEC) sont responsables d'environ 80% des infections urinaires chez l'enfant [9]. Non seulement celles-ci possèdent différents facteurs de virulence mais elles ont aussi la capacité de former un biofilm au niveau de la paroi vésicale [10]. De nombreuses études se sont attachées à décrire ce biofilm et à étudier son implication clinique, mais celles-ci sont peu nombreuses en pédiatrie [11–13].

Le but de notre étude prospective était d'étudier la capacité de souches de *E. coli* isolées d'urines d'enfants à former du biofilm, afin de voir si ce critère permettait de distinguer les infections urinaires (pyélonéphrites et cystites) des bactériuries non pathologiques (bactériuries asymptomatiques et contaminations d'échantillon). La distinction entre ces deux groupes permettrait un diagnostic de certitude des infections urinaires et donc une attitude thérapeutique adaptée, notamment vis-à-vis de l'antibiothérapie.

1. Contexte

1.1. Infections urinaires chez l'enfant

1.1.1. Prévalence et facteurs de risque

Les infections urinaires affectent 0,1% à 0,4% des nourrissons de sexe féminin. La prévalence augmente ensuite jusqu'à 1,4% avant cinq ans, pour atteindre 2,3% en période d'âge scolaire. Concernant les garçons, 0,2% des nourrissons circoncis et 0,7% des nourrissons non circoncis présentent une infection urinaire. Le risque se maintient entre 0,1 et 0,2% en période d'âge préscolaire, puis diminue entre 0,04 et 0,2% à l'âge scolaire. En période prépubertaire, les infections urinaires sont décrites chez 3% des jeunes filles contre 1% des garçons. Après un premier épisode d'infection urinaire avant l'âge de un an, 35% des garçons et 32% des filles présenteront un nouvel épisode dans les trois années qui suivent, dont 18% surviendront au cours des premiers mois. Chaque récurrence de pyélonéphrite augmente le risque de cicatrice rénale et, par conséquent, de maladie rénale à l'âge adulte [2]. Les pyélonéphrites peuvent entraîner des dommages rénaux transitoires dans 40% des cas et des séquelles permanentes dans 5% des cas [9].

En 2008, au cours d'une méta-analyse recensant 330 articles, Shaikh *et al.* [4] ont déclaré que le diagnostic d'infection urinaire était réalisé chez 7% (IC95% : 5,5-8,4) des enfants fébriles âgés de moins de deux ans, sans point d'appel clinique. D'après ces auteurs, la prévalence selon le genre et l'âge dans une population d'enfants fébriles était la suivante : 7,5% des filles et 8,7% des garçons âgés de moins de trois mois, 5,7% des fillettes et 3,3% des garçons âgés de trois à six mois, 8,3% des filles et 1,7% des garçons âgés de six à douze mois et enfin, 2,1% des filles âgées de douze à vingt-quatre mois. Au cours de cette méta-analyse, il a été noté une prédominance significative des infections urinaires chez l'enfant de peau blanche (8,0%) par rapport à l'enfant afro-américain (4,7%). Chez les enfants âgés de deux à dix-neuf ans présentant des symptômes évocateurs, avec ou sans fièvre, le diagnostic d'infection urinaire était retenu dans 7,8% (IC95% : 6,6-8,9) des cas seulement, relevant le manque de spécificité des signes cliniques dans la population pédiatrique.

Chez les enfants d'âge préscolaire, 13,6% de ceux ayant eu un épisode d'infection urinaire présentent une récurrence. Celles-ci sont dues à des UPEC dans 78% des cas, parmi lesquels 61% sont résistants. Les récurrences sont statistiquement plus fréquentes chez les enfants à peau blanche, dans la tranche d'âge de trois à quatre ans et chez les enfants ayant un reflux vésico-urétéral (RVU) de grade 4 ou 5. L'antibioprophylaxie ne s'associe pas à une diminution de la fréquence des récurrences, mais à une augmentation significative des résistances bactériennes [14].

Une bactériurie asymptomatique est identifiée chez 1% à 3% des enfants en âge préscolaire et chez 1% des enfants plus âgés. Environ un tiers de ces enfants a présenté ou présentera un épisode d'infection urinaire symptomatique. Les filles présentent un risque de récurrence de la bactériurie asymptomatique dans 50% à 80% des cas après une antibiothérapie, impliquant des souches différentes dans la majorité des cas. Même chez le très jeune enfant, l'évolution se fait principalement vers la résolution spontanée. L'abstention thérapeutique est justifiée par l'absence de lésion rénale associée à la bactériurie asymptomatique [6].

De nombreux auteurs ont décrit l'effet protecteur de la circoncision [2,4,9,14]. Foxman *et al.* [2] ont rapporté une augmentation majeure et significative du nombre d'infection urinaire (12 fois plus fréquente) et d'hospitalisation pour infection urinaire (0,7% vs 0,2%) chez l'enfant âgé de moins de six mois non circoncis par rapport à l'enfant circoncis.

Dans les recommandations communes du Groupe de Pathologie Infectieuse Pédiatrique (GPIP), de la Société Française de Pédiatrie (SFP) et de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF), les facteurs de risque d'infection urinaire sont clairement identifiés chez le nourrisson et le jeune enfant [15]. Pour l'American Academy of Pediatrics (AAP), ils sont définis selon le sexe de l'enfant [5]. Ces facteurs de risque sont détaillés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Facteurs de risque d'infection urinaire chez le jeune enfant, d'après les sociétés françaises et américaine

GPIP-SFP-SPILF ^a	AAP ^b	
- âge < 3 mois - sexe masculin - antécédent de pyélonéphrite ou d'uropathie - fièvre isolée > 39°C depuis plus de 48 heures	<u>Chez la fille :</u> - peau blanche - âge < 12 mois - fièvre ≥ 39°C ≥ 2 jours - absence d'autre point d'appel infectieux Si ≤ 1 facteur présent : risque ≤ 1% Si ≤ 2 facteurs présents : risque ≤ 2%	<u>Chez le garçon :</u> - autre que peau noire - fièvre ≥ 39°C > 24 heures - absence d'autre point d'appel infectieux <u>Si non circoncit :</u> même en l'absence de facteur associé, risque ≥ 1% <u>Si circoncit :</u> - si ≤ 2 facteurs associés, risque ≤ 1% - si ≤ 3 facteurs associés, risque ≤ 2%

^a Groupe de Pathologie Infectieuse Pédiatrique (GPIP), Société Française de Pédiatrie (SFP) et Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF).

^b American Academy of Pediatrics (AAP).

1.1.2. Méthodes de recueil des urines

Différentes méthodes de recueil des urines sont recommandées par les sociétés savantes [5,15,16]. Parmi elles, la ponction sus-pubienne est rarement réalisée en pratique courante [17], du fait de son caractère invasif et de la nécessité d'être réalisée par une personne expérimentée. Le sondage urétral est de réalisation plus simple et se présente comme l'alternative satisfaisante. De façon plus discutable, l'urine peut être recueillie en milieu de jet, mais cette méthode nécessite que l'enfant soit continent et impose au préalable une désinfection cutanée correcte en regard du méat urétral, ainsi que l'élimination indispensable du premier jet mictionnel. Enfin, le recueil peut se faire par le biais d'une poche, dans le cadre d'un dépistage utilisant la bandelette urinaire, mais cette méthode n'est pas recommandée pour un diagnostic de certitude.

Selon le mode de recueil des urines, la contamination du prélèvement par les germes cutanés, digestifs, vaginaux ou préputiaux varie considérablement. En effet, pour des urines recueillies dans une poche, le taux de contamination est de 62,8%, significativement supérieur à la contamination des échantillons recueillis par sondage urétral (9,1%). Le recueil par poche pour le diagnostic d'infection urinaire aboutit à 4,8 fois plus d'antibiothérapies, 15,6 fois plus de traitements prolongés, 4,1 fois plus d'exams d'imagerie et 12,4 fois plus d'hospitalisations [18] que lors d'un recueil par les méthodes recommandées.

Lorsque les performances de la poche à urine et du sondage urétral pour le diagnostic d'infection urinaire sont comparées, le recueil d'urine par poche est significativement plus sensible que celui par sondage (85% contre 71%), quelque soit le sexe du patient. Cependant, le recueil d'urine par poche est beaucoup moins spécifique (45% contre 95%), d'autant plus chez le garçon. Ceci surestime largement le diagnostic d'infection urinaire, par confusion entre les contaminations et les infections vraies, responsable de nombreux faux positifs [19]. Ceci a été confirmé par Etoubleau *et al.* qui ont retrouvé, en cas d'utilisation d'une poche, 7,5% de faux positifs et 39% de faux négatifs. Cependant, dans leur étude, 7,7% des sondages urétraux étaient soldés par un échec (absence de montée possible de la sonde ou absence d'urine malgré un sondage correct) [17].

1.1.3. Aspects bactériologiques

Environ 80% des infections urinaires de l'enfant sont dues à des UPEC [9,20]. Ils possèdent de nombreux facteurs de virulence (flagelle, curli, fimbriae P, fimbriae de type 1, hémolysine, aérobactine, adhésine, etc.) décrits à plusieurs reprises [21–24]. Plus de 90% des souches de *E. coli* responsables de pyélonéphrites en pédiatrie sont porteuses de

fimbriae [25]. La capacité des UPEC à former un biofilm est considéré comme un facteur de virulence permettant le développement bactérien en milieu hostile [26].

Les autres germes les plus souvent identifiés dans les infections urinaires sont *Klebsiella* (entre 2,6% [19] et 3,2% [17]) et *Proteus mirabilis* (7,8% [19]) qui prédomine chez le garçon (réservoir préputial) ou en cas de lithiase associée. Plus rarement, d'autres bacilles à Gram négatif peuvent être impliqués (*Pseudomonas* et *Enterobacter* notamment). Les germes de type cocci à Gram positif (streptocoque du groupe B et entérocoque : 4,3% [17]) sont surtout présents chez le nouveau né et le nourrisson, alors que *Staphylococcus saprophyticus* est identifié majoritairement chez l'adolescente. Les infections fongiques, rares, se rencontrent lors d'immunodépression ou d'antibiothérapie de long cours [9].

Concernant la résistance bactérienne, il est bien connu qu'un usage massif des antibiotiques crée une lourde pression de sélection sur les flores bactériennes, aboutissant à l'acquisition de résistances nouvelles [27–29]. Les résistances aux antibiotiques augmentent chaque année, en France, en Europe et Outre-Atlantique. En 2013, l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) a signalé une augmentation importante des souches de *E. coli* résistantes aux céphalosporines de troisième génération (C3G) : moins de 0,1% en 2002 contre 10% en 2012 (figure 1). L'évolution de la résistance de *E. coli* aux C3G est plus rapide en France que dans d'autres pays, la faisant ainsi passer de la sixième position en 2002 à la quinzième en 2012 au classement des sensibilités bactériennes des pays du réseau EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) [8].

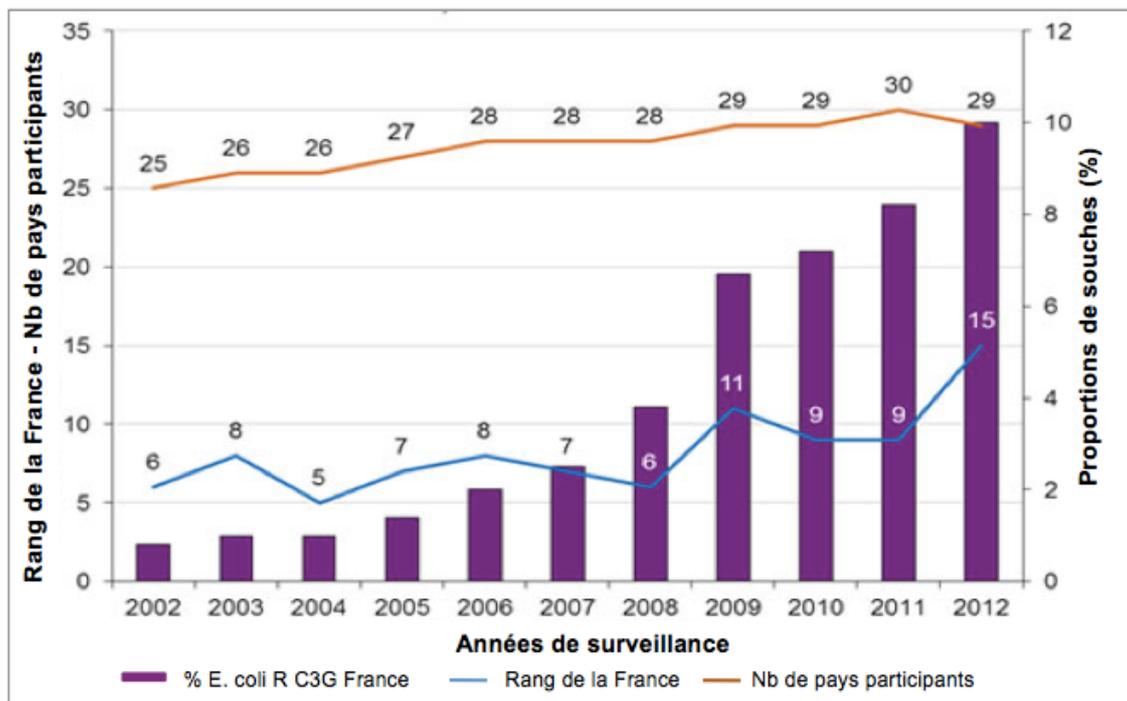


Figure 1 : Evolution de la résistance de *E. coli* aux C3G en France entre 2002 et 2012 (souches isolées d'hémocultures et de cultures de LCR), selon l'InVS [8]

L'OMS, en 2014, a constaté des taux élevés de résistance pour de nombreuses bactéries (dont *E. coli*) vis-à-vis des C3G et des quinolones, dans de nombreux pays d'Afrique, d'Amérique, de Méditerranée orientale et d'Asie du Sud-Est [7]. L'étude récente de Kahlmeter *et al.* [30] a confirmé la tendance : ils ont décrit l'évolution des résistances des UPEC impliqués dans les infections urinaires non compliquées en Europe (France, Espagne, Suède, Royaume-Uni, Allemagne) et ont constaté, depuis 2008, une augmentation significative du taux de résistance dans chacun des pays, pour les antibiotiques de type cefadroxil, ciprofloxacine, triméthoprime, mécillinaam et nitrofurantoïne, dans des proportions variables. Dans ces pays, 4,8% des souches sont productrices de BLSE, avec des extrêmes allant de 2,4% en France à 10,5% en Allemagne [30].

Au vu de ces données, la nécessité d'un diagnostic de certitude pour les infections urinaires prend toute sa dimension : il semble indispensable pour permettre une prescription justifiée d'antibiotique, afin de freiner l'évolution rapide des résistances bactériennes.

1.2. Biofilms

1.2.1. Définition et description

L'adhérence des bactéries aux surfaces inertes est connue depuis de nombreuses années, mais la description de la structure élaborée du biofilm a débuté au cours des années 80-90. Le biofilm bactérien est décrit à plusieurs reprises par Costerton *et al.* comme une communauté bactérienne structurée, enfermée dans une matrice polymérique autoproduite, adhérente à une surface inerte ou vivante [26].

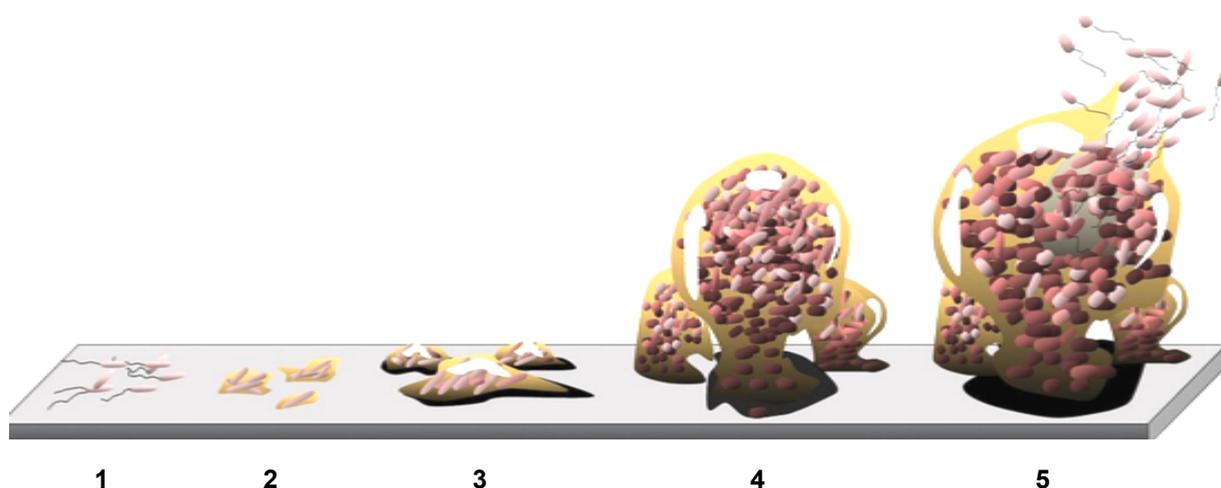


Figure 2 : Développement du biofilm bactérien : 1/ attachement initial, bactéries planctoniques ; 2/ attachement définitif ; 3 et 4/ maturisation du biofilm, bactéries sessiles ; 5/ dispersion des bactéries planctoniques [34]

Chaque bactérie interagit avec son environnement propre [31], vivant à l'état sessile dans une micro-niche au sein d'une communauté bactérienne complexe qui possède sa propre homéostasie, un système de circulation primaire (circulation des nutriments, des

déchets, etc.) et une coopération métabolique. Les bactéries sessiles sont régulièrement libérées, passant alors en phase planctonique pour se multiplier et former un nouveau biofilm, en phase sessile (figure 2) [32–34]. Le biofilm constitue un mode de protection permettant la survie et la croissance des bactéries en milieu hostile.

De nombreuses bactéries ont la capacité de former du biofilm : *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, etc. et plus de 50% des infections bactériennes impliquent la formation d'un biofilm [26]. Les bactéries au sein du biofilm possèdent une grande résistance aux antibiotiques [26,35].

1.2.2. Biofilms et infections urinaires

La formation d'un biofilm au cours des infections urinaires a été évoquée dès 1985 par Elliot *et al.* [36], qui ont réalisé des biopsies vésicales à des patients ayant une histoire d'infection urinaire à répétition et des urines stériles au moment de l'examen. Ils ont décrit pour la première fois des bactéries persistantes sur l'épithélium vésical et ont alors suggéré que l'absence de bactéries détectées dans les urines ne reflétait pas l'absence de bactéries dans la vessie. En inoculant dans des vessies de souris des UPEC isolés de cystites diagnostiquées chez des femmes, Mulvey *et al.* [10] ont constaté l'invasion de la paroi vésicale par des communautés bactériennes et les ont quantifiés au fil du temps. Le nombre de ces communautés bactériennes diminuait rapidement dans les premières heures de l'infection, du fait d'une exfoliation massive de l'épithélium et de l'afflux de polynucléaires neutrophiles. Mais, deux à sept jours après, leur quantité restait stable, et ceci jusqu'à six semaines, créant un réservoir quiescent de bactéries indétectables dans 58% des échantillons d'urines.

Concernant la quantification du biofilm, peu d'études ont été menées *in vivo*. Garofalo *et al.* [37] ont analysé les biofilms formés après inoculation dans des vessies de souris de souches responsables d'infections urinaires chez des femmes. Quinze souches sur dix-huit formaient du biofilm *in vivo* (83,3%). Le biofilm formé au cours des cystites aiguës était moins fréquent et plus petit que celui formé par les souches responsables de cystites récurrentes, de pyélonéphrites et de bactériuries asymptomatiques. De plus, le biofilm de ces trois dernières persistait plus longtemps. Ce résultat était significatif, malgré un échantillon de petite taille (cinq souches de bactériuries asymptomatiques, quatre cystites aiguës, cinq cystites récurrentes et quatre pyélonéphrites). Dans une autre étude, les communautés bactériennes produites *in vivo* au cours des infections urinaires à UPEC, *S. saprophyticus*, *Enterococcus*, *Enterobacter aerogenes*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* et *Citrobacter diversus* ont été visualisées au microscope (optique et électronique) puis leur présence a ensuite été confirmée par immunofluorescence [38]. Le nombre de

communautés bactériennes ne différait pas entre les urines de femmes ayant une infection urinaire et celles n'étant pas infectées. Cependant, la fréquence des communautés bactériennes augmentait significativement avec l'augmentation de la durée des symptômes (supérieur ou égal à trois jours) et du nombre de germes dans les urines. Robino *et al.* [13] ont été les seuls auteurs à avoir réalisé une étude *in vivo* en population pédiatrique, en 2014. Les communautés bactériennes ont été visualisées en microscopie dans des échantillons d'urine fraîche colorés au Wright-Giemsa puis leur présence a été confirmée par immunofluorescence. Ces auteurs ont étudié 74 UPEC issus d'une population pédiatrique, dont 38 étaient responsables d'infections urinaires récurrentes. Le mode de recueil des urines n'était pas décrit. Quarante-six pourcent des UPEC formaient des communautés bactériennes. Il n'y avait pas d'association significative entre leur présence et les facteurs de virulence déterminés par PCR. Cependant, elles étaient statistiquement plus fréquentes en cas d'infection urinaire récurrente, de symptômes d'infection urinaire basse, d'absence de fièvre et d'absence d'anomalie du tractus urinaire.

La majorité des études de formation de biofilm par des UPEC ont été réalisées *in vitro*. Certains auteurs ont tenté de distinguer le type d'infection urinaire par l'analyse du biofilm formé. Kanamaru *et al.* [39] ont comparé 377 UPEC, impliqués dans 194 cystites, 76 pyélonéphrites et 107 prostatites, et observé que les souches responsables des prostatites formaient significativement plus de biofilm *in vitro* que celles impliquées dans les cystites et les pyélonéphrites. Dans le même but, Soto *et al.* [40] ont analysé 151 UPEC (44 cystites, 75 pyélonéphrites et 32 prostatites) et déterminé que 46% des souches formaient du biofilm *in vitro*, différemment au sein de chaque groupe : 43% des souches responsables de cystites, 40% dans le groupe des pyélonéphrites et 63% pour les prostatites. La différence n'était significative qu'entre les groupes des prostatites et des pyélonéphrites. Salo *et al.* [11], qui ont mené la première étude impliquant une population pédiatrique, en 2009, ont étudié 70 souches d'UPEC dont 34 provenant d'enfants. Le recueil d'urine chez les enfants a été réalisé par une ponction sus-pubienne, un sondage urétral ou la pose d'une poche à urine. Trente et un pourcent des souches formaient du biofilm *in vitro*, indifféremment selon l'âge. La quantité de biofilm était significativement plus élevée avec les bactéries isolées de pyélonéphrites que de cystites dans la population pédiatrique. Cette différence n'était pas confirmée chez les adultes. Aucun lien n'existait entre la quantité de biofilm et l'évolution vers un sepsis à point de départ urinaire. La quantité de biofilm formé était plus élevée pour les souches sensibles aux différents antibiotiques que pour les souches résistantes. De façon similaire, dans la deuxième étude s'intéressant à une population pédiatrique menée en 2013, Tapiainen *et al.* [12] ont comparé 206 souches issues d'urines d'enfants, responsables de cystites aiguës (n=84) et récurrentes (n=34), de pyélonéphrites aiguës (n=78) et

récurrentes (n=10). Le recueil d'urine a été réalisé en milieu de jet, par le biais d'une poche à urine, d'un sondage urétral ou d'une cathétérisation sus-pubienne. En accord avec les résultats de Salo *et al.* [11], la formation de biofilm *in vitro* était plus élevée dans le groupe des pyélonéphrites (aigües et récurrentes confondues) que dans celui des cystites. Il n'existait aucun lien avec la présence d'anomalie du tractus urinaire à l'échographie ou avec la sensibilité des souches aux antibiotiques.

Les résultats de l'étude de Marhova *et al.* [41], menée sur une cohorte adulte et comparant la formation de biofilm d'UPEC responsables de 15 cystites, 25 pyélonéphrites, 5 prostatites et 5 bactériuries asymptomatiques, étaient en contradiction avec les études précédentes. Seulement 24% de leurs souches formaient du biofilm *in vitro* et aucune association significative n'était décrite entre la quantité de biofilm formé et le type d'infection urinaire, la résistance aux antibiotiques ou la présence de facteurs de virulence.

Des études s'étaient intéressées à la distinction des infections urinaires récidivantes et des réinfections par l'analyse du biofilm formé *in vitro*. Soto *et al.* [42] ont analysé 80 UPEC et ont trouvé une différence significative : 74% des souches responsables de rechutes formaient du biofilm contre 42% des souches responsables de réinfections. La présence du gène codant la yersiniabactim (*fyu*) était statistiquement différente entre les deux groupes : présence dans 74% des rechutes et 51% des réinfections. En cas de prostatite, la formation de biofilm était associée de façon significative à l'expression de *curli*. Néanmoins, Ejrnaes *et al.* [43] n'ont pas retrouvé de différence de formation de biofilm *in vitro* en cas d'infection urinaire persistante, de rechute, de réinfection ou de guérison. Dans leur étude, l'hémolysine était plus fréquente et le nombre total de facteur de virulence plus important en cas de persistance ou de rechute.

Par ailleurs, Hancock *et al.* [44] ont comparé le biofilm produit *in vitro* par des souches au cours de bactériuries asymptomatiques ou d'infections urinaires symptomatiques. Les souches des cas asymptomatiques formaient statistiquement plus de biofilm que celles isolées d'infections urinaires, les facteurs de virulence analysés étant similaires dans les deux groupes. Néanmoins, les échantillons étaient de petite taille avec 4 UPEC responsables d'infections urinaires et 9 responsables de bactériuries asymptomatiques.

Ensuite, Rijavec *et al.* [45] ont étudié le lien entre la formation de biofilm et l'existence d'une bactériémie à point de départ urinaire. Le biofilm formé *in vitro* par 105 UPEC (dont 88 souches issues de patients immunodéficients) a été mesuré. Bien que 56% des souches formaient du biofilm, aucun lien n'a été retrouvé entre la capacité à former du biofilm et l'implication dans une bactériémie à point de départ urinaire.

Enfin, Maheswari *et al.* [46] ont déterminé l'existence d'un lien entre la formation du biofilm et la capacité lithogène en comparant 20 UPEC isolés de fragments de lithiases et 23 UPEC isolés d'infection urinaire communautaire. Dans leur population, 56% des souches responsables d'infection urinaire et 100% des souches impliqués dans la formation de lithiases formaient du biofilm.

1.2.3. Modalités d'analyse

Le gold standard pour l'analyse du biofilm *in vitro* est la coloration par le crystal violet puis la quantification par mesure de la densité optique (DO) du biofilm formé par une culture bactérienne, soit en microplaque, soit en tube à essai. Cependant, les modalités d'analyse ne sont pas standardisées, chaque auteur utilisant des conditions de culture (milieu, température, condition d'aérobiose, temps de culture) et de mesure (type de colorant, longueur d'onde utilisée pour la mesure de la DO) différentes [11,12,39–45]. L'utilisation de méthodologies différentes rend difficile la comparaison des résultats des articles publiés.

Certains auteurs ont cherché à décrire les conditions optimales pour l'analyse du biofilms. Naves *et al.* [47] ont comparé deux milieux pauvres (M63 et M9) supplémentés avec du glucose 0,8% et deux milieux riches (lysogeny broth LB et Mueller-Hinton MH-II). Ils ont comparé aussi deux protocoles : l'un utilisant directement des cultures lancées la veille (over/night o/n, en phase de croissance stationnaire) et l'autre utilisant la même culture mais diluée et relancée pour quelques heures (over/day o/d, en phase de croissance exponentielle), ainsi que plusieurs formules mathématiques pour la quantification du biofilm (dont une prenant en compte la croissance bactérienne). La coloration était réalisée au crystal violet. Ces travaux ont montré que la formation de biofilm était significativement plus élevée dans les milieux MH-II et M9 et plus faible dans les milieux M63 et LB pour toutes les cultures en phase de croissance stationnaire. Cependant, les résultats obtenus variaient considérablement d'une souche à l'autre, la différence allant jusqu'à 31,3% selon la formule utilisée. D'autres études ont aussi montré l'influence du milieu de culture sur la formation du biofilm en fonction des souches [48,49].

2. Matériel et méthodes

2.1. Définitions

Les infections urinaires incluaient les pyélonéphrites et les cystites. Le diagnostic de pyélonéphrite, défini à partir de données cliniques, biologiques et bactériologiques inspirées de la définition utilisée par Shaikh *et al.* dans la revue Cochrane 2015 [50], nécessite la totalité des critères suivants :

- une fièvre, isolée sans point d'appel infectieux ou associée à des signes cliniques compatibles : douleur abdominale, douleur en fosse lombaire unilatérale ou bilatérale, spontanée ou déclenchée à la palpation, présence d'un contact lombaire à la palpation ou de signes fonctionnels urinaires. La fièvre était définie, en accord avec différents auteurs [9,51] et les recommandations de l'AAP [5], par une température supérieure ou égale à 38°C, mesurée en axillaire à l'arrivée aux urgences pédiatriques. Les signes fonctionnels urinaires incluaient les brûlures mictionnelles, la dysurie, la pollakiurie, la nycturie, les impériosités et l'hématurie [52,53] ;

- un syndrome inflammatoire biologique, défini par une CRP supérieure ou égale à 20 mg/l. En cas de fièvre évoluant depuis moins de 12 heures, une CRP normale n'excluait pas le diagnostic ;

- un examen cyto bactériologique des urines (ECBU) positif, défini par une culture monobactérienne avec une bactériurie supérieure ou égale à 10⁴ unités faisant colonie (UFC)/ml en cas d'urine recueillie par sondage, supérieure ou égale à 10⁵ UFC/ml en cas de recueil réalisé en milieu de jet ou par poche, ou quelque soit le seuil en cas d'urine recueillie par ponction sus-pubienne.

Le diagnostic de cystite était retenu en présence des critères suivants :

- une clinique évocatrice : signes fonctionnels urinaires, douleur pelvienne ou hypogastrique ;

- une absence de fièvre ;

- une absence de syndrome inflammatoire, en cas de bilan sanguin réalisé ;

- un ECBU positif, selon les mêmes critères que ceux des pyélonéphrites.

Les bactériuries non pathologiques incluaient les bactériuries asymptomatiques et les contaminations d'échantillon par les germes périnéaux. Le diagnostic de bactériurie asymptomatique était réalisé devant l'association des éléments suivants :

- un enfant asymptomatique, ou une anamnèse et une clinique évocatrice d'un diagnostic différentiel des infections urinaires ;

- un ECBU avec une bactériurie significative, supérieure ou égale au seuil défini pour les infections urinaires ;

- l'absence d'apparition de fièvre, de signes évocateurs d'infection urinaire ou d'évolution vers un sepsis dans les sept jours suivants la réalisation de l'ECBU, malgré l'absence de thérapeutique.

Les contaminations d'échantillon étaient définies par la présence des éléments suivants :

- un ECBU avec une bactériurie inférieure au seuil défini pour les infections urinaires ou une culture polybactérienne sans prédominance ;

- l'absence d'apparition de fièvre, de signes évocateurs d'infection urinaire ou d'évolution vers un sepsis dans les sept jours suivants la réalisation de l'ECBU, malgré l'absence de thérapeutique.

Les tableaux cliniques ne répondant à aucune de ces définitions étaient considérés comme « indéterminés » et les souches correspondantes n'étaient pas analysées.

2.2. Population d'étude

Entre janvier et décembre 2015, au CHRU de Limoges, des souches urinaires pédiatriques de *E. coli* ont été incluses de façon prospective. Les inclusions ont été réalisées au hasard des échantillons successifs dans lesquels une culture de *E. coli* était identifiée, indépendamment du seuil de bactériurie, de leucocyturie et des caractéristiques de l'enfant dont provenait l'échantillon. Ces échantillons d'urine étaient recueillis aux urgences pédiatriques de l'Hôpital Mère-Enfant de Limoges. Les souches ont été conservées à -80°C jusqu'à leur étude.

Secondairement, les données anamnestiques, cliniques, biologiques et bactériologiques de chaque patient ont été recueillies grâce au dossier médical informatisé.

Ainsi, les souches ont pu être classées selon le tableau clinique responsable de la bactériurie : infection urinaire (cystite et pyélonéphrite) ou bactériurie non pathologique (contamination et bactériurie asymptomatique), d'après les définitions décrites précédemment. Pour certaines, la distinction n'a pu être réalisée du fait de données insuffisantes ou de tableau clinique atypique. Ces dernières, indéterminées, ont été exclues.

2.3. Mise au point du protocole

L'influence des différents paramètres de culture sur la capacité des souches à former du biofilm a été étudiée afin de définir un protocole pour la réalisation de notre étude. Initialement, deux souches de laboratoire, MG1656F' et TG1, ont été utilisées, puis cinq des

souches cliniques incluses ont ensuite permis de poursuivre les analyses. A chaque étape, la totalité des souches utilisées ont été mises en culture simultanément dans 5 ml de milieu, par inoculation à partir d'une culture pure sur gélose au sang, et ont bénéficié des mêmes conditions pour la quantification du biofilm.

Comparaison de matériaux de surface

Deux types de microplaque ont été utilisées : une en PVC (BD falcon 96 puits U bottom) et une en polystyrène (NUNC 96 puits flat bottom). Des cultures de MG1656F' et de TG1 ont été placées à 37°C sous agitation pendant environ 18 heures. Des dilutions au 100^{ième} de ces dernières ont été réparties en triplicate dans chacune des microplaques, mises en incubation à 37°C en aérobiose, sans agitation pendant 24 heures, avant la quantification du biofilm formé.

Comparaison de milieux de culture

Trois milieux riches (lysogeny broth (LB), brain heart infusion (BHI) et MH) et trois milieux pauvres (Davis enrichi de 0,2% de glucose, thioglycolate et M63B1-glu (voir annexe)) ont été comparés en utilisant par commodité uniquement la souche MG1656F'. La culture de la souche et l'analyse des microplaques étaient réalisées selon le protocole décrit ci-dessus, avant la quantification du biofilm formé.

Etude du temps de culture

Les cultures de cinq souches cliniques ont été réalisées d'après les conditions citées précédemment et incubées 24, 48 et 72 heures, respectivement, avant la quantification du biofilm formé.

Etude de l'inoculum initial

Trois types d'inoculum ont été étudiés pour les cinq souches cliniques :

- 1/ culture de la veille (over/night o/n) ;
- 2/ culture o/n diluée au 100^{ième} (o/n 100^{ième}) avant ensemencement des plaques ;
- 3/ culture o/n diluée au 100^{ième} et remise à pousser à 37°C sous agitation pour environ 4 heures avant ensemencement des plaques (over/day o/d).

Toutes les cultures ont été réparties en microplaques et incubées à 37°C pendant 48 heures, avant la quantification du biofilm formé.

Etude de l'atmosphère

Les cinq souches cliniques ont été mises en culture selon le protocole utilisé ci-dessus et les microplaques ont été incubées à 37°C pendant 48 heures, l'une en condition d'aérobiose et l'autre en condition d'anaérobiose, avant la quantification du biofilm formé.

Etude de la température

Les microplaques inoculées ont été incubées à 37°C et 30°C, avant la quantification du biofilm formé.

2.4. Quantification du biofilm

La quantification du biofilm formé a été réalisée selon le protocole suivant :

- trois lavages de la microplaque à l'eau distillée ;
- séchage des puits 30 minutes à 60°C ;
- coloration de la plaque pendant 15 minutes avec 125 µl de crystal violet 1% ;
- trois lavages de la microplaque à l'eau distillée ;
- suspension du biofilm coloré dans 150 µl d'éthanol 96% ;
- lecture de la DO à 570 nm ;
- calcul de la quantité du biofilm formé (QBF) par la formule suivante :

$$\text{QBF} = \text{DO}_{570\text{nm}} \text{ culture} - \text{DO}_{570\text{nm}} \text{ milieu},$$

où « $\text{DO}_{570\text{nm}}$ culture » correspond à la $\text{DO}_{570\text{nm}}$ des puits contenant les cultures de chaque souche et « $\text{DO}_{570\text{nm}}$ milieu » à la $\text{DO}_{570\text{nm}}$ des puits contenant le milieu servant de blanc.

D'après Naves *et al.* [47], les souches peuvent être classées selon leur capacité à former du biofilm en « fortes productrices » ($\text{DO} \geq 0,30$), « productrices modérées » ($0,20 \leq \text{DO} \leq 0,29$), « faibles productrices » ($0,10 \leq \text{DO} \leq 0,19$) ou « non productrices » ($\text{DO} < 0,10$).

2.5. Analyses statistiques

Les variables qualitatives (permettant l'analyse des caractéristiques des populations) ont été exprimées en pourcentage et ont été comparées par le test exact de Fisher.

Les variables quantitatives (permettant d'estimer la formation de biofilm en fonction des conditions ou selon la nature des souches) ont été exprimées en médiane et écart interquartile ou en moyenne et écart-type et ont été comparées par un test non paramétrique de Mann-Whitney (lorsque deux variables étaient concernées) ou par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis (lorsque trois variables ou plus étaient concernées).

Un seuil de $p < 0,05$ était considéré comme statistiquement significatif.

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé avec le logiciel StatPlus (AnalystSoft Inc., StatPlus : mac - statistical analysis program for Mac OS, version v5).

3. Résultats

3.1. Caractéristiques de la population

Parmi les 79 souches incluses, 14 ont été exclues : 11 provenaient d'enfant ayant une présentation clinique indéterminée et pour 3 souches, les données démographiques et biologiques étaient disponibles mais aucune donnée clinique n'a pu être recueillie. Sur les 65 souches analysées, 73,8% provenaient d'infections urinaires et 26,2% de bactériuries non pathologiques. Le diagramme de flux de cette étude est présenté en figure 3.

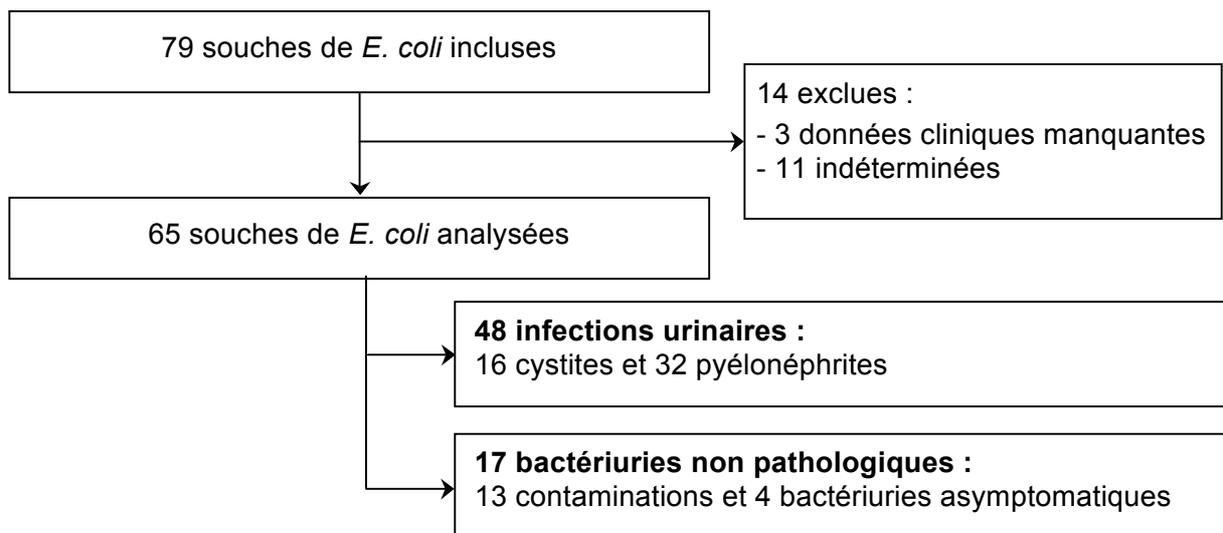


Figure 3 : Diagramme de flux

Plus de 78% des patients étaient de sexe féminin. Au sein du groupe des infections urinaires, la proportion de filles était de 77% et de 82,6% au sein des bactériuries non pathologiques. L'âge médian était de 4,6 ans, avec des extrêmes de 12 jours et de 17,8 ans. Dans le groupe des infections urinaires, 13 (27%) patients avaient au moins un antécédent d'infection urinaire dont 5 (10,4%) étaient porteurs d'une anomalie du tractus urinaire. Dans le groupe des bactériuries non pathologiques, 8 (47%) patients avaient au moins un antécédent d'infection urinaire dont 2 (11,7%) étaient porteurs d'une anomalie du tractus urinaire. Les populations étaient comparables. Six (12,5%) patients ont présenté un tableau initial de sepsis dont le point de départ était une pyélonéphrite. Les caractéristiques des patients analysés sont présentées dans le tableau 2.

Dans le groupe des pyélonéphrites, deux enfants avaient de la fièvre depuis moins de 12 heures et une CRP normale. Il n'y a pas de différence entre les nombres de dosage de CRP, de procalcitonine et d'hémoculture réalisés dans les infections urinaires et les bactériuries non pathologiques. La valeur de la CRP était plus fréquemment élevée dans les infections urinaires (exclusivement dans les pyélonéphrites) de façon significative. Aucune des hémocultures réalisées n'a été positive. Le nombre de bandelettes urinaires réalisées

Tableau 2 : Caractéristiques des patients

	Total des souches	Infection urinaire		Bactériurie non pathologique		p ^b
		Total	Cystite / Pyélonéphrite	Total	Contamination / Bactériurie asymptomatique	
Nombre, n(%) ^a	65 (100)	48 (73,8)	16 (24,6) / 32 (49,2)	17 (26,2)	13 (20) / 4 (6,2)	NA
Sexe féminin, n(%) ^a	51 (78,4)	37 (56,9)	14 (21,5) / 23 (35,4)	14 (21,5)	10 (15,4) / 4 (6,2)	0,745
Age, années médiane (quartiles) (min-max)	4,6 (1,3-8,4) (0,03-17,9)	5,1 (1,7-9) (0,05-17,9)	7,0 (6,1-9,7) (2,3-16,2) / 3,3 (0,8-5,5) (0,05-17,9)	2,8 (0,7-6,6) (0,03-17,7)	1,7 (0,4-5,5) (0,03-17,7) / 2,1 (2,6-12,8) (1,9-15,2)	0,257
Antécédent d'infection urinaire, n(%) ^a	21 (32,3)	13 (20)	7 (10,8) / 6 (9,2)	8 (12,3)	6 (9,2) / 2 (3,1)	0,273
Anomalie du tractus urinaire, n(%) ^a	7 (10,8)	5 (7,7)	2 (3,1) / 3 (4,6)	2 (3,1)	1 (1,5) / 1 (1,5)	1

^a pourcentage calculé sur le nombre total de souches, n=65.

^b calculé sur les groupes « infection urinaire » et « bactériurie non pathologique » ; significatif si p<0,05.

était significativement plus élevé et elles étaient plus souvent pathologiques (avec une croix de leucocyturie, d'hématurie ou de nitrite) dans le groupe des infections urinaires. De même, l'examen direct de l'ECBU était plus fréquemment positif en cas d'infection urinaire. Les examens réalisés dans la population analysée sont détaillés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Examens réalisés et leur résultat

	Infection urinaire		Bactériurie non pathologique		p ^c
	Total, n=48	Cystite, n=16 / Pyélonéphrite, n=32	Total, n=17	Contamination, n=13 / Bactériurie asymptomatique, n=4	
CRP, n(%) ^a	37 (77,1)	5 (31,3) / 32 (100)	9 (52,9)	8 (61,5) / 1 (25)	0,072
dont ≥ 20 mg/l ^b	30 (82,8)	0 / 30 (93,8)	3 (33,3)	3 (37,5) / 0	0,009
Procalcitonine, n(%) ^a	4 (8,3)	1 (6,25) / 3 (9,38)	2 (11,8)	2 (15,4) / 0	0,648
dont ≥ 0,5 ng/ml ^b	2 (50)	0 / 2 (66,7)	1 (50)	1 (50) / 0	1
Hémoculture, n(%) ^a	24 (50)	1 (6,25) / 23 (71,9)	4 (23,5)	4 (30,8) / 0	0,087
dont positive ^b	0	0 / 0	0	0 / 0	1
Bandelette urinaire, n(%) ^a	46 (95,8)	16 (100) / 30 (93,8)	13 (76,5)	10 (76,9) / 3 (75)	0,036
dont leucocyturie ≥ + ^b	41 (89,1)	14 (87,5) / 27 (90)	7 (53,8)	5 (50) / 566,7	<0,001
dont nitrite ≥ + ^b	23 (50)	5 (31,3) / 17 (56,7)	1 (7,7)	0 / 1 (33,3)	0,003
dont hématurie ≥ + ^b	34 (73,9)	11 (68,8) / 23 (76,7)	3 (23,1)	3 (30) / 0	<0,001
Examen direct positif, n(%) ^b	40 (83,3)	12 (75) / 28 (87,5)	3 (17,6)	1 (7,7) / 2 (50)	0,041

^a pourcentage calculé sur le nombre total des patients de chaque groupe ou sous-groupe.

^b pourcentage calculé sur le nombre des patients pour lesquels l'examen a été réalisé.

^c calculé sur les groupes « infection urinaire » et « bactériurie non pathologique », significatif si p<0,05.

Les urines étaient majoritairement recueillies en milieu de jet. Le recueil par le biais d'une poche était statistiquement plus fréquent dans le groupe des bactériuries non pathologiques. Le sondage urétral a été réalisé pour 29,2% des diagnostics d'infection urinaire, majoritairement dans le cas des pyélonéphrites, et pour 11,8% des bactériuries non pathologiques, exclusivement dans le cas des contaminations. Aucune ponction sus-pubienne n'a été réalisée. Ces données sont présentées et détaillées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Mode de recueil des urines

	Infection urinaire		Bactériurie non pathologique		p ^b
	Total, n=48	Cystite, n=16 / Pyélonéphrite, n=32	Total, n=17	Contamination, n=13 / Bactériurie asymptomatique, n=4	
Milieu de jet, n(%) ^a	32 (66,6)	14 (87,4) / 18 (56,3)	9 (52,9)	7 (53,8) / 2 (50)	0,385
Poche, n(%) ^a	2 (4,2)	1 (6,3) / 1 (3,1)	6 (35,3)	4 (30,8) / 2 (50)	0,008
Sondage, n(%) ^a	14 (29,2)	1 (6,3) / 13 (40,6)	2 (11,8)	2 (15,4) / 0	0,201

^a pourcentage calculé sur le total de chaque groupe ou sous-groupe.

^b calculé sur les groupes « infection urinaire » et « bactériurie non pathologique », significatif si p<0,05.

Comme le montre le tableau 5, les populations des patients analysés et non analysés étaient comparables à l'exception du dosage de la CRP qui était plus fréquent chez les patients analysés.

Tableau 5 : Comparaison entre les patients analysés et non analysés

	Analysés, n=65	Non analysés, n=14	p
Sexe féminin, n(%)	51 (78,5)	12 (85,7)	0,723
Age, années, médiane (quartile) (min-max)	4,6 (1,3-8,4) (0,03-17,9)	2,1 (0,8-8,1) (0,2-12,2)	0,591
Antécédent d'infection urinaire, n(%)	21 (32,3)	2 (14,2)	0,887
Anomalie du tractus urinaire, n(%)	7 (10,8)	1 (7,1)	1
CRP, n(%) ^a	46 (70,8)	3 (21,4)	0,013
dont ≥ 20 mg/l ^b	33 (71,7)	0	0,030
Procalcitonine, n(%) ^a	6 (9,2)	0	0,584
dont ≥ 0,5 ng/ml ^b	3 (50)	0	NA
Hémoculture, n(%) ^a	28 (43,1)	3 (21,4)	0,509
dont positive ^b	0	0	NA
Bandelette urinaire, n(%) ^a	59 (90,8)	13 (92,8)	0,204
dont leucocyturie ≥ + ^b	48 (81,4)	9 (69,2)	0,720
dont nitrite ≥ + ^b	24 (40,7)	2 (15,4)	0,313
dont hématurie ≥ + ^b	37 (62,7)	9 (69,2)	0,184
Examen direct positif, n(%) ^b	43 (66,2)	10 (71,4)	0,159

^a pourcentage calculé sur le total des patients de chaque groupe ou sous-groupe.

^b pourcentage calculé sur les patients pour lesquels l'examen a été réalisé.

3.1. Détermination du protocole par l'étude de différents paramètres

3.1.1. Choix de la microplaque

Nous avons testé deux matériaux pour la formation de biofilm : PVC et polystyrène. Aucune différence significative de formation de biofilm entre les deux types de microplaque n'a été observée quelle que soit la souche testée (figure 4). Nous avons choisi d'utiliser les microplaques BD falcon pour la réalisation de l'étude.

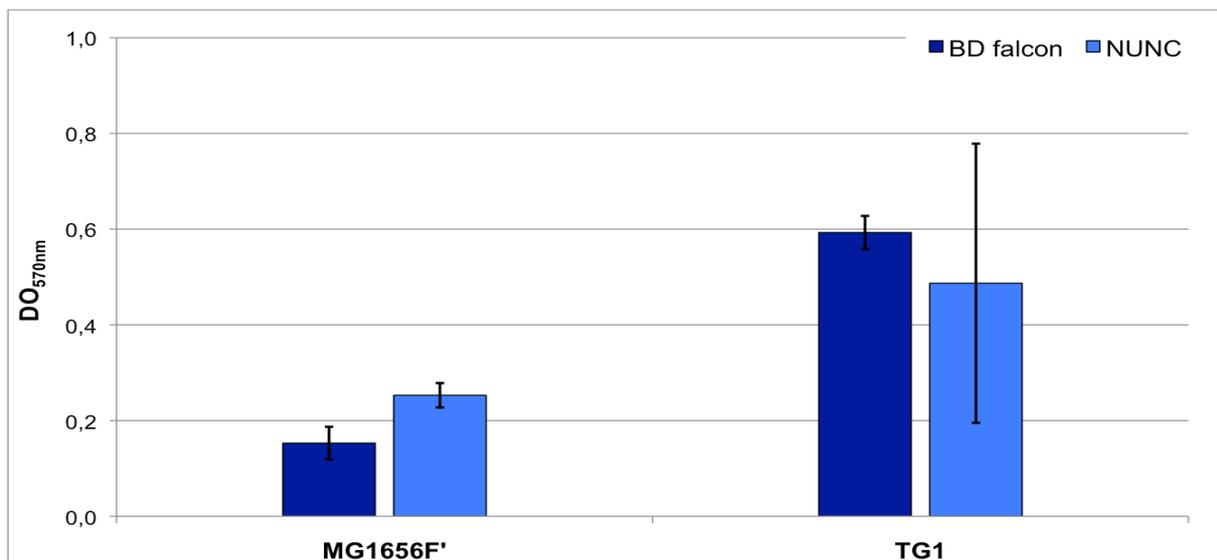


Figure 4 : Effet de la surface utilisée sur la formation de biofilm

3.1.2. Choix du milieu de culture

Six milieux de culture ont été testés, les résultats sont présentés figure 5. La comparaison des milieux deux à deux montre que le milieu M63B1-glu permet une production de biofilm statistiquement supérieure à tous les autres. Au vu de ces résultats, nous avons choisi d'utiliser le milieu M63B1-glu.

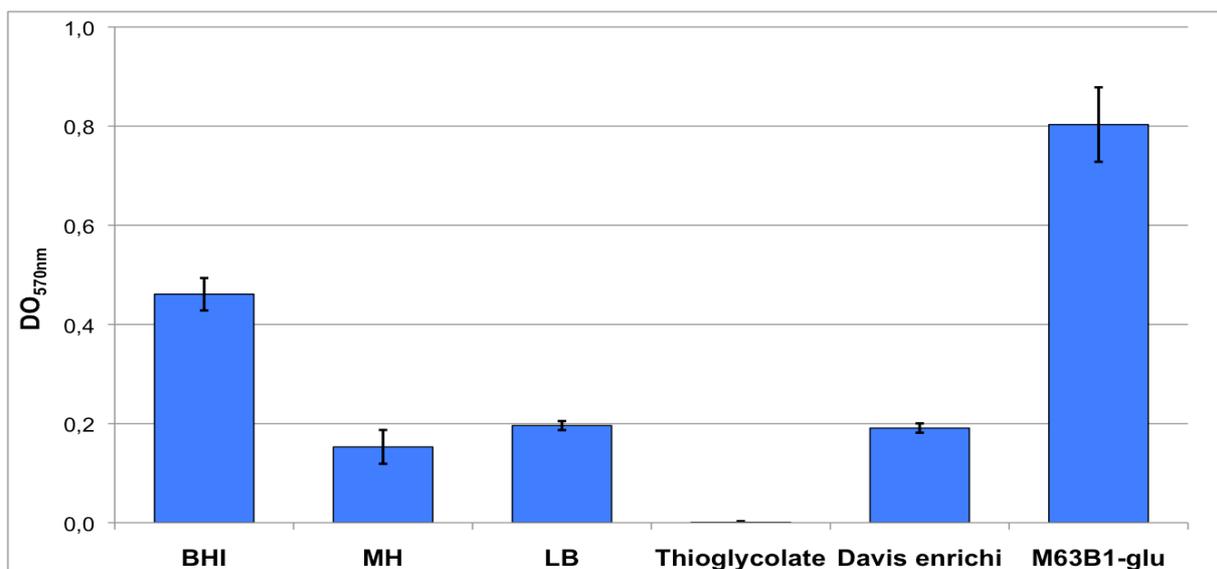


Figure 5 : Effet du milieu de culture sur la formation de biofilm

3.1.3. Choix du temps de culture en microplaque

La formation de biofilm a été comparée après 24, 48 et 72 heures de cultures, les résultats sont présentés figure 6. Il y a une grande variabilité mais pas de différence significative de formation de biofilm selon le temps de culture. Par commodité, nous avons donc choisi un temps de culture en microplaque de 48 heures.

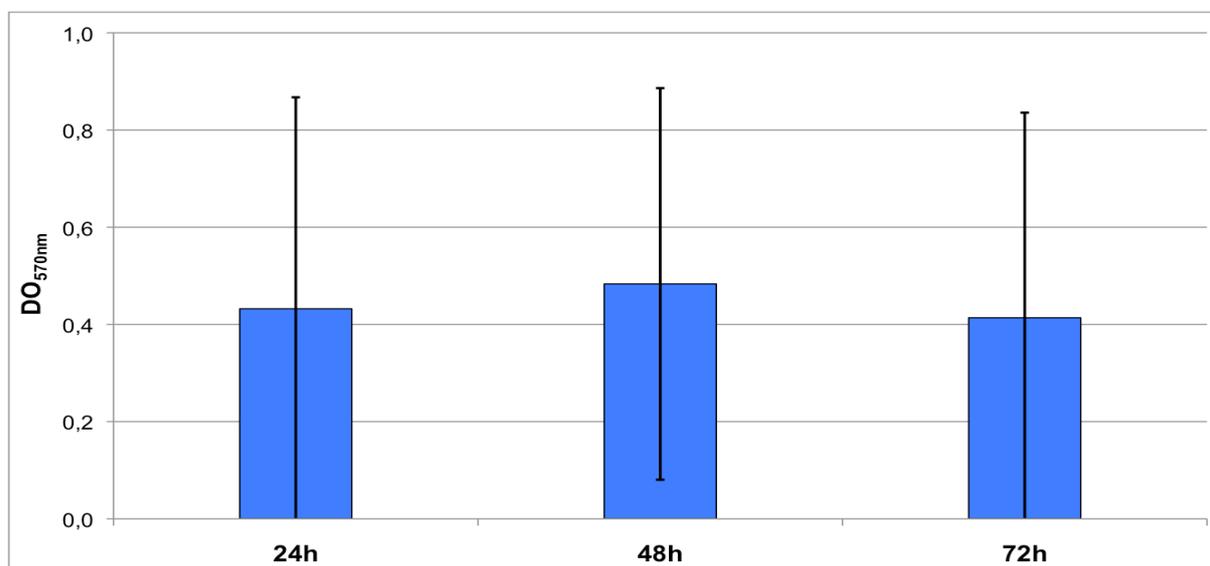


Figure 6 : Effet du temps de culture en microplaque sur la formation de biofilm

3.1.4. Choix de l'inoculum initial

Les résultats sont présentés figure 7. Il n'y a pas de différence significative de formation de biofilm selon le type d'inoculum : culture de la veille (over/night, o/n), culture o/n diluée au 100^{ième} (o/n 100^{ième}) et culture o/n diluée au 100^{ième} et remise à pousser à 37°C (o/d), comme décrit en section 2.3. Toutefois, l'inoculum o/n 100^{ième} semble avoir une légère tendance à former plus de biofilm. Nous avons donc choisi d'utiliser cet inoculum.

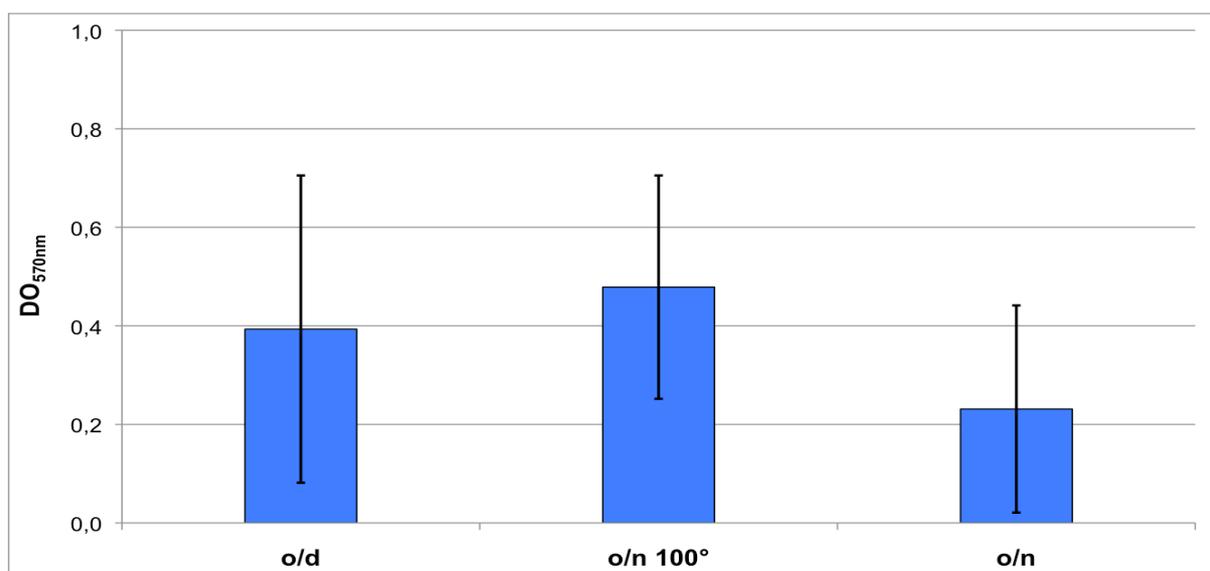


Figure 7 : Effet de l'inoculum sur la formation de biofilm

3.1.5. Choix de l'atmosphère

La formation du biofilm a été comparée lorsque les cultures ont été placées en aérobiose et en anaérobiose, les résultats sont présentés figure 8. Il n'y a pas de différence significative de formation de biofilm entre les conditions aérobie et anaérobie. Par souci de commodité, nous avons choisi d'utiliser des cultures en milieu aérobie.

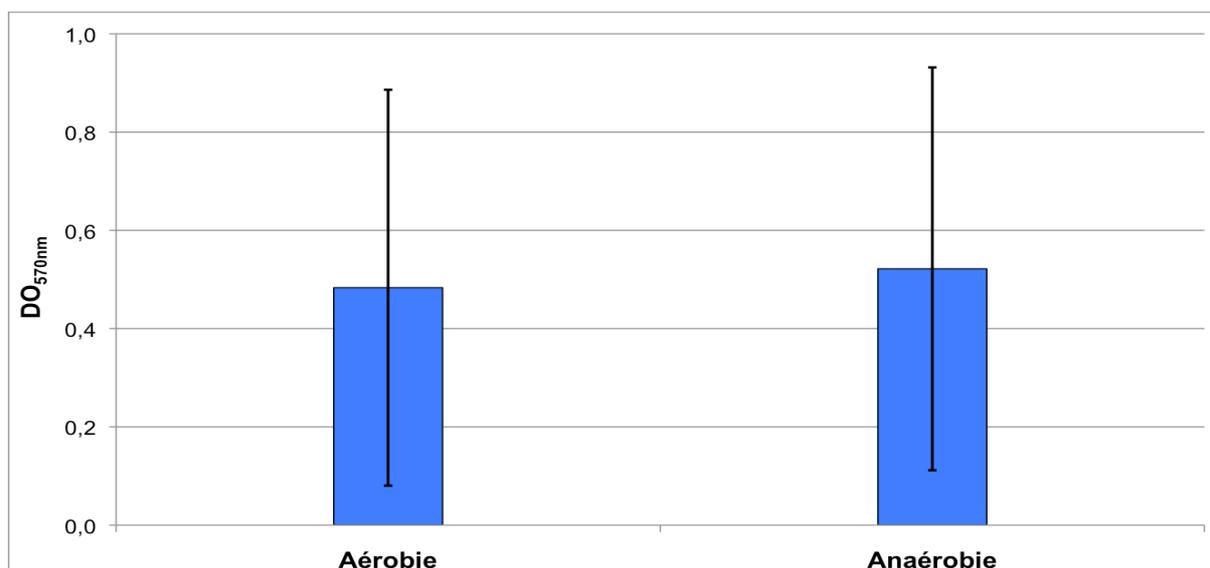


Figure 8 : Effet de l'atmosphère sur la formation de biofilm

3.1.6. Choix de la température

Les résultats sont présentés figure 9. Il n'y a pas de différence significative de formation de biofilm entre les cultures placées à 30°C ou à 37°C. Nous avons choisi d'incuber les cultures à 37°C, ce qui correspond à la température corporelle.

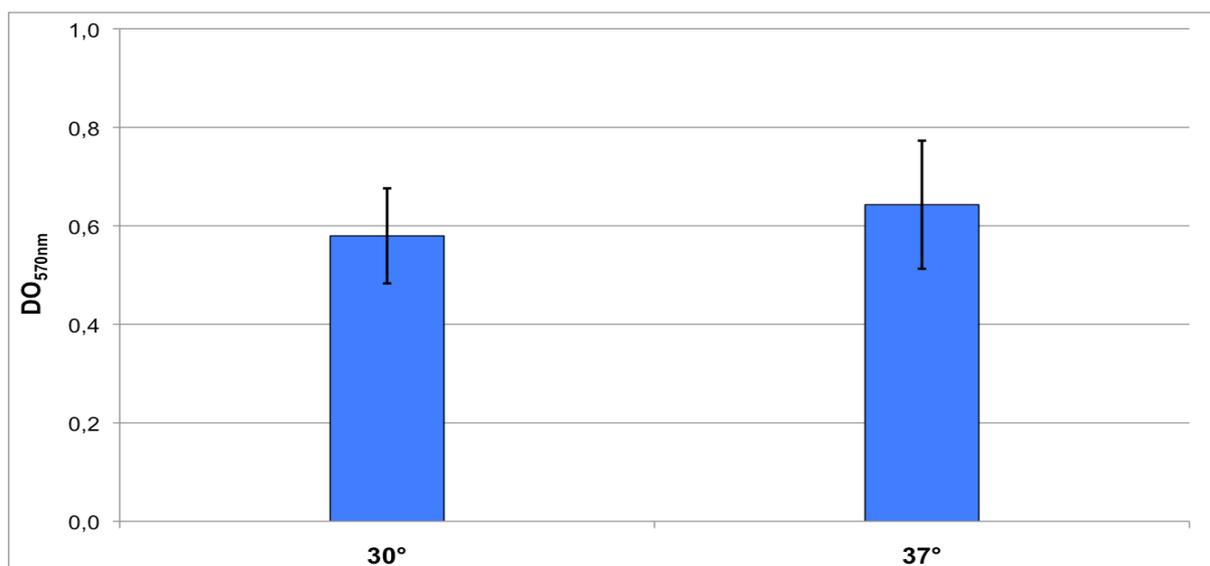


Figure 9 : Effet de la température sur la formation de biofilm

3.1.7. Protocole d'analyse

Grâce aux résultats précédents, le protocole suivant a été choisi pour réaliser notre étude : une colonie de chaque souche clinique de *E. coli* a été mise en culture par inoculation de 5 ml de milieu M63B1-glu (annexe), à 37°C sous agitation pendant environ 18 heures. Les cultures ont ensuite été diluées au 100^{ième} dans du milieu M63B1-glu et 125 µl de chaque dilution ont été répartis dans les puits de deux microplaques BD falcon. Un puits contenant 125 µl de milieu stérile servait de « zéro ». Les microplaques ont été placées à 37°C en aérobiose pendant 48 heures sans agitation, avant coloration au crystal violet et mesure de la DO_{570nm} (comme décrit en section 2.4).

Ce protocole a été répété trois fois de façon indépendante, permettant ainsi d'obtenir six valeurs de QBF pour une même souche. La formation du biofilm a alors été calculée en faisant la moyenne des six QBF pour chacune des souches.

3.2. Capacité des souches à former du biofilm

Parmi les 65 souches cliniques incluses, 64 (98,4%) étaient productrices de biofilm : 59 fortes productrices (90,8%), 3 (4,6%) productrices modérées et 2 (3,1%) faibles productrices. La seule souche ne produisant pas de biofilm était responsable d'une cystite. Il est à noter que les souches modérées et faibles productrices étaient toutes responsables de pyélonéphrites (figure 10).

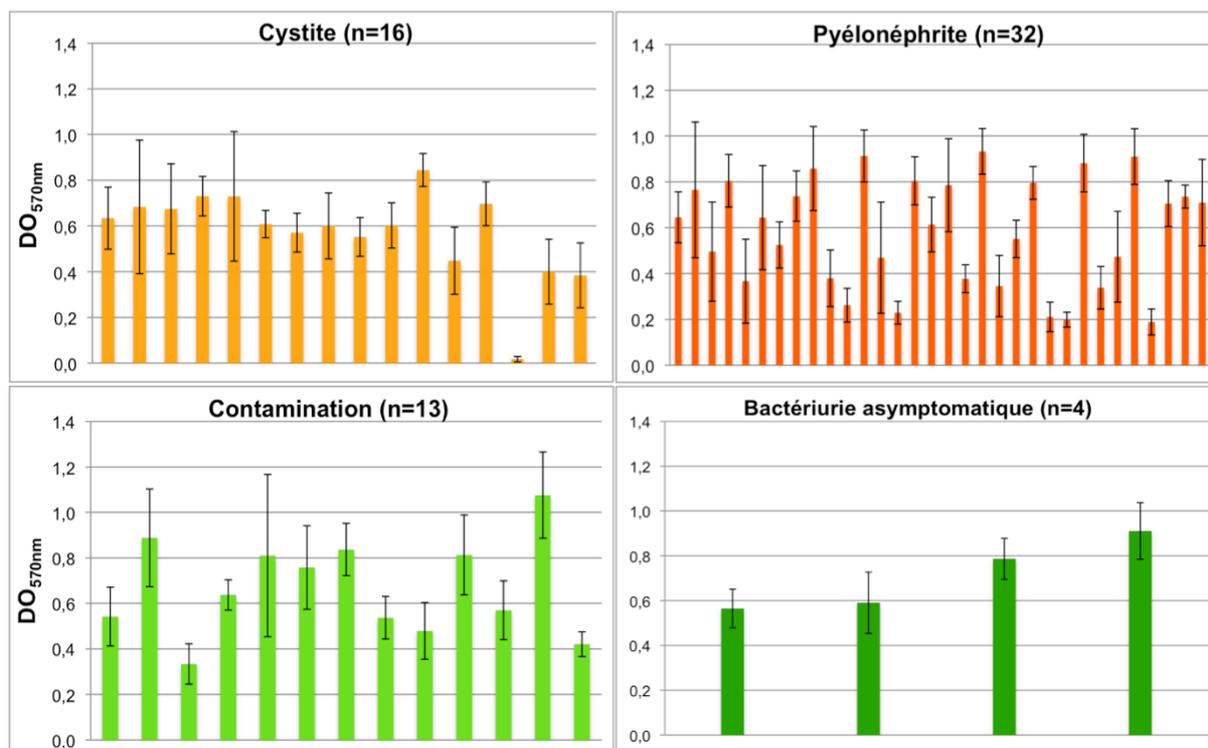


Figure 10 : Formation de biofilm par les 65 souches incluses

La souche ne produisant pas de biofilm a été exclue pour la suite des analyses.

3.3. Comparaison des infections urinaires et des bactériuries non pathologiques

La capacité des 47 souches isolées d'infections urinaires et des 17 souches isolées de bactériuries non pathologiques à former un biofilm a d'abord été comparée.

Les résultats sont présentés figure 11. Il n'existe pas de différence statistiquement significative de la formation de biofilm entre le groupe des infections urinaires et celui des bactériuries non pathologiques. Une grande variation dans la capacité des souches à former un biofilm est observée quel que soit le groupe considéré. Les valeurs extrêmes sont plus faibles dans le groupe des infections urinaires que celles des souches des bactériuries non pathologiques, avec des valeurs DO_{570nm} maximales et minimales de 0,93 - 0,19 et 1,08 - 0,33, respectivement.

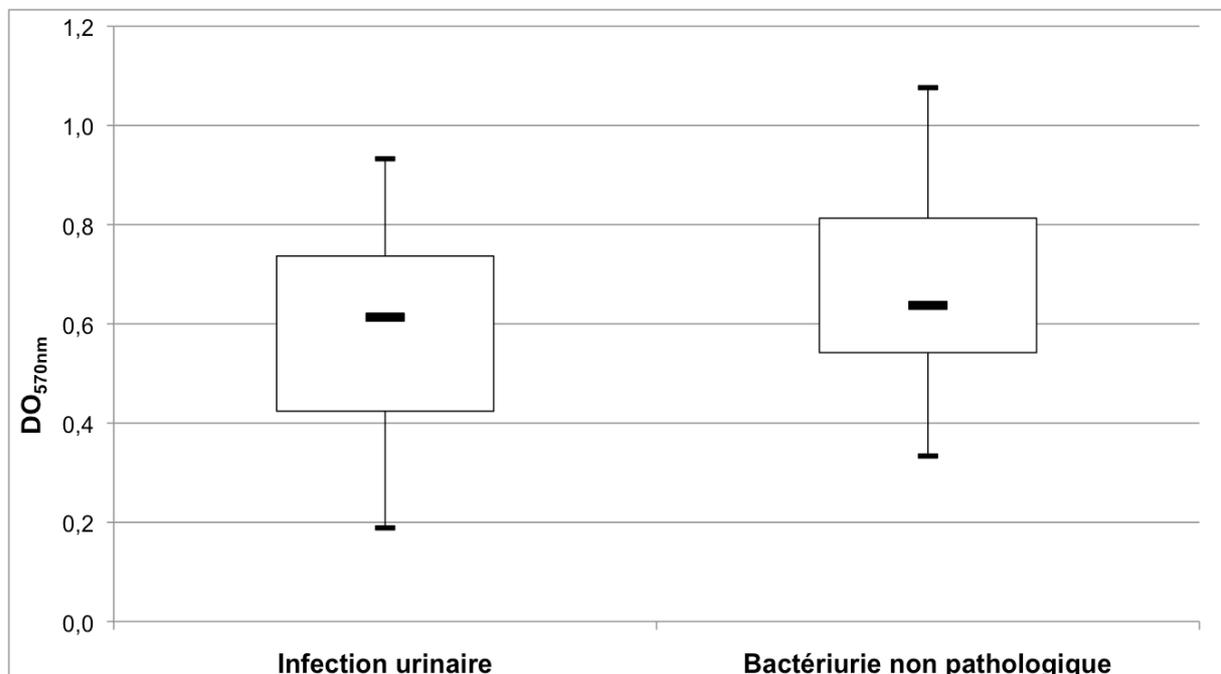


Figure 11 : Formation de biofilm par les souches isolées d'infections urinaires (n=47) ou de bactériuries non pathologiques (n=17)

3.4. Comparaison des sous-groupes

La capacité à former un biofilm par des souches isolées de cystites, pyélonéphrites, contaminations ou bactériuries asymptomatiques (15, 32, 13 et 4 souches respectivement) a été comparée. Les résultats sont présentés figure 12.

La distribution globale varie selon le sous-groupe considéré, avec des écarts importants entre les extrêmes pour les pyélonéphrites et les contaminations, et un écart plus faible pour les bactériuries asymptomatiques. Néanmoins, la médiane, quant à elle, ne varie que très peu : entre 0,61 pour les souches isolées de cystites et 0,69 pour les souches

isolées de bactériuries asymptomatiques. Il n'y a pas de différence statistiquement significative dans la formation de biofilm entre les différents sous-groupes analysés ici.

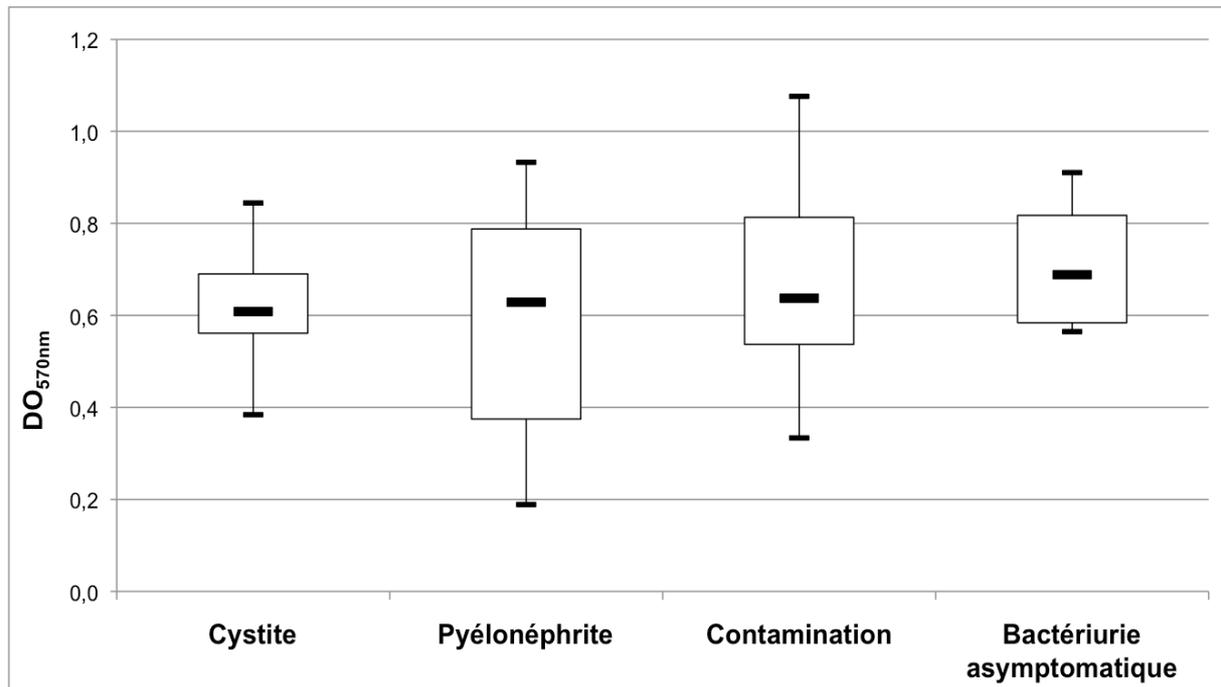


Figure 12 : Formation de biofilm par les souches isolées de cystites (n=15), de pyélonéphrites (n=32), de contaminations (n=13) ou de bactériuries asymptomatiques (n=4)

3.5. Effet d'un antécédent d'infection urinaire

Parmi les souches analysées, un certain nombre provenait d'urines d'enfants ayant au moins un antécédent d'infection urinaire : sept souches dans le groupe des cystites, six dans celui des pyélonéphrites et des contaminations respectivement et deux dans celui des bactériuries asymptomatiques. Nous avons donc comparé la capacité des souches à former du biofilm selon l'existence ou non d'un antécédent d'infection urinaire.

Ces résultats sont présentés figures 13 et 14. Il n'y a pas de différence significative de formation de biofilm selon l'existence ou non d'un antécédent d'infection urinaire, quelque soit le tableau clinique. Seul le groupe des bactériuries asymptomatiques semblerait être influencé par ce critère, mais le nombre de souches comparées (deux avec et deux sans antécédent) est trop faible pour que les résultats soient statistiquement significatifs. Lorsque les comparaisons sont réalisées dans la population ayant un antécédent d'infection urinaire, la production de biofilm n'est pas significativement différente entre les différents groupes et sous-groupes.

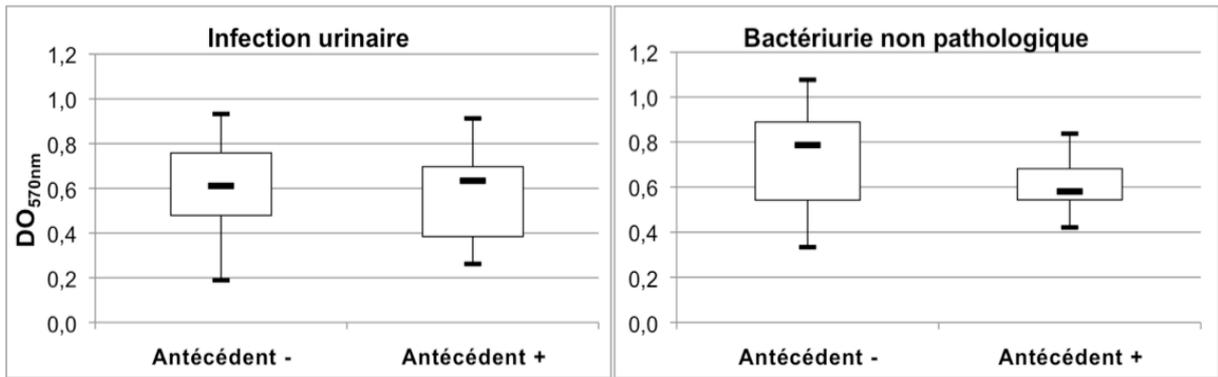


Figure 13 : Formation de biofilm selon l'absence ou l'existence d'un antécédent d'infection urinaire par les souches isolées d'infections urinaires (n=34 et n=13) ou de bactériuries non pathologiques (n=9 et n=8)

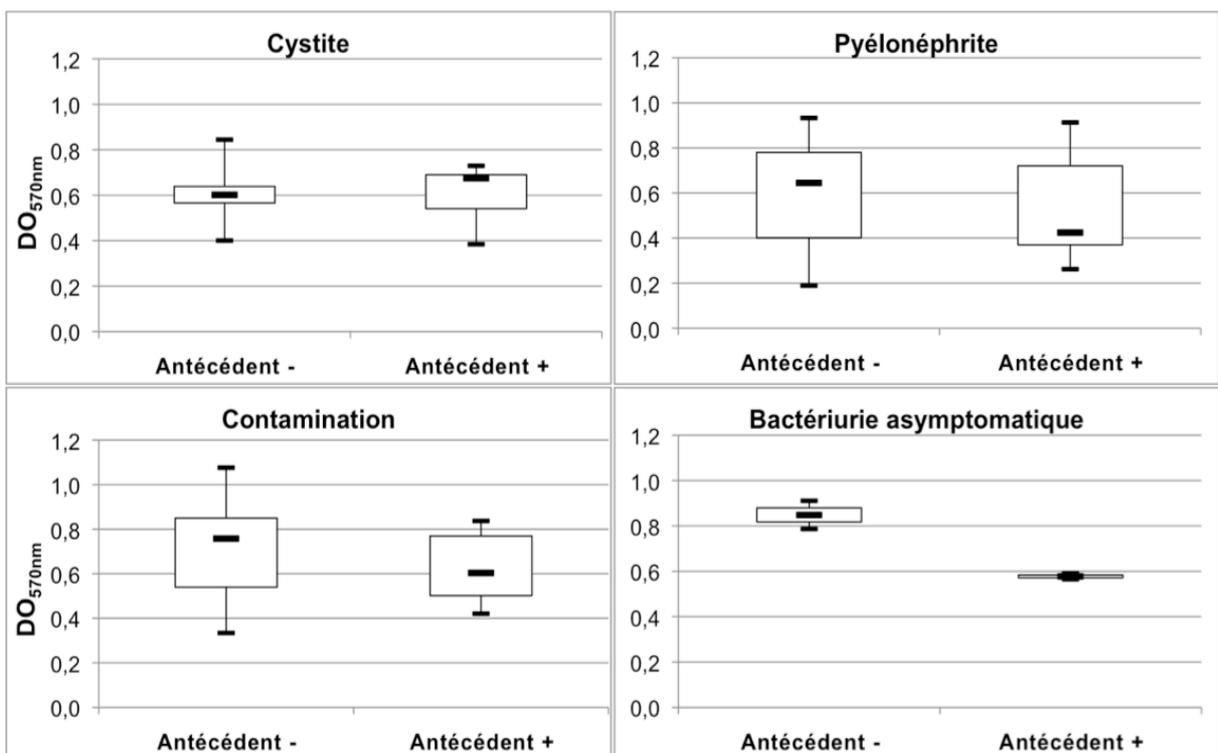


Figure 14 : Formation de biofilm selon l'absence ou l'existence d'un antécédent d'infection urinaire par les souches isolées de cystites (n=8 et n=7), de pyélonéphrites (n=26 et n=6), de contaminations (n=7 et n=6) ou de bactériuries asymptomatiques (n=2 et n=2)

4. Discussion

L'objectif de notre travail était de comparer la capacité à former du biofilm de deux populations de souches d'origine pédiatrique, responsables d'infections urinaires (cystites, pyélonéphrites) ou de bactériuries non pathologiques (contaminations d'échantillon et bactériuries asymptomatiques), afin de déterminer si ce critère pouvait différencier ces deux populations sans ambiguïté. Peu d'études ont comparé les bactériuries asymptomatiques aux infections urinaires et aucune en pédiatrie [37,41,44]. En effet, la majorité des travaux tente de différencier les cystites des pyélonéphrites et parfois des prostatites. A notre connaissance, nous sommes les premiers à avoir analysé des souches issues de contaminations d'échantillon associées aux bactériuries asymptomatiques en pédiatrie, dans le but de distinguer les infections urinaires des bactériuries non pathologiques, ne nécessitant aucune thérapeutique. Les études en pédiatrie sont peu nombreuses [11–13], alors que cette distinction bactériologique est primordiale dans cette population : les signes fonctionnels urinaires sont parfois difficiles à reconnaître à l'interrogatoire, du fait du jeune âge de l'enfant, de sa difficulté à exprimer ses symptômes, ou encore du fait de l'interprétation de ces mêmes symptômes par les parents ou le personnel médical. De plus, l'examen clinique n'est pas toujours contributif, les symptômes manquant de spécificité, pouvant se limiter à une douleur abdominale en cas de cystite ou à une fièvre isolée en cas de pyélonéphrite par exemple. Les infections urinaires de l'adulte et de l'enfant sont différentes sur plusieurs points, tels que l'écologie, les facteurs favorisants ou les modalités évolutives. Ces éléments rendent difficile l'extrapolation des résultats d'études menées sur une population d'adultes à une population d'enfants.

Plusieurs auteurs ont montré l'influence de divers paramètres sur la formation du biofilm des souches de *E. coli*, parmi lesquels, la forte influence du milieu de culture [47–49]. Ceci pourrait expliquer les méthodologies différentes entre chaque étude [11,12,39–45], produisant des résultats difficilement comparables, voire parfois contradictoires. Cependant, à notre connaissance, aucune étude ne s'est attachée à étudier l'influence de chaque paramètre susceptible de modifier la formation du biofilm. De ce fait, nous avons mené des analyses préliminaires afin de déterminer les conditions expérimentales de culture pour notre étude (sections 2.3 et 3.2). Six paramètres ont été étudiés en utilisant la coloration au crystal violet, seul élément défini comme gold standard pour quantifier le biofilm [54].

Dans la littérature, la quantité de biofilm est estimée, au mieux et majoritairement, en faisant la moyenne de trois valeurs de QBF seulement. Afin de diminuer l'influence des variations liées aux manipulations lors des différentes étapes du protocole, nous avons décidé de réaliser chaque culture en duplicate lors de trois expériences indépendantes.

Dans notre étude, la grande majorité des souches de *E. coli* isolées (98,5%) avait la capacité de produire du biofilm. Cette proportion est supérieure à ce que l'on retrouve dans la littérature puisque la plupart des études ont identifié environ 50% de souches capables de former du biofilm [40,45,46], avec des extrêmes allant de 24% [41] à 83,3% [37]. La différence observée pourrait venir du fait que les études citées concernaient des populations d'adultes alors que nous avons travaillé sur une population d'enfants. Cependant, Robino *et al.* [13], dans sa population pédiatrique, ont identifié 46% de souches productrices de biofilm. Une autre explication à cette différence pourrait être l'utilisation de méthodologies différentes, notamment le milieu de culture utilisé par les auteurs.

Nos résultats ne mettent en évidence aucune différence statistiquement significative dans la formation du biofilm quel que soit le groupe (infection urinaire, bactériurie non pathologique) ou le sous-groupe (cystite, pyélonéphrite, contamination d'échantillon, bactériurie asymptomatique) considéré. Ces résultats sont en contradiction avec l'étude menée par Hancock *et al.* [44] qui ont observé une formation de biofilm significativement plus importante, environ dix fois supérieure, au cours des bactériuries asymptomatiques en comparaison aux infections urinaires. Toutefois, il est à noter que cette étude a utilisé l'urine stérile comme milieu de culture et n'a concerné que 13 UPEC isolés d'urines d'adultes. Par contre, nos résultats sont en accord avec les études de Marhova *et al.* [41] et de Soto *et al.* [40] concernant les cystites et les pyélonéphrites. Néanmoins, Kanamaru *et al.* [39] ont trouvé une formation de biofilm plus importante dans les cystites que dans les pyélonéphrites, alors que Garofalo *et al.* [37], Salo *et al.* [11] et Tapiainen *et al.* [12] (ces deux dernières étant réalisées en pédiatrie) ont observé le contraire.

En accord avec les résultats d'Ejrnæs *et al.* [43], qui n'ont mis en évidence aucune différence entre les souches impliquées dans la persistance, la rechute, la réinfection ou la guérison d'une infection urinaire, nos résultats ne montrent aucune influence de l'existence d'un antécédent d'infection urinaire sur la capacité à former du biofilm dans les différents groupes ou sous-groupes étudiés. Néanmoins, au vu des figures 13 et 14, certaines tendances peuvent être définies. Contrairement aux souches d'infections urinaires qui semblent ne pas modifier leur production de biofilm selon le facteur « antécédent d'infection urinaire », celles responsables de bactériuries non pathologiques tendraient à former moins de biofilm en cas d'antécédent d'infection urinaire (médiane : 0,58 vs 0,78 avec et sans antécédent respectivement). Cependant, ce groupe contient trop peu de souches pour que ce résultat soit significatif. A l'inverse, pour les cystites, la capacité à former du biofilm des souches tend à être plus importante en présence d'un antécédent d'infection urinaire (0,67 versus 0,60) en accord avec Garofalo *et al.* [37]. Les souches impliquées dans des pyélonéphrites, issues du groupe de patients ayant déjà présenté un épisode d'infection

urinaire, ont une valeur de médiane diminuée par rapport à celle sans antécédent (figure 14). Ces résultats suggèrent que les souches de pyélonéphrites de patients présentant une récurrence d'infection urinaire formeraient moins de biofilm que les souches issues d'infection unique. Ces observations sont en désaccord avec l'étude de Tapiainen *et al.* [12] qui ont précisé que la DO la plus élevée est celle des pyélonéphrites récurrentes alors que la plus basse est mesurée en cas de cystite récurrente. Dans notre étude, les valeurs de DO_{570nm} sont très variables au sein de chaque groupe et sous-groupe, avec des extrêmes très éloignés. Cette grande variabilité de DO pourrait venir de l'influence du protocole d'étude et non d'une erreur de répartition des souches, puisque les groupes ont été définis avec précision, selon les critères des sociétés savantes. Comme nous l'avons déjà évoqué, la production de biofilm de chaque souche varie selon les paramètres d'analyse. Les analyses préliminaires que nous avons réalisées ne portent que sur une partie de nos souches. Il serait alors intéressant de reproduire ce travail sur toutes les souches incluses en faisant varier les différents paramètres, afin de définir leur influence sur nos résultats.

En résumé bien que des tendances semblent se dessiner, nos résultats ne mettent en évidence aucune différence statistiquement significative dans la formation du biofilm quel que soit le groupe considéré. La capacité d'une souche de *E. coli* isolée d'urine pédiatrique à former du biofilm ne permet donc pas de faire la distinction entre les infections urinaires et les bactériuries non pathologiques.

Notre étude comporte plusieurs limites. Premièrement, le nombre de souches recueillies est faible comparativement à certaines études de la littérature [12,39,40,43]. Leur répartition au sein de chaque groupe ou sous-groupe est déséquilibrée, avec une grande majorité d'infection urinaire (73,8% des souches incluses). Nous avons pu inclure seulement quatre souches responsables de bactériuries asymptomatiques (6,2%), ce qui se rapproche de leur prévalence dans la population générale. Il serait nécessaire d'obtenir plus de souches pour équilibrer les groupes comparés et augmenter la puissance de ce travail.

Deuxièmement, les inclusions ont été réalisées au hasard des échantillons arrivant au laboratoire. Ceci permet d'éviter un quelconque biais de sélection. Néanmoins, sur la période de l'étude, les données démographiques de la totalité des souches n'ont pu être recueillies. Il est alors difficile de vérifier la comparabilité entre la population incluse et celle des échantillons non inclus, ce qui nous empêche d'affirmer la représentativité de notre échantillon par rapport à la population générale. Nous avons tout de même pu vérifier, au sein de la population incluse, la bonne comparabilité entre les souches analysées et celles exclues (tableau 5).

Ensuite, notre population a été incluse sans distinction d'âge, avec des extrêmes allant de 12 jours de vie à 17 ans et 10 mois. Salo *et al.* [11], dans leur étude mêlant population adulte et pédiatrique, n'ont pas trouvé de différence dans la formation de biofilm quelque soit l'âge. Cependant, Vollmerhausen *et al.* [55] ont trouvé que la quantité de biofilm formé par *E. coli* au cours des infections urinaires est plus importante chez les adultes que chez les enfants. La physiopathologie de l'infection urinaire chez l'adolescent de 17 ans est très probablement plus proche de celle des adultes que de celle de l'enfant âgé de quelques jours. Il serait intéressant qu'une étude mesure le biofilm formé par *E. coli* dans différentes tranches d'âge.

Nous n'avons pu analyser spécifiquement les enfants ayant des anomalies du tractus urinaires car la population n'était pas suffisante (seulement deux patients dans le groupe des bactériuries asymptomatiques et cinq dans le groupe des infections urinaires). Une étude à plus grande échelle serait intéressante pour savoir s'il existe une différence de formation de biofilm en cas d'anomalie des voies urinaires. Ceci permettrait l'identification des cas nécessitant une antibiothérapie dans une population à haut risque d'infection urinaire, soumise à une pression microbiologique plus importante du fait d'une prescription plus fréquente d'antibiotiques.

Enfin, une autre limite de l'étude vient du nombre d'infections urinaires diagnostiquées par le biais d'une poche à urine. Ce mode de recueil est source d'erreur diagnostique [17–19] avec une surestimation du diagnostic. Nous avons tenté de limiter ce risque d'erreur en associant des critères cliniques aux résultats de l'ECBU et en adaptant le seuil de positivité de ce dernier en fonction du mode de recueil, en accord avec Shaikh *et al.* [50]. Néanmoins, il semble nécessaire de remarquer que la poche, malgré ses faibles performances et sa place dans les recommandations actuelles, est couramment utilisée en pratique quotidienne. Dans l'étude de Milcent *et al.* [56], ont été confrontés à cette limite, puisqu'ils ont la majorité de leur diagnostic d'infection urinaire réalisée après l'utilisation d'une poche comme mode de recueil. Les études de formation de biofilm en population pédiatrique ont, eux aussi, des diagnostics utilisant le recueil par poche à urine [11,12].

Conclusion

Cette étude est la première à s'intéresser à la distinction entre les infections urinaires et les bactériuries non pathologiques incluant les contaminations d'échantillon, en pédiatrie, par la mesure du biofilm formé. Nos résultats ne permettent pas de conclure à une distinction possible. Néanmoins, ce sujet n'a été que peu exploité jusqu'alors et de nombreuses perspectives d'études sont envisageables. De plus, les autres germes pourraient eux aussi faire l'objet d'analyse pour évaluer leur capacité à former du biofilm en cas d'infection urinaire.

Références bibliographiques

- [1] FREEDMAN A. « Urologic diseases in north america project: trends in resource utilization for urinary tract infections in children ». *J. Urol.* mars 2005. Vol. 173, p. 949-954.
- [2] FOXMAN B. « Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs ». *Am. J. Med.* juillet 2002. Vol. 113, n°1A, p. 5S-13S.
- [3] AVEROUS M. « Un fléau scolaire méconnu : l'infection urinaire et les troubles mictionnels de la fillette ». *Prog. En Urol.* septembre 2004. n°14, p. 1228-1230.
- [4] SHAIKH N., MORONE N., BOST J., FARRELL M. « Prevalence of urinary tract infection in childhood: a meta-analysis ». *Pediatr. Infect. Dis. J.* avril 2008. Vol. 27, n°4, p. 302-308.
- [5] AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. « Urinary tract infection: clinical practice guideline for the diagnosis and management of the initial UTI in febrile infants and children 2 to 24 months ». *Pediatrics.* septembre 2011. Vol. 128, n°3, p. 595-610.
- [6] LINSHAW M. « Asymptomatic bacteriuria and vesicoureteral reflux in children ». *Kidney Int.* juillet 1996. Vol. 50, p. 312-329.
- [7] ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. « Premier rapport de l'OMS sur la résistance aux antibiotiques : une menace grave d'ampleur mondiale ». In : *WHO* [En ligne]. 2014. Disponible sur : < www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/fr/ >
- [8] INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE. *EARS-Net France - Synthèse 2012* [En ligne]. Europe : InVS, 2013. Disponible sur : < <http://www.invs.sante.fr/fr..layout/set/print/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Resistance-aux-anti-infectieux/Contexte-enjeux-et-dispositif-de-surveillance/Reseaux-et-partenaires/EARS-Net-France-Synthese-2012> >
- [9] HABIB S. « Highlights for management of a child with a urinary tract infection ». *Int. J. Pediatr.* mai 2012. Vol. 2012, p. 1-6.
- [10] MULVEY M., SCHILLING J., HULTGREN S. « Establishment of a persistent Escherichia coli reservoir during the acute phase of a bladder infection ». *Infect. Immun.* juillet 2001. Vol. 69, n°7, p. 4572-4579.
- [11] SALO J., SEVANDER J., TAPIAINEN T., IKÄHEIMO I., POKKA T., KOSKELA M., *et al.* « Biofilm formation by Escherichia coli isolated from patients with urinary tract infections ». *Clin. Nephrol.* mai 2009. Vol. 71, n°5, p. 501-507.
- [12] TAPIAINEN T., HANNI A., SALO J., IKÄHEIMO I., UHARI M. « Escherichia coli biofilm formation and recurrences of urinary tract infections in children ». *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* juillet 2013. Vol. 33, p. 111-115.

- [13] ROBINO L., SCAVONE P., ARAUJO L., ALGORTA G., ZUNINO P., PIREZ M., VIGNOLI R. « Intracellular bacteria in the pathogenesis of Escherichia coli urinary tract infection in children ». *Clin. Infect. Dis.* décembre 2014. Vol. 59, n°11, p. e158-e164.
- [14] CONWAY P.H., CNAAN A., ZAOUTIS T., HENRY B.V., GRUNDMEIER R.W., KEREN R. « Recurrent urinary tract infections in children: risk factors and association with prophylactic antimicrobials ». *JAMA.* juillet 2007. Vol. 298, n°2, p. 179-186.
- [15] GROUPE DE PATHOLOGIE INFECTIEUSE PÉDIATRIQUE, SOCIÉTÉ DE PATHOLOGIE INFECTIEUSE DE LANGUE FRANÇAISE, SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE PÉDIATRIE. *Prise en charge des infections urinaires de l'enfant.* 2014.
- [16] SOCIÉTÉ CANADIENNE DE PÉDIATRIE. « Le diagnostic et la prise en charge des infections urinaires chez les nourrissons et les enfants ». *Paediatr. Child Health.* 2014. Vol. 19, n°6, p. 320-325.
- [17] ETOUBLEAU C., REVERET M., BROUET D., BADIER I., BROSSET P., FOURCADE L., *et al.* « Moving from bag to catheter for urine collection in non-toilet-trained children suspected of having urinary tract infection: a paired comparison of urine cultures ». *J. Pediatr.* juin 2009. Vol. 154, n°6, p. 803-806.
- [18] AL-ORIFI F., MCGILLIVRAY D., TANGE S., KRAMER M. « Urine culture from bag specimens in young children: are the risks too high? ». *J. Pediatr.* août 2000. Vol. 137, n°2, p. 221-226.
- [19] MCGILLIVRAY D., MOK E., MULROONEY E., KRAMER M. « A head-to-head comparison: "clean-void" bag versus catheter urinalysis in the diagnosis of urinary tract infection in young children ». *J. Pediatr.* octobre 2005. Vol. 147, p. 451-456.
- [20] OJHA A., ARYAL U. « Profile of children with urinary tract infection and the utility of urine dipstick as a diagnostic tool ». *J. Nepal Health Res. Counc.* septembre 2014. Vol. 12, n°28, p. 151-155.
- [21] SVANBORG C., GODALY G. « Bacterial virulence in urinary tract infection ». *Infect. Dis. Clin. North Am.* septembre 1997. Vol. 11, n°3, p. 513-529.
- [22] VAN HOUDT R., MICHIELS C. « Role of bacterial cell surface structures in Escherichia coli biofilm formation ». *Res. Microbiol.* juin 2005. Vol. 156, p. 626-633.
- [23] BRZUSZKIEWICZ E., BRUGGEMANN H., LIESEGANG H., EMMERTH M., OLSCHLAGER T., NAGY G., *et al.* « How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic Escherichia coli strains ». *Proc. Natl. Acad. Sci.* août 2006. Vol. 103, n°34, p. 12879-12884.

- [24] SOTO S., FRANCESC M., GUIRAL E., VILA J. « Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with urovirulence factors and antimicrobial resistance ». In : *Clin. Manag. Complicat. Urin. Tract Infect.* [s.l.] : Nikibakhsh A., 2011. p. 159-170.
- [25] RONALD A. « The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens ». *Dis. Mon.* février 2003. Vol. 49, p. 71-82.
- [26] COSTERTON J., STEWART P., GREENBERG E. « Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections ». *Science.* mai 1999. Vol. 284, p. 1318-1322.
- [27] HAS. *Principes généraux et conseils de prescription des antibiotiques en premier recours.* France : HAS, 2014.
- [28] INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE, AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ DU MÉDICAMENT ET DES PRODUITS DE SANTÉ. *Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France : nécessité d'une mobilisation déterminée et durable.* France : InVS, ANSM, 2014.
- [29] GUTMANN L. « Résistance aux antibiotiques ». In : *Inserm* [En ligne]. 2013. Disponible sur : < <http://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-et-microbiologie/dossiers-d-information/resistance-aux-antibiotiques> >
- [30] KAHLMETER G., ÅHMAN J., MATUSCHEK E. « Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* causing uncomplicated urinary tract infections: a european update for 2014 and comparison with 2000 and 2008 ». *Infect. Dis. Ther.* octobre 2015. Vol. 4, p. 417-423.
- [31] COSTERTON J., LEWANDOWSKI Z., CALDWELL D., KORBER D., LAPPIN-SCOTT H. « Microbial biofilms ». *Annu. Rev. Microbiol.* 1995. Vol. 49, p. 711-745.
- [32] JUSTICE S., HUNG C., THERIOT J., FLETCHER D., ANDERSON G., FOOTER M., *et al.* « Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis ». *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004. Vol. 101, n°5, p. 1333-1338.
- [33] KOSTAKIOTI M., HADJIFRANGISKOU M., HULTGREN S. « Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era ». *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* avril 2013. Vol. 3, p. a010306-a010306.
- [34] MONROE D. « Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms ». *PLoS Biol.* novembre 2007. Vol. 5, n°11, e307, p. 2458-2461.
- [35] STEWART P., COSTERTON J. « Antibiotic resistance of bacteria in biofilms ». *Lancet.* juillet 2001. Vol. 358, p. 135-138.
- [36] ELLIOTT T., REED L., SLACK R., BISHOP M. « Bacteriology and ultrastructure of the bladder in patients with urinary tract infections ». *J. Infect.* avril 1985. Vol. 11, p. 191-199.

- [37] GAROFALO C., HOOTON T., MARTIN S., STAMM W., PALERMO J., GORDON J., *et al.* « Escherichia coli from urine of female patients with urinary tract infections is competent for intracellular bacterial community formation ». *Infect. Immun.* janvier 2007. Vol. 75, n°1, p. 52-60.
- [38] ROSEN D., HOOTON T., STAMM W., HUMPHREY P., HULTGREN S. « Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection ». *PLoS Med.* décembre 2007. Vol. 4, n°12, e329, p. 1949-1958.
- [39] KANAMARU S., KURAZONO H., TERAJ A., MONDEN K., KUMON H., MIZUNOE Y., *et al.* « Increased biofilm formation in Escherichia coli isolated from acute prostatitis ». *Int. J. Antimicrob. Agents.* 1 août 2006. Vol. 28S, p. S21-S25.
- [40] SOTO S., SMITHSON A., MARTINEZ J., HORCAJADA J., MENSA J., VILA J. « Biofilm formation in uropathogenic Escherichia coli strains: relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance ». *J. Urol.* janvier 2007. Vol. 177, p. 365-368.
- [41] MARHOVA M., KOSTADINOVA S., STOITSOVA S. « Biofilm-forming capabilities of urinary Escherichia coli isolates ». *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* janvier 2010. Vol. 24, n°supplément 1, p. 589-593.
- [42] SOTO S., SMITHSON A., HORCAJADA J., MARTINEZ J., MENSA J., VILA J. « Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic Escherichia coli ». *Clin. Microbiol. Infect.* octobre 2006. Vol. 12, n°10, p. 1034-1036.
- [43] EJRNÆS K., STEGGER M., REISNER A., FERRY S., MONSEN T., HOLM S., *et al.* « Characteristics of Escherichia coli causing persistence or relapse of urinary tract infections: phylogenetic groups, virulence factors and biofilm formation ». *Virulence.* novembre 2011. Vol. 2, n°6, p. 528-537.
- [44] HANCOCK V., FERRIÈRES L., KLEMM P. « Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infectious Escherichia coli strains ». *FEMS Microbiol. Lett.* février 2007. Vol. 267, p. 30-37.
- [45] RIJAVEC M., MULLER-PREMRU M., ZAKOTNIK B., ZGUR-BERTOK D. « Virulence factors and biofilm production among Escherichia coli strains causing bacteraemia of urinary tract origin ». *J. Med. Microbiol.* novembre 2008. Vol. 57, p. 1329-1334.

- [46] MAHESWARI U., PALVAI S., ANURADHA P., KAMMILI N. « Hemagglutination and biofilm formation as virulence markers of uropathogenic *Escherichia coli* in acute urinary tract infections and urolithiasis ». *Indian J. Urol. IJU J. Urol. Soc. India*. octobre 2013. Vol. 29, n°4, p. 277-281.
- [47] NAVES P., DEL PRADO G., HUELVES L., GRACIA M., RUIZ V., BLANCO J., *et al.* « Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent ». *J. Appl. Microbiol.* janvier 2008. Vol. 105, n°2, p. 585-590.
- [48] ZALEWSKA-PIĄTEK B., WILKANOWICZ S., BRUŹDZIAK P., PIĄTEK R., KUR J. « Biochemical characteristic of biofilm of uropathogenic *Escherichia coli* Dr+ strains ». *Microbiol. Res.* juillet 2013. Vol. 168, p. 367-378.
- [49] HANCOCK V., WITSØ I. L., KLEMM P. « Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type ». *Int. J. Med. Microbiol.* novembre 2011. Vol. 301, n°7, p. 570-576.
- [50] SHAIKH N., BORRELL J., EVRON J., LEEFLANG M. « Procalcitonin, C-reactive protein, and erythrocyte sedimentation rate for the diagnosis of acute pyelonephritis in children ». *Cochrane Database Syst. Rev.* janvier 2015. Vol. 1, n°CD009185,.
- [51] SHAIKH N., MORONE N.E., LOPEZ J., CHIANESE J., SANGVAI S., D'AMICO F., *et al.* « Does this child have a urinary tract infection? ». *JAMA*. décembre 2007. Vol. 298, n°24, p. 2895-2904.
- [52] COHN E., SCHAEFFER A. « Urinary tract infections in adults ». *Sci. World J.* 2004. Vol. 4, n°S1, p. 76-88.
- [53] EMONET S., HARBARTH S., VAN DELDEN C. « Urinary tract infections in adults ». *Rev. Médicale Suisse*. avril 2011. Vol. 7, n°292, p. 912-916.
- [54] CREMET L., CORVEC S., BATARD E., AUGER M., LOPEZ I., PAGNIEZ F., *et al.* « Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of *Escherichia coli* ». *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* mars 2013. Vol. 75, n°3, p. 252-255.
- [55] VOLLMERHAUSEN T., KATOULI M. « Molecular characterisation of *Escherichia coli* isolated from hospitalised children and adults with urinary tract infection ». *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* décembre 2013. Vol. 33, p. 975-982.
- [56] MILCENT K., FAESCH S., GRAS-LE GUEN C., DUBOS F., POULALHON C., BADIÉ I., *et al.* « Use of procalcitonin assays to predict serious bacterial infection in young febrile infants ». *JAMA Pediatr.* janvier 2016. Vol. 170, n°1, p. 62-69.

Annexe : Préparation du milieu M63B1

Pour faire 500 ml de M63B1 (2X):

MgSO₄ 7H₂O 0,1 g

(NH₄)₂SO₄ 2 g

KH₂PO₄ 13,6 g

A préparer dans 400 ml d'eau distillée, puis ajuster le pH à 7,2 avec du KOH.

Rajouter 0,5 ml de FeSO₄ 7H₂O 1% dans la solution précédente.

Ramener le volume à 500 ml au total.

Stériliser le milieu obtenu à l'autoclave, 20 minutes à 120°C.

Avant utilisation, ajouter de la thiamine à concentration finale 0,001%, et du glucose à concentration finale 0,4%.

NB 1 : préparation du FeSO₄ 7H₂O 1% au préalable : 0,5 g dans 50 ml d'eau distillée. Stériliser par autoclave.

NB 2 : préparation de la thiamine 1% au préalable : 0,5 g dans 50 ml d'eau distillée. Stériliser par filtration (filtre 0,22µm) (thermolabile, autoclave impossible).

Tableau pour le calcul des quantités à utiliser :

	Pour faire 50 ml	Pour x ml	Concentration finale
Milieu 2X	25 ml	...	1X
Thiamine 1%	0,05 ml	...	0,001%
Glucose 20%	1 ml	...	0,4%
Eau osmose (qsp)	24 ml	...	

Table des figures

Figure 1 : Evolution de la résistance de <i>E. coli</i> aux C3G en France entre 2002 et 2012 (souches isolées d'hémocultures et de cultures de LCR), selon l'InVS	19
Figure 2 : Développement du biofilm bactérien	20
Figure 3 : Diagramme de flux	29
Figure 4 : Effet de la surface utilisée sur la formation de biofilm	32
Figure 5 : Effet du milieu de culture sur la formation de biofilm	32
Figure 6 : Effet du temps de culture en microplaque sur la formation de biofilm	33
Figure 7 : Effet de l'inoculum sur la formation de biofilm.....	33
Figure 8 : Effet de l'atmosphère sur la formation de biofilm	34
Figure 9 : Effet de la température sur la formation de biofilm	34
Figure 10 : Formation de biofilm par les 65 souches incluses	35
Figure 11 : Formation de biofilm par les souches isolées d'infections urinaires et souches de bactériuries non pathologiques	36
Figure 12 : Formation de biofilm par les souches isolées de cystites, de pyélonéphrites, de contaminations et de bactériuries asymptomatiques	37
Figure 13 : Formation de biofilm selon l'absence ou l'existence d'un antécédent d'infection urinaire par les souches isolées d'infections urinaires et de bactériuries non pathologiques	38
Figure 14 : Formation de biofilm selon l'absence ou l'existence d'un antécédent d'infection urinaire par les souches isolées de cystites, de pyélonéphrites, de contaminations et de bactériuries asymptomatiques.....	38

Table des tableaux

Tableau 1 : Facteurs de risque d'infection urinaire chez le jeune enfant, d'après les sociétés françaises et américaine	17
Tableau 2 : Caractéristiques des patients	30
Tableau 3 : Examens réalisés et leur résultat	30
Tableau 4 : Mode de recueil des urines	31
Tableau 5 : Comparaison entre les patients analysés et non analysés	31

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Ludivine FANTHOU

Does assaying biofilm formation by *Escherichia coli* strains allow to differentiate urinary tract infection from non-pathological bacteriuria in children?

Abstract :

Introduction – Urinary tract infections (UTI) are common among children. They have to be distinguished from non-pathological bacteriuria (NPB) that require no therapeutic. *Escherichia coli*, the prevailing strain in UTI, forms biofilm in the bladder. Does the study of biofilm formation by pediatric urinary *E. coli* strains allow to differentiate UTI from NPB ?

Methods – Prospective inclusion of urinary *E. coli* strains from children was performed in the Limoges University Health Center laboratory, during 2015. Cystitis and pyelonephritis defined the UTI. Urine contamination and asymptomatic bacteriuria (AB) defined the NPB. Biofilm formation was assessed by crystal violet staining of cultures in microtiterplates and optical density reading (OD_{570nm}).

Results – Forty-eight *E. coli* strains from UTI (16 cystitis and 42 pyelonephritis) and 17 from BNP (13 contaminations et 4 AB) were isolated. One strain did not form biofilm, the majority being strong producers. Comparison of OD_{570nm} obtained for UTI and NPB, or for the described subgroups, failed to demonstrate significant difference in biofilm formation. Similarly, previous UTI history had no significant effect on biofilm formation whatever the group or subgroup compared.

Conclusion – Our prospective study suggests that the ability of pediatric urinary *E. coli* strains to form biofilm might not be a good criterion for UTI and NPB differentiation. A larger study, as well as a standardized protocol tested on several strains populations, would be required to confirm these results.

Keywords: urinary tract infection, bacteriuria, biofilm, *Escherichia coli*, children.

Ludivine FANTHOU

L'étude du biofilm de souches de *Escherichia coli* permet-elle de différencier les infections urinaires des bactériuries non pathologiques en pédiatrie ?

Résumé :

Introduction – Les infections urinaires (IU) sont fréquentes chez l'enfant. Elles sont à distinguer des bactériuries non pathologiques (BNP) ne nécessitant aucune thérapeutique. *Escherichia coli*, principal germe des IU, forme du biofilm dans la vessie. L'étude du biofilm des *E. coli* urinaires pédiatriques permet-elle de différencier les IU des BNP ?

Méthode – L'inclusion prospective des souches urinaires pédiatriques de *E. coli* était réalisée au laboratoire du CHRU de Limoges, durant l'année 2015. Les cystites et les pyélonéphrites définissaient les IU. Les contaminations d'échantillon et les bactériuries asymptomatiques (BA) définissaient les BNP. La formation de biofilm était mesurée par coloration au crystal violet de cultures en microplaques et lecture de la densité optique à 570nm (DO_{570nm}).

Résultats – Quarante-huit souches de *E. coli* isolées d'IU (16 cystites et 42 pyélonéphrites) et 17 de BNP (13 contaminations et 4 BA) ont été incluses. Une seule souche ne produisait pas de biofilm et la majorité était de fortes productrices. La comparaison des DO_{570nm} obtenues pour les IU et BNP ou pour les sous-groupes considérés, n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative de formation de biofilm. De même, la production de biofilm ne différait pas de façon significative selon l'existence ou non d'un antécédent d'IU.

Discussion – Notre étude prospective indique que la capacité des souches urinaires pédiatriques de *E. coli* à former du biofilm ne serait pas un bon critère pour différencier les IU des BNP. Une étude de grande taille, ainsi qu'un protocole standardisé testé sur plusieurs populations de souches, serait nécessaire pour confirmer ce résultat.

Mots-clés : infection urinaire, bactériurie, biofilm, *Escherichia coli*, enfant.