

N° d'Ordre :

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire

De fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie (S.N.V.)

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Intitulé du thème :

ÉVALUATION DE L'ANTIBIORÉSISTANCE DES SOUCHES BACTÉRIENNES IMPLIQUÉES DANS L'INFECTION DU PIED DIABÉTIQUE

PRÉSENTÉ PAR : TRAORE KASSOUM ET DJEBBAR MOUSAAB

Mémoire soutenu devant l'honorable jury composé de :

President de jury: Mr MARROKI AHMED

(M.C.A/UDL/SBA)

Examinatrice : Mme KARA TERKI

(M.C.B/UDL/SBA)

Encadreur : Mme MARROKI BOUSMAHA


(M.A.B/UDL/SBA)

Année universitaire 2020 - 2021
Session : « Juin »

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

A decorative rectangular frame with a black border. The corners are adorned with intricate, symmetrical scrollwork in shades of brown and red, with a slight 3D effect. The word "REMERCIEMENTS" is centered within the frame.

REMERCIEMENTS



Remercions Allah le Tout puissant de nous avoir donné la santé et le courage de préparer ce présent projet.

Prière et Salut sur notre Prophète « Mohammed », sur sa famille ainsi que ses compagnons.

Nous remercions également nos parents pour leur soutien et réconfort.


*Nous exprimons nos sincères remerciements à notre encadreur **Mme MAROKI Bousmaha**, qui s'est engagée de diriger ce travail. Nous lui exprimons particulièrement toute notre reconnaissance et notre respect de nous avoir fait bénéficier de ses compétences scientifiques ainsi qu'expérimentales, ses qualités humaines et sa constante disponibilité.*

Nous adressons nos vifs remerciements aux membres du « jury » pour avoir accepté d'examiner, d'évaluer et de juger ce travail.

Pour terminer, nous adressons notre profonde gratitude à tous les professeurs qui nous ont partagé leurs connaissances durant notre parcours, ainsi que nos collègues pour leur contribution dans la réalisation de ce projet.



DEDICACES



Je dédie ce modeste travail à :
Mes chers parents qui m'ont assisté tout au long de mes études en m'encourageant, qui ont su être toujours présent à mes côtés et consenti beaucoup d'efforts pour subvenir à mes besoins, ils m'ont tout le temps assuré de leurs soutiens moral et financière.
A mon binôme Djebbar Moussab.

A TOUTE ma famille.

A mes amis et collègues.

Toute la promotion 2016-2021

TRAORE Kassoum.

Je dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents qui m'ont assisté tout au long de mes études en m'encourageant, qui ont su être toujours présent à mes côtés et consenti beaucoup d'efforts pour subvenir à mes besoins, ils m'ont tout le temps assuré de leurs soutiens moral et financière.

A mon binôme Kassoum TRAORE.

A TOUTE ma famille.

A mes amis et collègues.

Toute la promotion 2016-2021.

DJEBBAR MOUSAAB.



RESUME

Résumé

L'infection du pied diabétique entraîne une morbidité importante avec un risque d'amputation. La neuropathie et l'artériopathie sont les premiers facteurs intervenants du pied diabétique.

Notre travail a pour but d'évaluer la diversité de la microflore du pied diabétique afin d'établir le profil bactériologique et d'étudier la résistance des souches incriminées dans l'infection du pied diabétique.

Nous avons réalisé le travail sur un total de 13 souches responsables de l'infection du pied diabétique. L'identification des souches est effectuée à partir des critères morphologiques, physiologiques et biochimiques suivie de l'antibiogramme et de la cmi pour l'antibiothérapie.

L'examen direct après isolement et coloration de gram a révélé la présence de 07 bacilles gram positifs, 04 cocci gram positifs et 02 bacilles gram négatifs.

02 souches de bacille gram négatif : *Enterobacter cloacae* et *Serratia liquefaciens* sont identifiées par la galerie api 20e et 03 souches de cocci gram positif : *Aerococcus viridans 1*, *Enterococcus durans* et *Enterococcus faecalis* par la galerie API 20Strept.

Nos isolats *Enterobacter cloacae* et *Serratia liquefaciens* sont multirésistantes avec un taux de résistance de 100% à tous les antibiotiques testés : amoxicilline, pénicilline, acide fusidique, ceftiaxone et l'acide nalidixique.

Aerococcus viridans 1, *Enterococcus durans* et *Enterococcus faecalis* ont un taux de résistance de 100% aux antibiotiques : amoxicilline, pénicilline, acide fusidique et 33,33% de taux de résistance à la vancomycine, à l'acide nalidixique et à l'oxacilline.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) à l'ampicilline pour *Enterobacter cloacae* et à la vancomycine pour *Enterococcus faecalis* est de 5,12 mg/l. Par contre, pas de CMI pour la souche bacille gram positive (P4E1 S7) qui est très résistante à la vancomycine.

Nos résultats témoignent de la sensibilité des souches après l'obtention d'une concentration minimale inhibitrice avec 02 de bacille Gram négatif et cocci Gram positif bien qu'il ait eu une multi résistante à la majorité des antibiotiques testés à partir de l'antibiogramme : *Enterobacter cloacae* et *Entérocooccus faecalis*.

La multi résistance aux antibiotiques des bactéries est un facteur très important dans la prise en charge du pied diabétique.

Mots clés : infection du pied diabétique, identification des souches, Galerie classique, Galerie Api système, Antibiogramme, CMI.

Abstract

Infection of the diabetic foot causes significant morbidity with a risk of amputation. Neuropathy and arterial disease are the first intervening factors in diabetic foot.

Our work aims to assess the diversity of the microflora of the diabetic foot in order to establish the bacteriological profile and to study the resistance of the strains implicated in the infection of the diabetic foot.

We performed the work on a total of 13 strains responsible for diabetic foot infection. The identification of strains is carried out on the basis of morphological, physiological and biochemical criteria followed by the antibiogram and the cmi for antibiotic therapy.

Direct examination after isolation and gram staining revealed the presence of 07 gram positive bacilli, 04 gram positive cocci and 02 gram negative bacilli.

02 strains of gram negative bacillus: *Enterobacter cloacae* and *Serratia liquefaciens* are identified by the gallery api 20th and 03 strains of gram positive cocci: *Aerococcus viridans* 1, *Enterococcus durans* and *Enterococcus faecalis* by the API 20Strept gallery.

Our *Enterobacter cloacae* and *Serratia liquefaciens* isolates are multidrug resistant with a 100% resistance rate to all the antibiotics tested: amoxicillin, penicillin, fusidic acid, ceftiaxone and nalidixic acid.

Aerococcus viridans 1, *Enterococcus durans* and *Enterococcus faecalis* have 100% resistance to antibiotics: amoxicillin, penicillin, fusidic acid and 33.33% resistance to vancomycin, nalidixic acid and oxacycline.

The minimum inhibitory concentration (MIC) for ampicillin for *Enterobacter cloacae* and vancomycin for *Enterococcus faecalis* is 5.12 mg / l. On the other hand, no MIC for the gram positive bacillus strain (P4E1 S7) which is very resistant to vancomycin.

Our results testify to a therapeutic success after obtaining a minimum inhibitory concentration with 02 strains of gram negative bacillus and gram positive cocci although he had a multi resistant to the majority of the antibiotics tested from the antibiogram: *Enterobacter cloacae* and *Enterococcus faecalis*.

The multi-antibiotic resistance of bacteria is a very important factor in the management of diabetic foot. It is therefore essential to know the bacterial ecology of diabetic foot infections in health institutions to allow adequate management and optimal use of antibiotics, with the hope of reducing the risk of amputation and the emergence of multi-resistant bacteria

Keywords: diabetic foot infection, identification of strains, classic gallery, Api System gallery, antibiotic resistance

ملخص

يالسبب تعتبر عدوى القدم السكري من الأسباب المرضية التي تؤدي إلي خطر البتر. حيث ان الاعتلال العصبي والشریان الرئيسي لعدوى القدم السكرية

عملنا هو تقييم تنوع الكائنات الحية الدقيقة في أقدام السكري لمعرفة الأنواع البكتيريولوجية ودراسة مقاومة هذه السلالات للمضادات الحيوية.

لقد قمنا لدراسة على ما مجموعه 13 سلالة مسؤولة عن عدوى القدم السكري. يتم التعرف على السلالات عبر المعايير CMI المورفولوجي والفسيلولوجي والكيميائي الحيويو تليهاالعلاجات بالمضادات الحيوية وأيضاً عن طريق التنوع الخاصة

الفحص المباشر بعد أن كشف تلون الجدار البكتيري بطريق تلوين جرام عن وجود 07 من عصيات غرام إيجابية، 04 مكورات غرام إيجابي و 02 عصيات ذات جرام سلبي

-تم تحديد سلالتين من العصيات ذات لجرام السلبي هما :

Enterobacter cloaceae* و *Serratia Liquefaciens

عن طريق اختبار API 20 E

لاحظنا ان لدى هذه السلالات المعزولة و المتعرف عليها مقاومة بنسبة 100 % للمضادات الحيوية المختبرة:
الأموكسيسيلينو البنسلينو حمضالفوسيديكو السيفتياكسونو حمضالناليديكسيك

-وتم تحديد 03 سلالات من المكورات ذات جرام ايجابي هم :

Aerococcus viridans 1* و *Enterococcus durans* و *Enterococcus faecalis

عن طريق اختبار API 20STREP

CMI التركيز الادني المثبط للمضاد الحيوي من اجل

Enterobacter cloaceae* و *Serratia Liquefaciens

هو 5.12 مجم/ لتر

تشهد نتائجنا نجاحا علاجيا بعد الحصول على الحد الأدنى من التركيز المثبط مع 02 سلالات عصابات من الجرام السلبية إيجابية على الرغم من أنها كانت لديها مقاومة متعددة من غالبية المضادات الحيوية التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاحية : عدوى القدم السكرية ، تحديد السلالة ، المعرض الكلاسيكي ، معرض نظام

CMI، المضاد الحيوي ، Api



TABLE DES MATIERES

Table des matières



Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Table des matières

Introduction	1
I. Le pied diabétique	4
I.1. Le diabète	4
I.1.1 Définition	4
I.1.2 Classification du diabète	4
I.1.3. Complications du diabète	5
I.2.1. Infection du pied diabétique	6
I.2.1.1. Définition	7
I.2.2. Symptomatologie	7
I.2.3. Facteurs de risque	7
I.2.4. Physiopathologie	7
I.2.5. Différents aspects de l'infection du pied diabétique	8
II. Organe cutané et infection du pied diabétique	9
II.1. Structure de l'organe cutané	9
II.1.2. Composition et caractéristiques de la peau	9
II.2. La barrière cutanée	11
III.1. La flore cutanée	11
III.1.1. La flore cutanée résidente	11
III.1.2. La flore transitaire cutanée	12
III.2. La flore cutanée impliquée dans l'infection du pied diabétique	12
III.2.1. Staphylocoques	12

Table des matières

III.2.2. Streptocoques	13
III.2.3. Entérobactéries.....	13
III.2.4. Pseudomonas.....	13
III.2.5. Entérocoques	13
IV. Traitement du pied diabétique.....	14
IV.1. Antibiothérapie.....	14
IV.1.1. Choix de l'antibiothérapie probabiliste	14
IV.2. Soins locaux	16
IV.2.1. Les antiseptiques.....	16
IV.2.2. Les pansements	16
IV.2.3. Lutte contre l'œdème	17
IV.2.4. Prise en charge chirurgicale.....	17
IV.3. Mesures adjuvantes	18
IV.3.1. L'équilibre glycémique	18
IV.3.2. La décharge mécanique.....	18
V.4. Autres traitements.....	18
V.4.1. Oxygénothérapie	18
V.4.2. La phytothérapie	19
V.4.3. La phagothérapie.....	19
V.4.4. Méthodes préventives	19
IV. Antibiorésistance.....	20
IV.1. Antibiotiques.....	20
IV.1.2. Définition et Critères de classification	20
IV.2. Antibiorésistance chez les bactéries.....	22
IV.2.1. Définition	22
IV.2.2. Types de résistance	23
IV.2.3. Support génétique de la résistance.....	23

Table des matières

IV.2.4. Mécanismes de résistance	25
I. Origine des souches bactériennes	29
II. Enrichissement, isolement et purification des souches	29
III. Identification	29
III.1.Caractéristiques morphologiques des colonies bactériennes	29
III.2. Caractéristiques morphologiques et type de Gram des cellules bactériennes	29
III.3.Caractérisation physiologique et biochimique	30
III. 3.1 Identification par galerie biochimique classique	30
III.3.2.Identification par les galeries Api	32
IV.2. Méthode de l'antibiogramme	35
IV.2. Détermination de la Concentration minimale Inhibitrice (CMI)	36
I.2. Isolement et purification	40
II.2. Répartition selon le type de Gram	43
II.Identification physiologique et biochimique	45
III.2. Type respiratoire sur milieu viande-foie	48
IV.1.2 Mannitol-mobilité	49
III.4. Galerie classique	49
III.4.1. Fermentation des sucres (glucose , lactose ,saccharose) TSI	49
III.4.2. Citrate de Simmons	51
IV.1.5 Test Kligler Hajna.....	52
III. 5. Interprétation du résultat des tests physiologique et biochimique de la galerie classique	53
IV.2 Galerie api	58
IV.2.2 API 20Strept	59
IV.2.3 API 50CHL	60
V.Etude de l'antibiorésistance.....	62
V.1. Antibiogramme.....	62

Table des matières

V.3. Comportement des entérobactéries vis-à-vis des antibiotiques testés.....	63
V.4. Comportement des Enterococcus vis-à-vis des antibiotiques testés	64
V.2. CMI : Concentration Minimale Inhibitrice	65
V.2.1. CMI en microplaques.....	65
V.2.2. Isolement des souches sur gelose muller hinton à partir des microplaques.....	65
V.5. Comportement de bacille et cocci gram positifs vis-à-vis de la vancomycine à partir de la CMI	66
V.6. Comportement des entérobactéries vis-à-vis vis de l'ampicilline à partir de la CMI ..	67

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique
AF :acide fusidique
AMX :Amoxicilline
AMP: Ampicilline
API: Appareils et Procédés d'Identification
API : STREP Appareils et Procédés d'Identification streptocoque
ARN: Acide ribonucléique
ARNm:Acide ribonucléique messenger
ARNt :Acide ribonucléique de transfert
BHIB:Bouillon cœur-cervelle
BN : Bouillon nutritif
CHUT : chaussures thérapeutiques à usage temporaire
CMI:Concentration minimale inhibitrice
CO2:Dioxyde de carbone
CTX :céfotaxime
Gélose :MH Muller Hinton
Gélose MRS: de Man, Rogosa et Sharpe
GLU: Glucose
HAS : Haute Autorité de santé
H₂s: Sulfure d'hydrogène
IND: Indole
IPD: infection de pied diabétique
IWGDF : International Working Group on the Diabétique foot
LAC: lactose
LDC: Lysine Décarboxylases
Man:Manitol
MbI: Mobilité
MNT:maladies non-transmissibles
NA :Acide nalidixique
ODC: Lysine ornithine
OHB:L'oxygénothérapie hyperbare
OMS: Organisation mondiale de la santé
OX:Oxacilline
P:Pénicilline

PAL: β Naphtyi phosphate

R : Resitance

RM: Rouge de méthyle

S :Sensible

SAC: Saccharose

SARM:Staphylocoques aureus résistante à la métililline

SC :stratum corneum

CN:coagulas négative

SCN:staphylocoques à coagulas négative

Spp:sous-espèce

TDA : Lysine tryptophane

TSI:Triple Sugar Iron

Liste des figures

Figure 1 : : Destruction des cellules β des ilots de Langerhans : diabète de type (Docteurclic.com).....	5
Figure 2 : le diabète de type II (Docteurclic.com)	5
Figure 3 : : pied diabétique infecté (alamyimage.fr).....	6
Figure 4 : infection superficielle du pied diabétique (Podexpert.com).	8
Figure5 : infection profonde du pied diabétique (konsultasyon.net)	8
Figure 6 : coupe de la peau avec racine dermo épidermique (Kong, 2011).....	9
Figure 7 : couches de l'épiderme (Wix.com).....	10
Figure 8 : A : Caisson hyperbare ; B : cicatrisation d'ulcère après 15 séances d'OHB (ibo issa maman Nasser,2013).....	19
Figure 9 : Mode d'action des antibiotiques (madigan et <i>al.</i> ,2000)	21
Figure 10 : Schéma illustrant le développement de la résistance aux antibiotiques (George et <i>al.</i> 1998).	23
Figure 11 : Acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques(Mehdi.,2008).....	25
Figure 12 : résultats d'enrichissement sur BN et BHIB après 24h d'incubation	38
Figure 13 : résultats d'isolement des souches sur les milieux sélectifs	41
Figure 14 : aspects macroscopique et microscopique des Enterobacteriaceae	42
Figure 15 : aspects macroscopique et microscopique de Lactobacillus ssp.....	42
Figure 16 : Aspects macroscopique et microscopique de Bacillus spp.....	43
Figure 17 : aspects macroscopique et microscopique d'Enterococcus spp.....	43
Figure 18 : : répartition des souches originaires de plaies de diabétiques selon le type de Gram.....	44
Figure 19 : Résultat du test de catalase. A : lecture du test de catalase ; B : répartition des souches selon le test de catalase	47
Figure 20 : résultats de test type respiratoire.....	49
Figure 21 : résultats de dégradations A) Glucose, B) Saccharose et C) Lactose après 24h d'incubation.....	50
Figure 22 : Répartition des souches selon le test de la fermentation des sucres	51
Figure 23 : Résultats du test citrate de Simmons. A : lecture des résultats après 24h d'incubation ; B : Répartition des souches selon l'utilisation de citrate	52

Figure 24 : Résultats du test Kligler Hajna. A : lecture après 24 h ; B : Répartition des souches selon la dégradation des sucres	52
Figure 25 : résultat de la voie de fermentation du glucose. A : lecture du test RM ; B : lecture du test VP ; C : répartition de la production d'acétoïne par fermentation butylène glycolique.	53
Figure 26 : : caractères biochimiques de <i>Serratia liquefaciens</i> selon la galérie API 20 E.....	58
Figure 27 : caractères biochimiques d' <i>Enterobacter cloaceae</i> selon la galérie API 20 E	58
Figure 28 : caractères biochimiques d' <i>Enterococcus durans</i> selon la galérie API 20 Strept ...	59
Figure 29 : caractères biochimiques d' <i>Aerococcus viridans</i> 1 selon la galérie API 20 Strept.	60
Figure 30 Figure 30 : caractères biochimiques d' <i>Enterococcus faecalis</i> selon la galerie api 20Strept	60
Figure 31 : caractères biochimiques de <i>Lactobacillus</i> spp, sur la galerie api 50CHL	61
Figure 32 : comportement d' <i>E. durans</i> , d' <i>A. viridans</i> 1, d' <i>E. faecalis</i> , d' <i>E. cloaceae</i> et de <i>S. liquefaciens</i> sur Muller Hinton après 24h d'incubation.	63
Figure 33 : taux de résistance des isolats des entérobactéries : <i>E. cloaceae</i> , <i>S. liquefaciens</i> vis-à-vis des antibiotiques	63
Figure 34 : aux de résistance des isolats des entérocoques : <i>Aerococcus viridans</i> 1,	64
Figure 35 : résultats de la CMI en microplaques d' <i>E. cloaceae</i> , de <i>S. liquefaciens</i> , d' <i>A. viridans</i> et d' <i>E. durans</i> et d' <i>E. faecalis</i> après après 24h d'incubation	65
Figure 36 : résultats de la CMI après repiquage des souches sur milieu solide.	66

Liste des tableaux

Tableau 1: Grade et intérêt pronostic (David, 2013).	9
Tableau 2 : : résumé des propositions d'antibiothérapie de première intention selon le type d'IPD du consensus international sur le pied diabétique (Management of diabetic foot infections,2007).....	16
Tableau 3 : Antibiotiques testées (EUCAST,).	35
Tableau 4 : résultats d'isolement et de purification des isolats à partir des prélèvements du..	40
Tableau 5 : : aspects macroscopique et microscopique des isolats à partir des prélèvements du pied diabétique	41
Tableau 6 : résultats de test catalase à partir des isolats du pied diabétiques	46
Tableau 7 : interprétation des résultats de la galerie classique	55
Tableau 8 : interprétation des résultats de la galerie api 20e de Serratia liquefaciens.....	58
Tableau 9 : interprétation des résultats de la galerie api20e d'Enterobacter cloaceae.....	59
Tableau 10 : interprétation des résultats de la galerie api 20Strept d'Enterococcus durans	59
Tableau 11 : interprétation des résultats de la galerie api 20Strept d'Aerococcus viridansI...	60
Tableau 12 : interprétation des résultats de la galerie api 20Strep d'Enterococcus faecalis....	60
Tableau 13 : interprétation des résultats de galerie api 50CHL	61
Tableau 14 : interprétation des résultats de l'antibiogramme d'E.cloaceae et de S.liquefaciens	63
Tableau 15 : interprétation des résultats de la CMI pour les entérocoques, les enterobacteries et bacille Gram positive.....	66



INTRODUCTION



Introduction

Le diabète est un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. Il est considéré comme une des quatre maladies non-transmissibles (MNT) prioritaire identifiées par l'OMS reconnue comme épidémie mondiale (OMS,2013).

L'évolution de cette maladie est silencieuse et insidieuse jusqu'à l'apparition des complications lourdes (Mansour, 2012), comme les maladies cardiovasculaires, l'insuffisance rénale et les problèmes oculaires, mais les complications au niveau des pieds sont parmi les plus fréquentes et redoutées (Eszter et al.,2010).

Le pied diabétique est défini comme un pied qui présente des lésions allant des simples phlyctènes, petites plaies aux ulcérations qui peuvent s'infecter, et aussi des lésions détruisant les tissus profonds. Les cas les plus graves peuvent aboutir aux amputations. Toutes ces lésions sont associées à un désordre neurologique ainsi qu'à une maladie vasculaire du membre inférieur et/ou des complications métaboliques du diabète (Chand et al.,2012).Sa prise en charge doit être multidisciplinaire. L'infection d'une plaie de pied diabétique est responsable de 60% des amputations dans les pays développés (Peters et Lipsky, 2013).

L'infection du pied diabétique est définie par une invasion avec multiplication de micro-organismes, dans la majorité des cas, des bactéries, entraînant des dégâts tissulaires avec ou sans réponse inflammatoire de l'organisme secondaire, en règle, à une plaie cutanée. Le diagnostic est clinique et l'infection doit être distinguée de la colonisation bactérienne (Zhang et al.,2002).

Les bactéries aérobies à Gram positif, notamment le staphylocoque doré et les streptocoques bêta-hémolytiques du groupe A sont les bactéries les plus souvent en cause dans les infections des plaies. Les staphylocoques méthicilline-résistants, les *Pseudomonas aeruginosa* et les entérobactéries résistantes sont souvent isolés dans les infections profondes chroniques ou déjà traitées. Les bactéries anaérobies sont souvent associées ou bactéries aérobies (Lipsky et al., 2012) Lutter contre les bactéries moins virulentes (comme les staphylocoques à coagulase négative ou les corynébactéries) peut ne pas être nécessaire. Cependant, ces espèces peuvent être de véritables pathogènes, en particulier s'ils sont cultivés à partir de prélèvements fiables ou s'ils sont retrouvés à plusieurs reprises (IWGDF,2011).

Dans tous les cas, l'infection du pied diabétique est un motif fréquent de prescription d'antibiotiques. Ceci incite à une documentation microbiologique rigoureuse pour identifier les germes en cause et à avoir une parfaite maîtrise des règles de prescription des antibiotiques.

Introduction



Les antibiotiques locaux n'ont aucun intérêt car pourvoyeurs de sélection de bactéries résistantes avec risque d'effets indésirables locaux (**Lipsky *et al.*, 2012 ; Bernard *et al.*, 2007**). Les antibiotiques par voie générale sont donc à choisir bien évidemment en cas

Introduction



d'infection avérée. Il n'y a aucune preuve publiée que l'antibiothérapie accélère la cicatrisation ou prévienne une infection d'une plaie non infectée initialement (**IWGDF**, 2011).

Le risque de sélectionner ou de se trouver confronté à des bactéries multi résistantes (BMR) est élevé dans le cadre de la prise en charge du pied diabétique infecté (**Diamantopoulos et al.**, 1998). En effet l'usage excessif et répété des antibiotiques aboutie à la sélection de bactéries résistantes, ayant développées plusieurs stratégies pour échapper à l'action des antibiotiques. La résistance aux antibiotiques est également un problème majeur de santé publique ayant un coût de charge économique.

Face à ces deux problèmes majeurs de santé publique, nous nous sommes proposés à contribuer à l'évaluation de la résistance de souches bactériennes incriminées dans l'infection du pied diabétique en Algérie. Les souches ont été préalablement isolées lors d'une étude ciblant cette infection (2019). Nous avons entrepris une partie expérimentale qui se divise principalement en deux volets :

Une identification des souches originaires d'infections du pied diabétique par différentes méthodes phénotypiques ;

Evaluation de leur résistance vis-à-vis de divers antibiotiques, dont ceux qui sont utilisés dans le milieu hospitalier.

I. Le pied diabétique

I.1. Le diabète

I.1.1 Définition

Le diabète est une maladie métabolique grave menaçant d'une manière croissante, la santé publique dans le monde, très répandue en ce début de XXI^{ème} siècle. Le diabète est caractérisé par un désordre au niveau de la régulation du métabolisme lipidique, glucidique et protéique (Hennen, 2001; Kebieche, 2009) et aussi par l'élimination excessive d'une substance dans les urines. On distingue 3 type de diabètes : diabète insipide qui se traduit par une émission d'urine très importante, le diabète rénal qui s'explique par une élimination de glucose dans les urines alors que la glycémie est correctement régulée, et enfin le diabète sucré désigne un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie chronique résultante d'un défaut de la sécrétion de l'insuline et/ou de l'action de cette hormone (Marsaudon, 2004; Popelier, 2006).

I.1.2 Classification du diabète

Le diabète sucré est une situation d'hyperglycémie d'étiologies très hétérogènes résultant des conclusions d'un comité d'experts réunis en 1997, une classification a ainsi été établie (Hennen, 2001). Cette classification repose sur l'étiopathogénie, d'où on distingue principalement le diabète de type 1, le diabète de type 2 et autres types « spécifiques » ou « secondaires » (Buyschaert, 2006).

I.1.2.1 Le diabète de type I

Dans la nouvelle classification, le terme « diabète insulino-dépendant » est remplacé par « diabète de type 1 » (Perlemuter *et al.*, 2000). Ce dernier résulte d'une destruction sélective des cellules β des îlots de Langerhans (Buyschaert, 2006) qui sont détruites jusqu'à 90 % de leur quantité normale (Figure 1), c'est une maladie auto-immune, beaucoup plus rarement considérée comme idiopathique (Hennen, 2001).

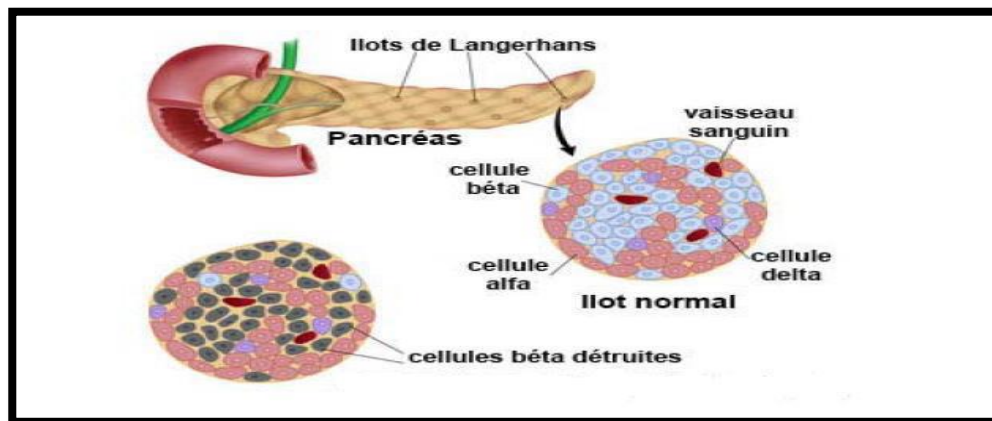


Figure 1 : : Destruction des cellules β des îlots de Langerhans : diabète de type (Docteurcllic.com)

I.1.2.2. Le diabète de type 2

Le diabète sucré ou diabète de type 2 est une élévation chronique de la concentration de glucose dans le sang ce que nous appelons hyperglycémie et regroupe plusieurs maladies de pathogénie différente qui cause des troubles de la sécrétion et/ou de l'action de l'insuline(OMS, 2006).La figure 2 schématise les sites de disfonctionnement qui conduisent à l'hyperglycémie.

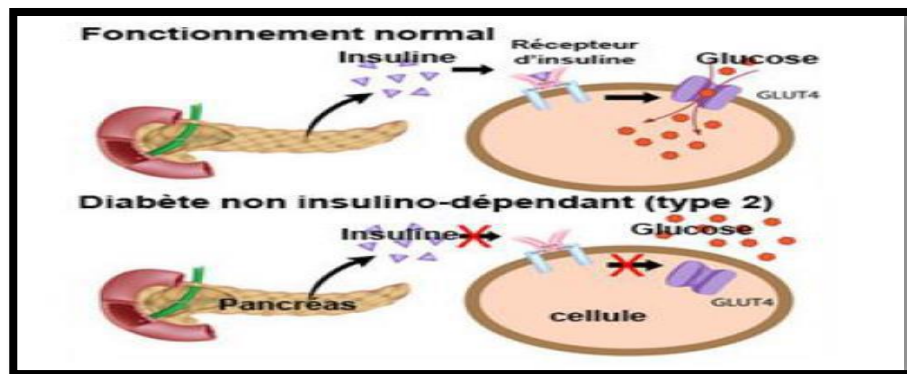


Figure 2 : le diabète de type II (Docteurcllic.com)

I.1.2.3. Le diabète de la grossesse

Le diabète de la grossesse (Aussi appelé diabète gestationnel), défini par l'OMS comme un trouble de la tolérance glucidique conduisant à une hyperglycémie de sévérité variable. Il se manifeste par une augmentation de la glycémie vers la fin du deuxième et au troisième trimestre de la grossesse. Il résulte d'une résistance des cellules à l'action de l'insuline, causée naturellement durant la grossesse par les hormones du placenta.

I.1.3. Complications du diabète

Le diabète sucré peut être responsable de multiples complications chroniques qui touchent de nombreux organes (Valensi et Cosson, 2006). Parmi ces complications chroniques, on distingue :

I.1.3.1. Macro angiopathie

Le diabète est un facteur de risque de la macro angiopathie (Racciah,2004).Un des exemples de cette macro angiopathie est l'athérosclérose qui est une des complications sévères du diabète. Il s'agit de complications macro vasculaires (atteinte des artères de calibre supérieur à 200 μ m) (Guillet,2010). La macroangiopathie concerne le cœur (infarctus du myocarde), le cerveau et les membres inférieurs avec l'artérite (Chevenne, 2004).

I.1.3.2. Micro angiopathie

La micro angiopathie touche les petits vaisseaux (artérioles, veinules et capillaires de diamètre inférieur à 30 μm). Elle concerne indifféremment tous les tissus et organes (**Geoffroy**, 2005), mais ses manifestations cliniques ne deviennent sensibles qu'au niveau des fibres nerveuses (neuropathie), des micro vaisseaux rénaux (néphropathie) et rétiniens (Rétinopathie) (**Raccah**, 2004).

I.1.3.2.1. Néphropathie

Elle apparait suite à une hypertrophie rénale et une augmentation de la filtration glomérulaire, le problème des lésions peut être résolu avec un meilleur équilibre glycémiques. (**Simon et Jean**, 2000).

I.1.3.2.2. Rétinopathie

Les premières lésions histologiques de la rétinopathie diabétique sont l'épaississement de la membrane basale, la perte des péricytes puis la perte des cellules endothéliales des capillaires rétiniens aboutissant à leur obstruction (**Raccah**, 2004). Elle peut, en l'absence de traitement, provoquer une diminution très importante de la vision (malvoyance), voire même une perte complète de la vue (cécité) (**Maurice**, 2004).

I.1.3.2.3. Neuropathie

Lorsque la glycémie et la tension artérielle sont très élevées, le diabète peut provoquer des lésions nerveuses dans l'ensemble de l'organisme (neuropathie). Elle prédomine aux niveaux des membres inférieurs en raison de la plus grande fragilité des fibres longues sensibles peu myélinisées (**Gourdi et al**, 2008). Les dommages causés aux nerfs dans ces régions sont appelés neuropathie périphérique et peuvent provoquer des douleurs, des fourmillements ou une perte de sensations. Comme la personne n'a plus de sensations, les blessures passent inaperçues et peuvent donner lieu à des infections graves et à une ulcération, un pied diabétique (Figure 03) qui peut évoluer vers une amputation (**FID**, 2013).



Figure 3 : : pied diabétique infecté (alamyimage.fr)

I.2.1. Infection du pied diabétique

I.2.1.1. Définition

Infection, ulcération ou destruction des tissus profonds du pied, associés à une neuropathie et/ou une artériopathie périphérique des membres inférieurs chez les patients diabétiques (Belley R, 2005).

I.2.2. Symptomatologie

Divers symptômes sont décrits chez les patients sujets à l'infection du pied diabétique : l'insensibilité à la douleur, favorise les plaies liées au frottement et aux corps étrangers (Khalid, 2011), l'atteinte vasculaire est très courante chez ces personnes et qui apparaît parallèlement à la neuropathie (Andrew, 2005), les ulcères qui apparaissent chez un diabétique suite à l'accumulation de plusieurs facteurs de risque (Neuropathies, vascularites) (Andrew, 2005).

I.2.3. Facteurs de risque

Selon Jacques et al. (2015), les facteurs déclenchant une infection du pied diabétique les plus fréquents sont :

- des chaussures inadaptées aux déformations du pied ;
- une hyperpression répétitive lors de la marche
- des ongles blessants ;
- la présence de corps étrangers dans la chaussure, des soins inadaptés ;
- la marche pieds nus.

I.2.4. Physiopathologie

Les troubles trophiques du pied chez le diabétique sont la conséquence de plusieurs mécanismes physiopathologiques. Les connaître est essentiel afin d'en réduire l'incidence et d'en assurer une prise en charge précoce pour réduire le risque d'amputation. Trois complications du diabète sont principalement en cause : la neuropathie, l'artériopathie et l'infection. La neuropathie périphérique, sensitivomotrice et autonome, est fréquente et représente la principale complication à l'origine des lésions du pied diabétique, avec perte d'alerte douloureuse, déformations du pied, hyper appui et sécheresse cutanée. L'artériopathie, plus fréquente et plus grave que chez le patient non diabétique, est un facteur d'aggravation très important responsable de retard de cicatrisation et de gangrène à l'origine fréquente d'amputation. L'infection est aussi un facteur d'aggravation majeur par son risque d'extension profonde, notamment vers l'os qui peut conduire à l'amputation, et d'extension générale avec son risque vital (D Malgrange, 2008).

I.2.5. Différents aspects de l'infection du pied diabétique

- **Infections superficielles des tissus :** Atteinte cutanée uniquement sans atteinte des tissus sous-cutanés (Figure 4) avec les signes suivants : chaleur et douleur locale, érythème < 2 cm de large autour de la plaie, tuméfaction écoulement purulent (Joël et al.,2012).



Figure 4 : infection superficielle du pied diabétique (Podexpert.com).

- **Infections profondes des tissus :** des infections qui peuvent toucher les structures au-dessus de la peau et se manifeste par (Figure 05) collections purulentes, abcédassions et qui peuvent aller jusqu'à l'ostéite (Joël et al.,2012).



Figure5 : infection profonde du pied diabétique (konsultasyon.net)

Selon les symptômes et les tissus atteints l'infection est désignée par un grade qui est corrélé au risque d'amputation (Tableau 01).

Tableau 1: Grade et intérêt pronostic (David, 2013).

Symptômes	Grade	Risque d'amputation (%)
Pas de signes d'infection	1	3
Atteinte non extensive	2	3
Atteinte des structures sous cutanées (fascia, tendons, articulation, os), sans signes systémiques	3	46
Signes d'inflammation systémique (au moins 2 signes) : - Température > 38°C ou < 36°C - pouls > 90/min	4	70

II. Organe cutané et infection du pied diabétique

II.1. Structure de l'organe cutané

II.1.2. Composition et caractéristiques de la peau

La peau est un tissu stratifié composé de trois couches superposées (Figure 6) soit, l'épiderme, le derme et l'hypoderme (de la surface vers l'intérieur). Pour compléter la topographie générale, on trouve des annexes telles que les follicules pileux et les glandes sébacées (Dubois et Demelin, 2005; San Miguel et Grice, 2015; Sanford et Gallo, 2013).

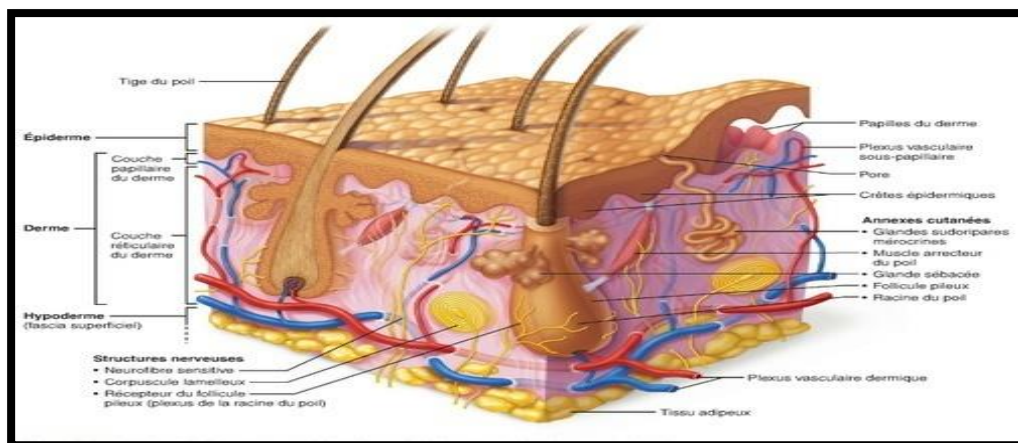


Figure 6 : coupe de la peau avec racine dermo épidermique (Kong, 2011).

II.1.2.1. L'épiderme

L'épiderme est la couche supérieure la peau (Figure 07). Elle est elle-même composée de différentes couches dont la plus extérieure, la couche cornée ou stratum corneum (SC), est constituée de cellules mortes. L'épiderme est séparé du derme par la lame basale ou couche germinative à partir de laquelle vont se former les cellules. Au niveau de l'épiderme, on trouve

des ostiums (sortie de poil) et des pores sudoraux. L'épiderme est essentiellement composé de kératinocytes (principales cellules fibreuses) mais également de mélanocytes (cellules de la pigmentation), de cellules de Langerhans (cellules immunitaires) et de cellules de Merkel (cellules de la sensibilité et du toucher). Les kératinocytes sont produits au niveau de la couche basale et vont se différencier en remontant vers la surface pour atteindre la couche cornée et desquamer (**Dubois et Demelin,2007**). L'épiderme étant la couche la plus superficielle de la peau, elle va assurer un rôle de défense important contre les contaminations extérieures. C'est également à ce niveau que nous allons retrouver une grande partie de la flore bactérienne cutanée.

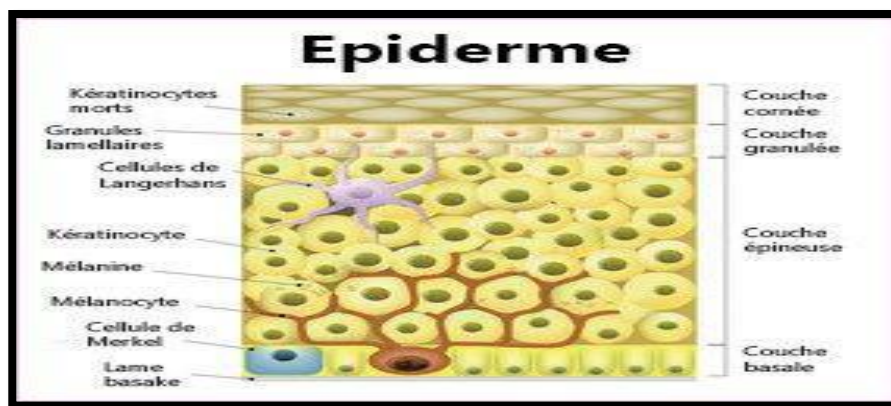


Figure 7 : couches de l'épiderme (Wix.com)

II.1.2.2. Le derme

Le derme donne sa solidité à la peau, sa résistance et son élasticité. Il est plus épais (1 à 4 mm) et moins dense que l'épiderme. Le derme est constitué d'une couche superficielle, le derme papillaire et d'une couche profonde, le derme réticulaire. Il est composé d'une matrice extracellulaire (substance amorphe constituée de glycoprotéines, de collagène, d'élastine et d'acide hyaluronique) et de cellules (fibroblastes, macrophages, mastocytes et leucocytes). Les autres cellules appartiennent au système immunitaire. Enfin, c'est également le siège des annexes cutanées (**Dubois et Demelin,2007**).

II.1.2.3. L'hypoderme

L'hypoderme est un tissu lâche et vascularisé. Il renferme les adipocytes (cellules graisseuses). C'est donc un réservoir énergétique. Il va également avoir un rôle mécanique en amortissant les pressions exercées, il contribue donc à protéger les organes profonds (**Dubois J, 2007**).

II.1.2.4. Les annexes de la peau

Le follicule pileux est une structure épidermique incluse dans le derme. Comme nous pouvons le voir sur la Figure 3 la couche germinative de l'épiderme suit le follicule pileux en s'enfonçant dans le derme. La glande sébacée est une annexe formant, avec le poil et son muscle arrecteur, une unité pilo-sébacée. La glande sébacée sécrète du sébum qui a un rôle de lubrification de la peau et des poils et de protection par son hydrophobie et son activité bactériostatique (Dedet, Gallo, 2007).

II.2. La barrière cutanée

La barrière cutanée est composée de plusieurs couches sous l'épiderme qui ont des fonctions précises et qui abritent des microorganismes. Il existe également une couche aqueuse et lipidique (film hydrolipidique) au-dessus de l'épiderme qui contribue à l'écologie de la surface. La barrière cutanée est donc essentiellement représentée par la barrière épidermique (Sanford et Gallo, 2013). La kératine, la loricine, la cornéodesmosine, l'involucrine et la filaggrine sont des protéines qui jouent un rôle important dans la composition de la barrière cutanée. Toutes ces couches combinées assurent la défense contre les agents infectieux et contre les agressions externes physiques (traumatismes, changements de température, rayons UV, etc.) ou chimiques (produits toxiques, allergènes, etc.).

III.1. La flore cutanée

La flore cutanée est composée de 10^2 à 10^6 bactéries par cm^2 . On peut distinguer deux types de flores bactériennes : la flore résidente et la flore transitoire.

III.1.1. La flore cutanée résidente

La flore résidente est composée majoritairement de bactéries aérobies ou aéro-anaérobies facultatives à Gram positif. Ce sont des germes commensaux qui vivent au dépend de leur hôte sans leur causer de dommage. La composition de la flore résidente est fixe et permanente, elle se reforme spontanément après perturbations (Pons, 2012).

La flore cutanée résidente est constituée de quatre groupes majoritaires, les phyla *Actinobacteria* (52%), *Firmicutes* (24%), *Proteobacteria* (16%) et *Bacteroidetes* (5%) (Sanford et al., 2013 ; Cundell, 2016 ; Lecointre et al., 2006).

Les genres présents en plus grande quantité sont *Corynebacterium* et *Propionibacterium* appartenant au phylum *Actinobacteria*. Ce sont des bacilles aéro-anaérobies facultatifs à Gram positif. On y trouve *C. accolens*, *C. jeikeium*, *C. urealyticum*, *C. amycolatum*, *C. minutissimum*, *C. striatum*, *P. acnes*, *P. granulosum* et *P. avidum*. Il y a également la présence de *Micrococcus*, cocci aérobies à Gram positif (Jemni H et al., 1996).

Dans le phylum *Firmicutes* on peut citer les Staphylocoques qui sont des cocci aéroanaérobies facultatifs à Gram positif et catalase positive. Chez les staphylocoques à coagulase négative (SCN), l'espèce la plus retrouvée est *S. epidermidis*, il y a également *S. hominis*, *S. capitis* et

S. saprophyticus (Mokni M, 2014).. Les staphylocoques possèdent des adhésines qui facilitent leur attachement.

. Le phylum **Bacteroidetes** est composé de bacilles anaérobies stricts à Gram négatif. (Mokni M, 2014).

III.1.2. La flore transitaire cutanée

La peau est vectrice de germes. La flore transitoire polymorphe est d'origine environnementale ou peut provenir d'autres flores commensales de l'organisme, notamment de la flore digestive. Elle reflète une contamination récente et peut donc varier dans la journée, selon les activités et selon l'environnement. Néanmoins, la flore transitoire ne prolifère pas grâce, entre autre, à l'effet protecteur de la flore résidente. C'est une flore saprophyte qui se nourrit de matière organique en décomposition provenant de l'environnement. Elle peut comporter des germes potentiellement pathogènes (Pons G et al, 2012 ; Fournier, 2014). Cette flore transitoire est composée entre partie d'entérobactéries (*Escherichia coli*), bacilles aéro-anaérobies facultatifs à Gram négatif, de streptocoques du groupe B (Firmicutes), cocci à Gram positif, et de *Pseudomonas aeruginosa* (Proteobacteria), bacille aérobie strict à Gram négatif. On trouve également l'espèce *Staphylococcus aureus*, il s'agit d'un staphylocoque à coagulase positive le plus souvent sensible à la méticilline mais il existe aussi un variant particulier de *S. aureus* résistante à la méticilline-qui colonise les sites humides d'hôtes sains (Pons G, 2016)

III.2. La flore cutanée impliquée dans l'infection du pied diabétique

La microbiologie des lésions du pied chez le diabétique est caractérisée par la présence de plusieurs agents pathogènes. Plusieurs études montrent que le profil bactériologique des patients est plus souvent poly-microbien et que les cocci à Gram positives sont plus prévalent que les bacilles à Gram négative (Akwah et al., 2015).

III.2.1. Staphylocoques

Le **staphylocoque** est l'un des pathogènes bactériens les plus importants dans la pratique clinique (Bagnoli et al., 2017). Ce sont des **cocci** à Gram positifs classiquement disposés en amas. L'espèce *S. aureus* se distingue généralement des autres staphylocoques appelés staphylocoques à coagulase négative (*SCN*) par la présence d'une coagulase. *S. aureus* a un potentiel de pathogénicité très important et est responsable aussi bien d'infections communautaires que nosocomiales par opposition, les *SCN* sont en règle générale des bactéries opportunistes essentiellement responsables d'infections nosocomiales. Leur transmission intra ou interhumaine s'opère généralement par contact direct (manu portage). Plus rarement, elle peut être indirecte à partir d'une source environnementale (vêtements, draps, matériels médicaux) (Verdier et al., 2015). Plusieurs études ont montré que les

infections du pied diabétique sont polymicrobiennes et que *S. aureus* est l'agent pathogène le plus fréquemment isolé (Messad *et al.*, 2013).

III.2.2. Streptocoques

Bactéries appartenant au genre **Streptococcus** (du grec **streptos**: collier, **kokkos**: graine) sont des **cocci** à Gram positifs très répandues disposant typiquement en chaînette en plus ou moins longues, non sporulant, aéro-anaérofacultative catalase négative (Pebret, 2003). On distingue ainsi les streptocoques β -hémolytiques qui lisent les hématies avec destruction complète du stroma globulaire autour des colonies, les streptocoques α -hémolytiques qui ne provoquent qu'une lyse incomplète avec souvent un reflet verdâtre au milieu de la culture (*Streptococcus viridans*) et enfin les streptocoques non hémolytiques. (Académie Nationale de pharmacie, 2017). Plusieurs études ont montré que l'infection du pied diabétique est souvent causé par des streptocoques beta hémolytiques (souvent du groupe B) (Zanella, 2016).

III.2.3. Entérobactéries

Les entérobactéries sont une famille très hétérogène pour ce qui est de leur pathogénie et de leur écologie. Les espèces qui composent cette famille sont en effet soit parasites (*Shigella*, *Yersinia pestis*), soit commensales (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* sp), soit encore saprophytes (*Serratia* sp, *Enterobacter* sp) (DL Kirschke, 2003). Les entérobactéries sont des bacilles Gram négatif droits, mobiles par flagelles péritriches, ou immobiles, non sporulés, aérobies facultatifs, produisant de l'acide à partir du glucose, catalase positive, oxydase négative, réduisent habituellement les nitrates en nitrite (Cristian, 2008 ; Madigan et Martinko, 2007). Une étude sur 117 patients avec 207 souches au sud de la Chine a montré que la proportion de bactéries à Gram positif (45,9%, 112/207) était supérieur à celle des bactéries Gram positives (45,9%, 95/207) ; les **Enterobacteriaceae** étaient la principale famille à Gram négatif (73,2%, 82/112), comprenant principalement **E. coli**, **E. cloacae** et **K. pneumonia** (Xiaoying Xie, 2017).

III.2.4. Pseudomonas

Pseudomonas sp est une bactérie ubiquiste, pathogène opportuniste. C'est un bacille à Gram négatif à extrémité effilée ou arrondie, régulière, fins très mobile par ciliature polaire, c'est une bactérie aérobie stricte, non exigent (Somipev, 2017). *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste responsable d'infections nosocomiales graves, d'infections potentiellement mortelles chez les personnes immunodéprimées (Ben Haj., 2011). L'infection à *Pseudomonas* est souvent isolée après des hospitalisations de longue durée, l'application de pansements humides, des bains de pieds ou le port de bottes en caoutchouc favorisent cette infection (Lipsky, 1997).

III.2.5. Entérocoques

Les *Enterococcus* sont des cocci Gram positifs, se présentent sous forme de cellules isolées, par paire ou encore sous forme de chaînette oxydase positifs, généralement catalase négatifs. Certaines espèces présentent une activité pseudo-catalase. Ils sont généralement des anaérobies facultatifs et non mobiles. (Schleifer et al., 1984). Les Enterocoques ont été identifiées comme pathogènes dans une plaie traitée après une résistance à la céphalosporine (Spilf, 2007)

IV. Traitement du pied diabétique

IV.1. Antibiothérapie

L'antibiothérapie est le moyen thérapeutique, pour venir à bout d'une infection en utilisant un ou plusieurs médicaments anti-infectieux, appartenant à la classe des antibiotiques et dont l'activité s'exerce contre les bactéries à l'origine de cette infection (Hordé, 2014). Lorsqu'une IPD est diagnostiquée, l'antibiothérapie doit souvent être prescrite sans délai en raison du risque d'une évolution rapidement défavorable à tout moment, il s'agit donc dans la plupart des cas d'une antibiothérapie le plus souvent de type probabiliste (Senneville, 2008). Devant une plaie superficielle, un intertrigo, le germe le plus souvent responsable est le staphylocoque doré. Après avoir fait des prélèvements bactériologiques, on utilise un antibiotique à spectre étroit, anti-staphylococcique (oxacilline, pristinaamycine). Devant une plaie profonde ou un pied très inflammatoire avec signes de cellulite, il faut avoir recours à une bi ou une trithérapie, utilisant les quinolones, les aminosides (attention à la fonction rénale), l'amoxicilline associée à l'acide clavulanique ou enfin larifamycine. Cependant les associations doivent être adaptées à l'antibiogramme et prudentes pour éviter de sélectionner des germes nosocomiaux (Bouysset, 2004).

Le choix des antibiotiques dans le traitement de l'infection du pied diabétique doit tenir compte essentiellement de deux paramètres, l'efficacité vis-à-vis du ou des germes pathogènes et la capacité à éviter la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques (Hartmann et al., 2000).

IV.11. Choix de l'antibiothérapie probabiliste

Le choix de l'antibiothérapie n'est pas consensuel. La durée de traitement et la voie d'administration optimales n'ont pas été déterminées par des essais comparatifs. En pratique, le choix de l'antibiothérapie probabiliste dépend de la gravité de l'infection, de la probabilité de résistance bactérienne, des effets indésirables à allier avec les antécédents du patient etc... L'antibiothérapie probabiliste doit toujours tenir compte des staphylocoques et des streptocoques non résistants, ainsi que du coût du traitement (Spilf, 2007 ; IWGDF, 2011). Elle sera adaptée ensuite à l'antibiogramme retrouvé. La durée peut varier de 2 à 4 semaines selon que l'infection soit légère/modérée ou sévère.

-En cas d'infection sévère : l'antibiothérapie est à débiter en urgence par voie intra veineuse, généralement avec une association d'antibiotiques actifs sur les bactéries citées précédemment. Ce choix probabiliste se fait souvent à l'échelle de l'hôpital en question qui tient des résistances bactériennes locales (Prescrire Rédaction, 2014).

-En cas d'infection légère, une antibiothérapie orale à domicile peut être envisagée avec une bonne diffusion cutanée et osseuse. Un traitement d'une durée de 1 à 2 semaines est préconisé. L'amoxicilline+acide clavulanique, la céfalexime, les fluoroquinolones et la clindamycine sont les antibiotiques oraux ayant démontré leur efficacité (IWGDF, 2011).

-En cas d'ostéite, la durée optimale du traitement antibiotique est difficile à préciser en raison du nombre limité d'études cliniques (Spilf, 2007). D'autre part, la ligne de démarcation n'est pas clairement définie entre une antibiothérapie seule et une amputation fonctionnelle dite conservatrice associée à une durée d'antibiothérapie conséquente plus courte. En pratique, l'antibiothérapie est administrée à posologies plus fortes et pour une durée minimale de 2 mois (IWGDF, 2011).

Elle reste encore un sujet de controverse entre les différents auteurs. Son choix dépend de plusieurs facteurs, mais non spécifiques à l'IPD, dont les principaux sont l'écologie bactériologique, la sévérité de l'infection, suspicion d'une infection ostéo-articulaire sous-jacente, facteurs liés au terrain (artérite, degré d'immunocompétence, allergies, tares métaboliques, troubles digestifs et/ou neurologiques) (E. Senneville et al., 2008).

La voie d'administration parentérale doit être réservée aux infections jugées sévères, en cas d'artériopathie, lorsque les molécules utilisées ne sont pas administrables par voie orale ou que l'état du patient est incompatible avec la prise orale.

À l'opposé, les situations d'infections légères à modérées pourraient probablement être traitées par voie orale en ambulatoire dès lors qu'un suivi médical est possible de façon rapprochée. (E. Senneville et al., 2008).

L'adaptation du traitement probabiliste sera faite en fonction de l'évolution clinique et des résultats des cultures (tableau 12)

Selon Grayson et coll (Grayson et al., 1994) L'antibiothérapie probabiliste doit comporter : une bêta-lactamine à large spectre couvrant les germes hospitaliers type ertapénème ou l'association pipéracilline tazobactam (tazocilline), associé à un aminoside pour diminuer le risque d'émergence de résistance, et/ou à un glycopeptide type teicoplanine (moins néphrotoxique que la vancomycine) efficace contre les staphylocoques résistants à la méticilline.

cas d'allergie aux bêta-lactamines, on remplacera la bêta-lactamine par une fluoroquinolone.

Selon Lipsky BA (Lipsky et al., 2005) une prise unique par jour de l'ertapénème pendant 5 jours aurait la même efficacité que l'association piperacilline/Tazobactam dans le traitement du pied diabétique infecté avec un relais par l'amoxicilline+ acide clavulanique en IV à partir de J5.

Dans notre série, l'antibiothérapie probabiliste la plus utilisée été l'association amoxicilline-acide clavulanique et gentamicine, suivi de l'association ciprofloxacine et amoxicilline-acide clavulanique et enfin du couple métronidazole et amoxicilline-acide clavulanique.

Tableau 2 : : résumé des propositions d'antibiothérapie de première intention selon le type d'IPD du consensus international sur le pied diabétique (Management of diabetic foot infections,2007)

Quarante huit à 72 heures après le début du traitement antibiotique, la situation infectieuse du patient doit être réévaluée et les résultats des cultures sont alors généralement disponibles. Plusieurs situations peuvent être envisagées :	
l'évolution est favorable	l'antibiothérapie initiale doit être poursuivie excepté lorsqu'elle comportait un spectre large (couverture des SARM et/ou des BGN multirésistants) et que ces pathogènes n'ont pas été isolés dans les prélèvements (« désescalade thérapeutique »).
l'évolution est défavorable	il faut vérifier l'adéquation entre les résultats des cultures et l'antibiothérapie initiale et adapter le cas échéant en couvrant les pathogènes isolés ; si aucun pathogène résistant n'a été mis en évidence sur lesprélèvements, il faut vérifier l'existence d'une extension de l'infection vers les tissus profonds et/ou une ischémie tissulaire, une inobservance du traitement ou toute autrecause d'échec.

IV.2. Soins locaux

Le débridement médical Parmi les nombreuses techniques proposées, le débridement mécaniqueest en général recommandé chez le diabétique.Il consiste à exciser au moyen de ciseaux, scalpels et curettes les partiesmolles nécrosées, les tissus dévitalisés, contaminés et les tissus fibreux pour ne laisser en place que du tissu sain et ainsi faciliter la cicatrisation (**Eneroth et al.,1999**)

IV.2.1. Les antiseptiques

Les soins de la plaie commencent par la désinfection de la plaie et de la zone qui l'entoure avec un lavage soigneux à l'eau complétée de soins avec des ntiseptiques ; les solutions poly-iodées sont plus efficaces que la chlorhexidine et n'altèrent pas la cicatrisation tout en évitant le risque d'émergence de germes résistants (SARM) (**Kastenbauer et al.,2003**)

IV.2.2. Les pansements

En l'absence d'études rigoureuses, il n'existe aucun consensus quant au type de pansement à utiliser sur une plaie infectée du pied chez le diabétique. La multiplication des pansements et leur coût élevé exigent le développement d'études économiques sur le rapport coût/efficacité. (Cruciaïn et al .,2005)

IV .2.3. Lutte contre l'œdème

Un œdème local accompagne souvent une infection du pied chez le diabétique et serait un facteur de retard de la cicatrisation. Il a été montré que la réduction de l'œdème augmente le taux de cicatrisation chez le diabétique en cas de plaies du pied infectées une fois qu'elles ont été débridées (Haddoun et al .,2004)

IV.2.4. Prise en charge chirurgicale

IV .2.4.1. Place de la chirurgie vasculaire

Avant d'envisager le traitement d'un ulcère diabétique, la correction de l'insuffisance vasculaire est indispensable. Aucune indication d'amputation ou de chirurgie orthopédique ne doit être posée sans avoir une évaluation précise de l'état vasculaire des membres inférieurs du patient.(Picard et al .,2002)

IV .2.4.2. Place de la Chirurgie orthopédique

IV .2.4.2.1. Chirurgie conservatrice

En urgence le pronostic fonctionnel dépend en grande partie de l'étendue des lésions et de la précocité du traitement .la chirurgie d'urgence doit être la plus conservatrice possible. Toute amputation d'urgence même mineure doit rester exceptionnelle (Ha Van G et al .,2008)

IV.2.4.3. Chirurgie radicale

Tout geste chirurgical dans le cadre d'une ostéite doit laisser un pied fonctionnel et équilibré sur le plan tendineux. L'état vasculaire et les possibilités d'appareillage doivent être rediscutés avant chaque procédure. Le plus souvent, plus la longueur osseuse conservée est grande et meilleur est le résultat fonctionnel après appareillage (Sanders LJ et al.,2008)

IV.2.4.4. Amputation

Chez le patient non artériopathe, l'amputation sera réalisée seulement devant des lésions irréversibles nécrotiques ou extensives. Chez le patient artériopathe, s'il y a possibilité de revascularisation, l'amputation est proposée secondairement après un geste vasculaire permettant de limiter le sacrifice tissulaire ; elle peut avoir lieu dans le même temps que la revascularisation ou quelques jours après. En cas d'impossibilité de revascularisation,

l'amputation est réalisée si les lésions sont extensives et irréversibles.(Van Damme et al.,2001)

IV.3. Mesures adjuvantes

En plus de l'antibiothérapie et du rétablissement d'un apport artérielsatisfaisant, l'obtention d'un équilibre glycémique strict, le débridement del'ulcération, la décharge de la plaie et les soins locaux sont les points importantsde la prise en charge des infections des plaies du pied chez le diabétique, nécessitant la collaboration active de nombreux professionnels de santé. (Lipsky BA et al .,2004)

IV.3.1. L'équilibre glycémique

Les arguments pour maintenir une glycémie la plus normale possible, biequenon décisifs, sont nombreux et méritent d'être retenus.(Krankel N et al.,2005)

IV .3.2. La décharge mécanique

C'est la mesure thérapeutique essentielle et fondamentale, sans laquelle l'obtention de la cicatrisation devient illusoire. Les deux principes de base, suppression de la pression locale et débridement de la plaie, doivent avant tout être respectés par:l'alitement complet ; les chaussures de décharge ; les bottes de décharge(J.-L. Bessea et al.,2011)

V.4. Autres traitements

V.4.1. Oxygénothérapie

L'oxygénothérapie hyperbare (OHB) est un procédé thérapeutique dans la prise en charge des atteintes ischémiques menaçant le pied chez les patients diabétiques, en raison de son effet antimicrobien en augmentant l'activité bactéricide des leucocytes, formation du tissu par stimulation de la prolifération des fibroblastes et synthèse de collagène, il permet aussi la formation de la microcirculation par réduction d'œdème et par l'angiogénèse (Hunt et Pai, 1972;Tibbleset Edelsberg, 1996). Dans le but d'évaluer ce traitement, les auteurs rapportent cette étude en précisant l'intérêt de l'OHB dans les lésions chroniques du pied chez le diabétique.



Figure 8 : A : Caisson hyperbare ; B : cicatrisation d'ulcère après 15 séances d'OHB (ibo issa maman Nasser,2013)

V.4.2. La phytothérapie

Les plantes médicinales sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (**Kanter et al.**, 2006). Une plante médicinale est une plante utilisée pour ses propriétés particulières bénéfiques pour la santé humaine ou animale. Elle est utilisée de différentes manières (décoction, macération, infusion, etc.) et une ou plusieurs de ses parties peuvent être utilisées (racine, rhizome, feuilles, fleurs, etc.) (**Baran**,2000).

V.4.3. La phagothérapie

La phagothérapie est un mot apparu en 1926 dans un ouvrage de d'Hérelle « Le bactériophage et son comportement » construit à partir de « *phagos* » et « *therapeia* » (cure). On peut toutefois signaler que le terme phagothérapie avait été préalablement utilisé dans un tout autre sens : en 1912, Fernand Boivin l'utilise dans sa thèse en tant que traitement qui modifie la façon de se nourrir. Bien que supplanté par le sens de d'Hérelle, on trouve encore quelques fois l'usage de ce mot avec cette acceptation (**Jean**, 2014).

La phagothérapie est l'utilisation de bactériophages (parfois simplement appelés phages) dans le but de traiter et de guérir des infections bactériennes. La phagothérapie est donc un traitement spécifique de maladies bactériennes par des phages. Elle met à profit les propriétés destructrices, lytiques et spécifiques de tel ou tel phage vis à vis d'une bactérie infectante. Formellement, il serait plus exact d'utiliser le terme de « bactériophagothérapie ». Bien qu'existant, ce terme reste néanmoins très peu utilisé du fait de sa longueur. Enfin, dans certains écrits en français l'expression « thérapie phagique » (à l'instar de « phage therapy » des Anglo-saxons) peut être employée en lieu et place de phagothérapie (**Jean**, 2014)

V4.4. Méthodes préventives

L'efficacité de programmes éducatifs consacrés à la prévention des pieds a été démontrée. Malone et al a comparé l'effet d'une séance d'information d'une heure, à l'absence d'information. 203 diabétiques ayant une lésion évolutive du pied ou un antécédent d'amputation ont été inclus. Après un suivi moyen d'un an, il y a eu 4% d'amputations dans le groupe prévention et 12% dans le groupe témoin ($p < 0,03$).

IV. Antibiorésistance

Le risque de sélectionner ou de se trouver confronté à des bactéries multi résistantes (BMR) est élevé dans le cadre de la prise en charge du pied diabétique infecté. Ce risque est dû au fait que les plaies sont poly microbiennes, souvent prises en charge en milieu hospitalier ou chez un patient ambulatoire fréquentant l'hôpital, et donc contaminées par des microorganismes déjà résistants à un ou plusieurs antibiotiques (**Diamantopoulos et al.**, 1998).

IV.1. Antibiotiques

IV.1.2. Définition et Critères de classification

Les antibiotiques sont des substances chimiques, élaborées par des micro-organismes ou par synthèse chimique, capables d'inhiber la multiplication ou de détruire des bactéries (**Caruba et Jaccoulet.**, 2015).

IV.1.3.1. Origine

Les antibiotiques peuvent être naturels, c'est à dire produite par des microorganismes (champignons microscopiques et bactéries) par exemple, la Pénicilline est produite par un champignon *Penicillium notatum*, hémi synthétiques, résultent de la transformation chimique des composés naturels, ou artificiels, obtenus par une synthèse chimique (**Yala.**,2001).

IV.1.3.2. Mode d'action

A la différence des antiseptiques et des désinfectants, les antibiotiques agissent en général de façon très spécifique sur certaines structures de la cellule bactérienne(Figure 9), cette grande spécificité d'action explique pourquoi les antibiotiques sont actifs à très faible concentration. Cette action s'exerce selon les molécules sur des sites variés (**Mevius et al.**, 1999 ; **Oxoby.**, 2002).

La paroi bactérienne :Bacitracine, Pénicilline et Céphalosporines agissent sur les germes en croissance inhibent la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane (muréine composant essentiel de la paroi bactérienne, qui confère à la bactérie sa forme et sa rigidité, ce qui lui permet de résister à la forte pression osmotique intra cytoplasmique) au cours de la multiplication cellulaire. La nouvelle bactérie n'est plus protégée entraînant ainsi une lyse bactérienne (**Zeba.**,2005).

La membrane cellulaire : en désorganisant sa structure et son fonctionnement, ce qui produit des graves troubles d'échanges électrolytiques avec le milieu extérieur L'ADN: Certaines familles d'antibiotiques empêchent la réplication d'ADN en bloquant la progression de l'ADN polymérase. L'actinomycine bloque la progression de l'ARN polymérase. Les sulfamides provoquent une inhibition de la synthèse des bases nucléiques et la cellule meurt par carence en bases nucléiques (**Flandrois et al.**, 1997), les quinolones et fluoroquinolones inhibent l'ADN gyrase (**Chopra.**, 1998).

Le ribosome bactérien : l'antibiotique se fixe sur les ribosomes ce qui entraîne l'arrêt de la biosynthèse des protéines ou la formation de protéines anormales. Les aminoglycosides ou aminosides (streptomycine, gentamycine, amikacine), empêchent la traduction de l'ARNm en se fixant sur la petite sous-unité des ribosomes (**Hermann., 2005**). Les phénicolés (chloramphénicol, thiamphénicol) bloquent la formation de la liaison peptidique sur la grosse sous-unité du ribosome bactérien. Les cyclines (tétracycline, doxycycline) bloquent l'élongation de la chaîne peptidique en se fixant sur la petite sous-unité (**Flandrois et al.,1997**) les macrolides et les kétolides (érythromycine, azithromycine) bloquent l'élongation de la chaîne peptidique (**Nilius et Ma., 2002**). La puromycine copie l'extrémité d'un ARNt, prend sa place dans le ribosome et bloque l'élongation de la chaîne peptidique.

Autres en agissant tant qu'antimétabolites bactériens (c'est à dire au niveau des étapes du métabolisme intermédiaire des bactéries).

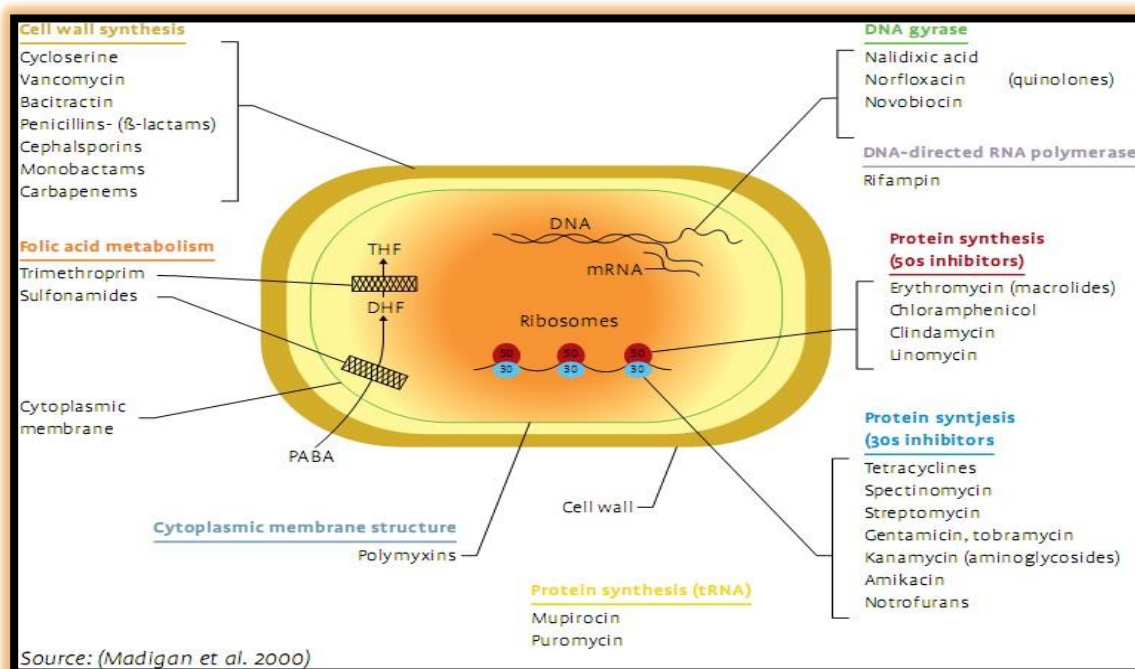


Figure 9 : Mode d'action des antibiotiques (madigan et al.,2000)

III.1.3.3. Spectre d'action

Un spectre d'action d'un antibiotique désigne l'ensemble des espèces bactériennes sensibles à l'antibiotique par effet bactéricide ou bactériostatique (**Talbert et al, 2009**). On distingue deux types le spectre large et étroit.

Une molécule à large spectre s'agit d'un antibiotique efficace sur un grand nombre de types de germes. Ainsi, l'antibiotique sera actif sur une grande partie de tous les cocci et de toutes les bacilles. Les antibiotiques à spectre large seront utilisés lorsque le germe n'est pas identifié et que la pathologie peut être due à différents type de germes (**Stora., 2013**).

Les antibiotiques à spectre étroit, ayant une action limitée (antibiotique des bactéries à Gram positif par exemple) ou très limitée (antibiotiques anti staphylococciques par exemple) sur les bactéries (Delarras., 2014).

IV.1.3.4. Nature chimique

La classification selon la nature chimique basée souvent sur une structure de base par exemple la famille des bêtalactamines dont la structure de base est le cycle bêta-lactame sur laquelle il y a ensuite hémi synthèse. Elle permet de classer les antibiotiques en familles (bêtalactamines, aminosides, tétracycline : Annexe 1) (Benabbou.,2012).

IV.2. Antibiorésistance chez les bactéries

IV.2.1. Définition

La résistance aux antibiotiques apparait comme un événement normal de l'évolution des micro-organismes (Van Bambeke et al., 2008). Elles sont capables de supporter sans dommage une concentration de l'antibiotique supérieur à celle que l'on peut réaliser dans l'organisme (Charpentier et al., 2008).

La notion de résistance clinique, est corrélative d'un échec thérapeutique ; elle n'a qu'une signification arbitraire, par rapport au malade ; elle n'a aucun sens à l'échelle micro-organisme (Meyer et al., 2004).

De manière générale, la résistance aux antibiotiques résulte d'une évolution par sélection naturelle, les antibiotiques exerçant une pression sélective très forte, en éliminant les bactéries sensibles (Figure 10). On suppose que le cas le plus fréquent est une adaptation rapide des bactéries à un nouvel écosystème, qui naît de mutations génétiques aléatoires (Carattoli, 2001) leur permettant d'y survivre, et de continuer à se reproduire, en transmettant à leur descendance leurs gènes de résistance (transfert vertical), ou qui se fait suite à des échanges de gènes de résistances entre des bactéries (transformation génétique, transduction ou conjugaison) qui habitent dans divers écosystèmes, y compris les humains, les animaux et l'environnement

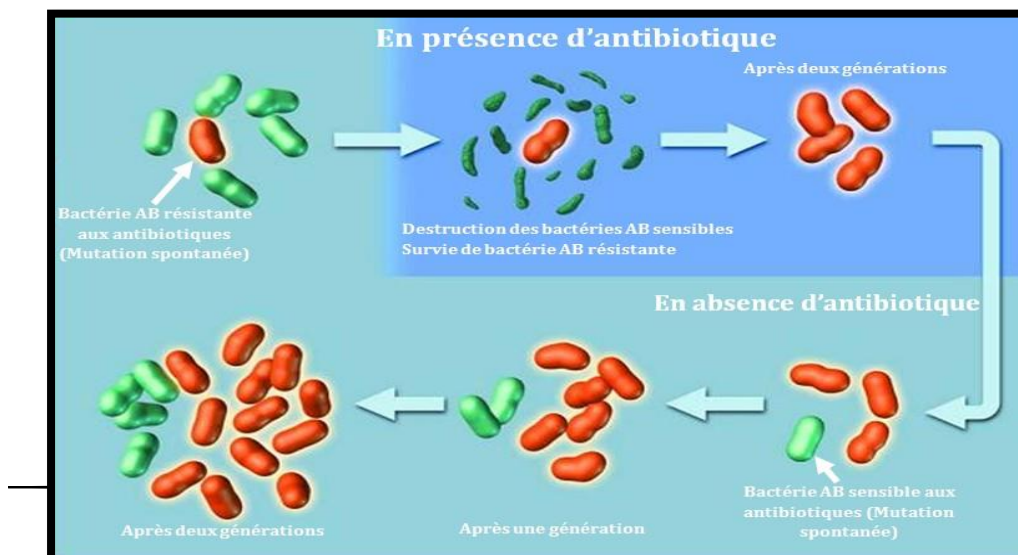


Figure 10 : Schéma illustrant le développement de la résistance aux antibiotiques (George et *al.*1998).

IV.2.2. Types de résistance

Les bactéries sont résistantes aux antibiotiques soit naturellement soit par un mécanisme acquis (Delaere.,2001). Les moyens d'acquisition reconnus sont d'origine naturelle (les souches productrices d'antibiotiques produisent des facteurs de résistance) ou bien des mutations et adaptation et échanges génétiques entre bactéries (Favet.,2013).

IV.2.2.1. Résistance naturelle

Certaines bactéries sont naturellement résistantes à certaines molécules, on parle alors de résistance naturelle, innée ou intrinsèque (Delaere., 2001 ; Messai., 2006). Elles possèdent un génotype qui les rend insensibles à ces agents (Yala et *al.*,2001).La résistance naturelle existe naturellement chez tous les membres d'une espèce bactérienne (Courvalin et *al.*,2001). Elle est permanente et d'origine chromosomique donc, elle fait partie du patrimoine génétique de la bactérie (Mehdi.,2008). La résistance innée est stable, transmise à la descendance lors de la division cellulaire (transmission verticale) mais pas ou peu transmissible d'une bactérie à une autre (transmission horizontale) (Lozniewski et *al.*, 2010 ; Messai., 2006).

IV.2.2.2. La résistance acquise

La résistance acquise à un antibiotique est un caractère qui ne concerne que quelques souches d'une espèce donnée (Courvalin.,2007). C'est un phénomène qui apparait au niveau des souches normalement sensibles à cet antibiotique (Yala et *al.*,2001 ; Lavigne.,2007). La résistance acquise est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérienne (Lozniewski et *al.*, 2010), par l'acquisition des nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotique (Mandell et *al.*, 2009 ; Lewis 2009 ; Yamashita et *al.*, 2000). Ce nouveau gène peut être obtenu par deux grands mécanismes génétiques, l'un par une mutation spontanée au niveau du chromosome et définit une résistance chromosomique, l'autre par transfert d'ADN de plasmide ou les éléments transposables (transposons) et ils définissent une résistance extra chromosomique (Paul, 1997 ; Mehdi, 2008).

IV.2.3. Support génétique de la résistance

IV.2.3.1. La résistance chromosomique

La résistance chromosomique est un phénomène rare, résulte d'une mutation (Courvalin et Philippon., 1989 ; Pallasch., 2003). Il n'est pas provoqué par la présence de l'antibiotique

mais l'antibiotique révèle la mutation de résistance en sélectionnant les bactéries mutantes résistante ou plus exactement, en détruisant les autres bactéries de l'espèce, celles restées sensibles à l'action de l'antibiotique (**Lozniewskiet al.,2010**). La mutation de résistance est un phénomène indépendant, c'est-à-dire l'apparition d'une mutation ne favorise pas l'apparition d'autres mutations de résistance à d'autres antibiotiques donc la probabilité de deux mutations simultanées est très faible. Cette indépendance des mutations constitue un des meilleurs arguments pour justifier l'association des antibiotiques (**Mandell et al., 2009 ; Lewis, 2009 ;Yamashita et al., 2000**). Elle est transmissible, permanente et a donc un caractère héréditaire (transmission sur un mode vertical de bactérie mère à bactéries-filles) (**Mehdi,2008**).

IV.2.3.2. La résistance extra chromosomique

Elle correspond à l'acquisition de gènes de résistances transférables d'une bactérie donneuse à une autre bactérie dite receveuse (transmission horizontale) (**Oliver.,2014**). Les plasmides et les transposons sont les principaux éléments génétiques mobiles susceptible de conférer la résistance à une souche receveuse par divers modes de transmission (Figure 11).

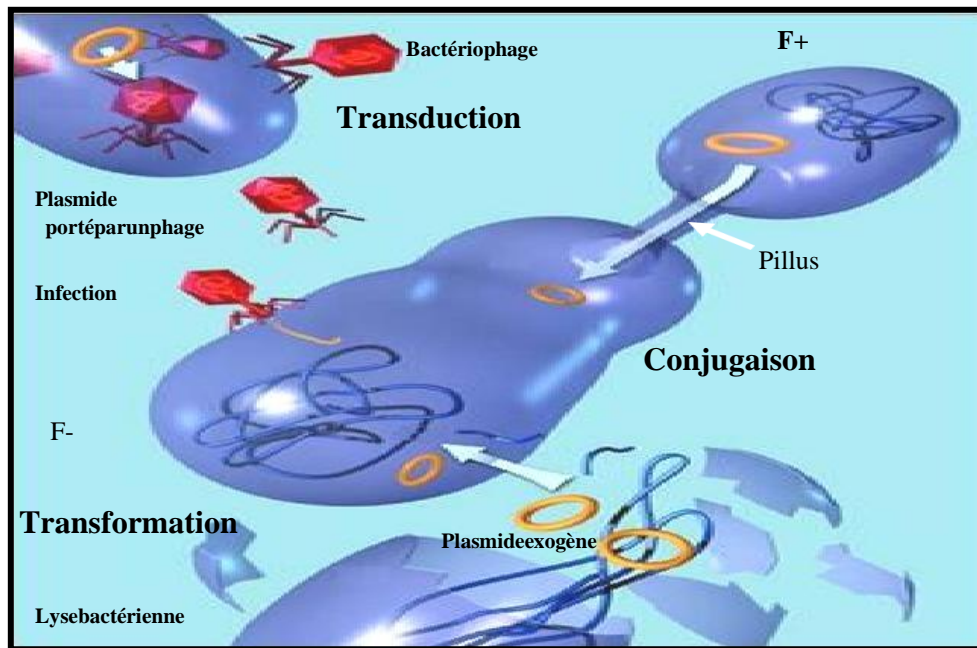
IV.2.3.2.1. Plasmides

Les plasmides sont des éléments d'ADN bi carténaires, circulaires, extra chromosomiques capables de se répliquer de façon autonome (**Sylvie, 2009**). L'information génétique est portée par des plasmides, transférables à d'autres bactéries par conjugaison, transduction ou transformation (**Yala et al., 2001**).

IV.2.3.2.2. Transposons

Ce sont des fragments d'ADN, capable de changer leur localisation dans le génome sans jamais apparaître à l'état libre. Ils codent pour les déterminants de la transposition et ceux d'autres fonctions telles que la résistance aux antibiotiques en s'intégrant soit dans le chromosome soit dans le plasmide, en allant de l'un à l'autre (**Mehdi., 2008**).

11 :



Figure

Acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques (Mehdi., 2008).

IV.2.4. Mécanismes de résistance

Les bactéries ont développé différents mécanismes afin de neutraliser l'action des agents antibactériens quatre mécanismes principaux sont responsables de la résistance aux antibiotiques.

IV.2.4.1. Inhibition enzymatique

Le micro-organisme produit une enzyme qui détruit ou inactive l'antibiotique. La production enzymatique peut être induite par un facteur externe (un antibiotique) ou constante (non affectée par des stimuli externes). On appelle inductible une résistance qui se produit à la suite d'une exposition à un agent d'une classe pharmacologique donnée et constitutive lorsque les gènes à l'origine de la résistance s'expriment en permanence, même en l'absence de tout antibiotique (Mandell et al., 2009 ; Lewis., 2009 ; Yamashita et al., 2000).

IV.2.4.2. Diminution de la perméabilité de la membrane

Une diminution de la perméabilité résulte souvent d'une mutation affectant la structure des porines ou diminuant la synthèse des porines. C'est chez *Escherichia coli*, les *Enterobacterspp*, les *Serratiaspp*, les *Klebsiellaspp*, et *Pseudomonas aeruginosa* que ce mécanisme a le plus d'importance, une ou plusieurs modifications des porines sont à l'origine d'une résistance acquise aux bêtalactamines, aux quinolones, au chloramphénicol, aux sulfamides, au triméthoprime et aux tétracyclines. Dans le cas des aminosides, l'imperméabilité résulte d'un mécanisme différent. Elle est due à des mutations modifiant le système de transport actif de ces molécules et provoquant une diminution d'activité de tous les aminosides (Mehdi., 2008).

IV.2.4.3. Modification de la cible

La cible de l'antibiotique peut être structurellement modifiée ou remplacée, de telle sorte que le composé antibactérien ne puisse plus se lier et exercer son activité au niveau de la bactérie. Ce mécanisme de résistance décrit pour presque tous les antibiotiques, est particulièrement pour les résistances aux pénicillines, aux glycopeptides, aux molécules du groupe MLS (macrolides, lincosamides, streptogramines) chez les bactéries Gram positives et pour les résistances aux quinolones chez les bactéries Gram positives et Gram négatives. Le remplacement de la cible de l'antibiotique est un mécanisme décrit pour les sulfamidés, les diaminopyrimidines (triméthoprimine) et les bêta-lactames dont les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (*SARM*) (Guardabassi et Courvalin., 2006 ; Alekshun et Levy, 2007 ; Nikaido., 2009).

IV.2.4.4. Efflux actif

L'élément bactérien responsable d'efflux actif est appelé « transporteur » ou « pompe » d'efflux. C'est un constituant de nature protéique enchâssé dans la membrane cytoplasmique et capable de limiter l'accumulation de certaines molécules substrats en les exportant activement en dehors de la cellule bactérienne (Julien., 2013).





MATERIEL
ET METHODES

I. Origine des souches bactériennes

Notre travail expérimental a été réalisé sur une collection de souches octroyées par notre encadreur le Dr Bousmaha-Marroki L. Ces souches sont originaires d'infections du pied diabétique (2019). Les patients étaient sujets à des infections chroniques de différents grades.

L'ensemble des expérimentations ont été réalisées au laboratoire de Microbiologie Appliquée du Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.

II. Enrichissement, isolement et purification des souches

Les souches étaient préalablement conservées dans du glycérol à une température de -4°C. L'enrichissement des souches est réalisé sur tube avec le bouillon nutritif (bacille Gram négatif) et le bouillon BHIB (cocci et bacille Gram positifs).

L'isolement et la purification sont réalisés par des repiquages successifs en alternant milieux liquide et solide. Les souches sont ensemencées par stries longitudinales selon la méthode des quadrants sur la gélose MacConkey pour les bacilles à Gram négatifs, gélose MRS ou M17 pour les bacilles Gram positifs et gélose Chapman pour les cocci Gram positifs.

III. Identification

L'identification des souches a été effectuée sur la base des caractéristiques morphologiques des colonies bactériennes ; des caractéristiques morphologiques ; du type de Gram des cellules bactériennes et du profil biochimique et physiologique des souches bactériennes.

III.1. Caractéristiques morphologiques des colonies bactériennes

Cette caractérisation est essentiellement basée sur une observation macroscopique des colonies après culture sur boîte de Pétri. Les caractères macroscopiques observés sont la couleur (blanche, crémeuse...), l'aspect (sec, brillant, rugueux), le relief (colonies bombées, plates, plissées) et le contour (arrondis ou lisse).

III.2. Caractéristiques morphologiques et type de Gram des cellules bactériennes

Cette caractérisation est basée sur une observation microscopique des cellules bactériennes après application de la coloration de Gram à un frottis de chaque souche. La morphologie de chaque souche est déterminée en associant les informations relatives à la taille, la forme (cocci ou bacille), et le type d'association (en grappe de raisin ou en chaînette).

La coloration de Gram permet de répartir des souches en deux groupes selon leurs propriétés pariétales. Le type de Gram bactérien ainsi déterminé est positif ou négatif. Cette coloration est effectuée selon les étapes suivantes :

- Préparer un frottis bactérien ;
- Recouvrir le frottis du violet de gentiane pour la coloration ; attendre 1 min et rincer avec de l'eau de distillée ;

- Recouvrir le frottis delugol pour la fixation de couleur ; attendre 1min et rincer avec de l'eau distillée ;
- Ajouter de l'alcool sur le frottis pour la décoloration ; attendre 30 secondes et rincer avec de l'eau distillée ;
- Recouvrir le frottis de fushine; attendre 1min puis rincer avec de l'eau distillée ;
- Sécher la lame puis observer à l'huile d'immersion (X100).

Les souches colorées en violet son Gram positifs et les souches colorées en rose sont dites Gram négatifs.

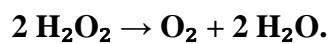
III.3.Caractérisation physiologique et biochimique

C'est un examen qui permet d'identifier une bactérie en se basant sur des caractères physiologiques et biochimiques, comme avec la galerie classique (TSI, Clark et Lubs, VF, citrate de Simmons...) ou avec la galerie API système.

III. 3.1 Identification par galerie biochimique classique

III.3.1.1. Test de catalase

La recherche de la catalase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram positif.La catalase est une enzyme qui permet la décomposition du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau :



La technique consiste à déposer un volume d'eau oxygéné ou d'eau physiologique stérile sur une lame stérile ; ensemencer une colonie bactérienne sur la lame et observer s'il y a formation de bulle d'air.

La formation de bulle d'air indique que la bactérie est à catalase positive et dans le cas contraire, elle est à catalase négative.

III.3.1.2.Mannitol-mobilité

Ce milieu permet d'étudier de la dégradation du mannitol par les bactéries et il est utilisé pour l'identification présomptive des entérobactéries fermentatives.

Il met également en évidence la mobilité de la bactérie.

La technique consiste à réaliser un ensemencement par pique centrale d'une colonie bactérienne à l'aide d'un fil droit sur le milieu mannitol-mobilité. Le tube est incubé à 37°C pendant 24H.

Un virage du milieu vers le jaune indique que la bactérie a fermenté le mannitol, donc mannitol positif. Si le milieu reste incolore, la bactérie n'a pas fermenté le mannitol et est donc à mannitol négatif

La diffusion des colonies bactériennes de part et d'autre dans le milieu nous montre que la bactérie est mobile : mobilité positive. L'absence de diffusion des colonies bactériennes dans le milieu indique que la bactérie est immobile : mobilité négative.

III. 3.1.3. Milieu TSI: saccharose, glucose et lactose

La gélose TSI est utilisée pour l'identification présomptive des entérobactéries capables de fermenter le saccharose, le glucose et le lactose.

La technique consiste à ensemencer une colonie bactérienne sur chaque milieu. La fermentation des trois sucres par les bactéries se traduit par un jaunissement du milieu.

III. 3.1.4. Milieu citrate de Simmons

C'est un milieu utilisé pour la différenciation des bacilles à gram négatifs. Il met en évidence les bactéries capables d'utiliser le citrate de Simmons comme seule source de carbone.

La technique consiste à réaliser un ensemencement par strie longitudinale d'une colonie bactérienne sur le milieu à l'aide d'une anse de platine

La fermentation du citrate de Simmons entraîne une acidification qui se traduit par une coloration bleue

III.3.1.5. Milieu Clark et Lubs

C'est un milieu qui permet de différencier les entérobactéries avec les réactions au rouge de méthyle et de Voges-Proskauer. La technique consiste à ensemencer une colonie bactérienne sur le milieu ; le tube est incubé à 37°C pendant 24H avant de passer aux tests de rouge de méthyle et de Voges-Proskauer

- Rouge de méthyle : après incubation, transvaser 2ml du milieu dans un autre tube et ajouter 2 à 3 gouttes du réactif de rouge de méthyle ; la présence de couleur rouge signifie que la bactérie est RM positif et si le milieu reste incolore la bactérie est RM négatif.
- Voges-Proskauer : après, transvaser 2ml du milieu dans un autre tube. Ajouter dans un premier temps 4 à 5 gouttes de réactif VP1 et dans un deuxième temps ajouter aussi 4 à 5 gouttes de réactif VP2 ; attendre quelques minutes pour la lecture. Un virage de couleur vers le rouge nous indique que la bactérie est VP positif et si le milieu reste incolore la bactérie est VP négatif.

III.3.1.6. Milieu viande-foie

C'est un milieu utilisé pour la détermination du type respiratoire des micro-organismes. La technique consiste à ensemencer une colonie bactérienne à l'aide d'une pipette pasteur scellée au fond du tube en faisant un mouvement en spirale en remontant. Le tube est incubé à l'étuve

à 37°C pendant 24H. Après incubation du tube, faire une observation pour déterminer le type respiratoire :

- Culture sur toute la hauteur : aéro-anaérobie facultatif ;
- Culture seulement en haut : aérobie stricte ;
- Culture limitée entre 0,5 et 1,5 cm du haut : micro-aérophile ;
- Culture seulement 1 cm au-dessous du haut : anaérobie-strict.

III.3.1.7. Milieu Kligler Hajna

Le milieu KliglerHajna est un milieu très complexe, qui permet la recherche de plusieurs caractères biochimiques. Il est très utilisé dans l'identification des entérobactéries et les caractères recherchés sont l'utilisation du glucose, l'utilisation du lactose, la production du sulfure d'hydrogène, la production de gaz et la recherche de la LDC. La technique consiste à ensemencer une colonie bactérienne sur le milieu à l'aide d'une anse de platine en réalisant des stries serrées sur la pente et une pique centrale au niveau du culot. Le tube est placé à l'étuve à 37°C pendant 24H. Après incubation nous pouvons déterminer :

● *La dégradation du glucose :*

- Culot rouge : bactérie glucose négatif
- Culot jaune : bactérie glucose positif

● *La dégradation du lactose :*

- Culot rouge : bactérie lactose négatif
- Culot jaune : bactérie lactose positif

● *La production de gaz :*

- Décollement de la gélose ou présence de bulles d'air : bactérie CO₂ positif
- Absence de décollement de la gélose ou de bulles d'air : bactérie CO₂ négatif

● *La production de sulfure d'hydrogène :*

- Précipité noir : bactérie H₂S positif
- Pas de précipité noir : bactérie H₂S négatif

III.3.2. Identification par les galeries Api

III.3.2.1. Api 20E

Le système Api 20E est utilisé pour l'identification des bactéries Gram négatif de la famille des Entérobactérie.

Préparation de la galerie

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, ensuite déposer aseptiquement la galerie dans la boîte d'incubation

Préparation de l'inoculum et inoculation

Préparer une suspension bactérienne avec une densité optique de 0,5 sur l'échelle Mac Farland. Introduire 100 µl de la suspension bactérienne dans les tubes sauf pour les tests CIT, VP et GEL où les cupules sontensemencées avec les tubes.

Pour les tests (ADH, LDC, ODC, H₂S et URE), ajouter de l'huile de paraffine et incuber la boîte à 24°C pendant 24h.

Lecture des résultats

Noter sur la fiche de résultat toutes réactions spontanées. Si le glucose est positif et/ou si trois tests ou plus sont positifs, révéler les tests nécessitant l'addition de réactif :

- **Test VP** : ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 min. Une couleur rose franche ou rouge indique une réaction positive.
- **Test TDA** : ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron foncée indique une réaction positive.
- **Test IND** : ajouter une goutte de réactif de covacs. Un anneau rouge obtenu en 2 min indique une réaction positive.

Identification

La détermination du code numérique sur la fiche de résultats est obtenue par la même méthode décrite pour l'API 20 E. Chercher le code numérique obtenu dans le catalogue analytique de l'API 20 Staph ou avec le logiciel d'identification afin de connaître le nom de l'espèce identifiée.

III.3.2.2. API 20 Strep

Cette microméthode est utilisée pour l'identification des streptocoques et entérocoques. La technique repose essentiellement sur 4 étapes :

Préparation de la galerie

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, ensuite déposer aseptiquement la galerie dans la boîte d'incubation.

Préparation de l'inoculum et inoculum de galerie

Ouvrir une ampoule de suspension medium ou un tube d'eau distillée stérile. Prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé. Réaliser une suspension bactérienne faible (opacité 0,5 sur l'échelle Mac Farland).

Remplir les tubules et les cupules des tests du type CIT. Remplir les tubules des tests du type ADH et remplir la cupule avec de l'huile de paraffine, pour créer l'anaérobiose. Remplir uniquement les tubules des tests restants

Lecture de la galerie API 20 Strep

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire après addition de réactifs aux tests suivants :

- **Test VP** : ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 min. Une couleur rose franche ou rouge indique une réaction positive.
- **Test HIP** : ajouter une goutte de réactif NIN, jusqu'à 10min. Une couleur bleu foncée /violet indique une réaction positive.
- **Test PAL (phosphatase alcaline)** : ajouter une goutte de réactif ZIM A et ZIM B. Attendre au minimum 10 min. Une couleur violette indique une réaction positive.

Identification

La détermination du code numérique sur la fiche de résultats est obtenue par la même méthode décrite pour l'API 20 E. Chercher le code numérique obtenu dans le catalogue analytique de l'API 20 Strep ou avec le logiciel d'identification afin de connaître le nom de l'espèce identifiée.

III.3.2.3. API 50CHL

Cette plaque Api est utilisée pour l'identification des lactobacilles et autres bacilles Gram positif selon les étapes ci-dessous.

Préparation de la galerie

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, ensuite déposer aseptiquement la galerie dans la boîte d'incubation

Préparation de l'inoculum et inoculation

Préparer une suspension bactérienne de densité optique 0,5 sur l'échelle Mac Farland. Inoculer 100 µl de la suspension bactérienne pour chaque tube et ajouter de l'huile de parafine pour chaque cupule. Incuber la boîte à 37°C pendant 24H

Lecture des résultats et Identification

Faire directement la lecture des résultats pour l'identification des souches, se référer à un tableau d'identification et à un catalogue analytique.

La détermination du code numérique sur la fiche de résultats est obtenue par la même méthode décrite pour l'API 20 E. Chercher le code numérique obtenu dans le catalogue analytique de l'API 50 CHL ou avec le logiciel d'identification afin de connaître le nom de l'espèce identifiée (Tableau (04) Annexe).

IV. Résistance et sensibilité aux antibiotiques

L'évaluation de la résistance ou sensibilité des souches vis-à-vis de divers antibiotiques est déterminé par la méthodes de l'antibiogramme et par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

IV.1. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une pipette pasteur quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Mettre les colonies isolées dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile. Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland

IV.2. Méthode de l'antibiogramme

La méthode classique de diffusion des disques d'antibiotiques en milieu Mueller-Hinton, dite d'antibiogramme, est effectuée selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie selon les étapes suivantes :

- Couler la gélose MH en boîtes de Pétri, laisser sécher et solidifier avant utilisation.
- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum préparé.
- Inoculer la surface de la gélose Mueller-Hinton en frottant l'écouvillon sur la totalité de la gélose de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération 2 fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon par la périphérie de la gélose
- Les disques sont déposés sur la gélose à l'aide d'une pince flambée, en appuyant doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu.
- Les boîtes sont ensuite laissées à la température ambiante pendant 30 minutes sur la paillasse pour permettre la diffusion de l'antibiotique dans la gélose
- L'incubation s'est faite à l'étuve à 37C° pendant 18 à 24 heures.

Nous avons utilisé les antibiotiques correspondant à chaque genre microbien selon les recommandations de l'EUCAST (2018). Le tableau ci-dessus donne les antibiotiques utilisés dans notre expérimentation. La mesure de l'halot d'inhibition de chaque antibiotique nous permet de classer les souches testées en trois catégories cliniques : Sensibles (S) ; Résistantes (R) ou Intermédiaires (I) vis-à-vis de chaque antibiotique testé.

Tableau 3 : Antibiotiques testées (EUCAST,).

Genres	Antibiotique	Sigle	Diamètres critiques (mm)	
			S ≥	R <
Enterococcus	Acide nalidixique	NA	14	14
	Vancomycine	VA	16	16
	Amoxicilline	AMX	19	19
	Pénicilline	P	21	21
	Acide fusidique	FA	24	24
	Oxacilline	OX	20	20
Aerococcus	Pénicilline	P	21	21
	Vancomicyne	VA	16	16
	Amoxicilline	AMX	15	15

	Vancomycine	VA	16	16
	Acide nalidixique	NA	19	14
Enterobacter	Amoxicilline	AMX	19	19
	Céfotaxime	CTX	20	17
	Acide nalidixique	NA	14	14
	Pénicilline	P	13	13
	Acide fusidique	FA	24	24
Serratia	Amoxicilline	AMX	19	19
	Céfotaxime	CTX	20	17
	Acide nalidixique	NA	14	14
	Pénicilline	P	13	13
	Acide fusidique	FA	24	24

IV.2. Détermination de la Concentration minimale Inhibitrice (CMI)

Nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice de la collection de souche vis-à-vis de deux antibiotiques : l'ampicilline et la vancomycine. Cette méthode est réalisée en microplaque à 96 puits stérile. Les principales étapes suivie pour la réalisation de ce test sont :

Préparation de la solution mère des antibiotiques à tester d'une concentration de 10240µg/ml.

Préparation des dilutions des antibiotiques à tester dans les puits de la microplaque avec des concentrations allant de 5120 µg/ml-10µg/ml.

Inoculer les puits de la microplaque avec les suspensions bactériennes préalablement préparées. Mettre les souches au contact des différentes concentrations d'antibiotiques. Incuber la microplaque à 37°C pendant 24h. Un puits témoin de la croissance positive exempt d'antibiotique est préparé pour chaque souche.

Après incubation de la microplaque, à l'aide d'une micropipette inoculer pour chaque dilution la gélose Muller Hinton par stries. Incuber la boîte à 37°C pendant 24h.

La sensibilité à l'antibiotique est confirmée par la présence ou l'absence de colonies sur boîte. La valeur de la CMI correspond à la concentration la plus faible qui inhibe la croissance d'une souche donnée de bactéries.



RESULTATS ET

DISCUSSION



I. Enrichissement, isolement et purification

Enrichissement

Nous avons effectué l'ensemble des expérimentations sur une collection de souche originaire de plaies infectées de patients diabétiques sujets à des lésions cutanées au niveau du pied : pied diabétique (2019). Les souches nous ont été octroyées par notre encadreur.

L'enrichissement des souches préalablement conservées dans du glycérol (-4°C) est réalisé dans le bouillon nutritif pour la culture des bactéries Gram négatives et le bouillon cœur cerveau pour la culture des bactéries Gram positives (Figures 07). Le Bouillon Cœur Cervele est un milieu riche utilisé pour la culture des germes exigeants notamment les bactéries gram positives. Le Bouillon Nutritif est un milieu largement utilisé pour la culture des micro- organismes peu exigeants, les bactéries gram négatives.



a) Résultats d'enrichissement sur le bouillon nutritif (BN)



b) Résultats d'enrichissement sur le bouillon cœur cerveau (BHIB)

Figure 12 : résultats d'enrichissement sur BN et BHIB après 24h d'incubation

La figure ci-dessus montre les résultats d'enrichissement sur le BN et le BHIB après 24h d'incubation. La totalité des résultats d'enrichissement à partir du BN et du BHIB s'est révélée positive après incubation. Donc croissance de bacille Gram négatif sur le BN, de cocci bacille Gram positifs sur le BHIB.

Notre résultat est le même que celui de **El Laoudj** (2017) où la totalité des résultats est positive après enrichissement des souches sur BN et BHIB dans une étude de l'évaluation de la diversité microbienne de la peau lésée chez les diabétiques.

I.2. Isolement et purification

Il s'agit d'un isolement de bacille Gram négatif sur la gélose Mac Conkey, de cocci Gram positif sur la gélose Chapman et de bacille Gram positif sur la gélose MRS et M17 (Tableau 02).

Tableau 4 : résultats d'isolement et de purification des isolats à partir des prélèvements du

Souches	Milieux de culture		
	Chapman	Mac conkey	MRS,M17
P2 E2 S5	ND	+	ND
P2 E2 S5-2	ND	+	ND
P2 E2 S5-1	ND	+	ND
P4 E1 S6	ND	+	ND
P4 E1 S2	+	ND	ND
P7 E1 S21	+	ND	ND
P1E1 S29	+	ND	ND
P8E1 S17	+	ND	ND
P2 E2 S13	ND	ND	+
P9 E2 S22	ND	ND	+
P5 E1 S20	ND	ND	+
P4 E2 S4	ND	ND	+
P9 E1 S27	ND	ND	+
P4 E1 S7	ND	ND	+
P7 E1 S21	ND	ND	+
P1 E1 S12	ND	ND	+

Légende : ND : Non déterminé ; (+) : présence de colonies sur boîtes

Sur le milieu Mac conkey, les bacilles Gram négatif se présentent en colonies rose ou rouge grâce à la fermentation de lactose (Lactose +), les autres bactéries (Lactose -), apparaissent incolore ou beige sur ce milieu (Figure)

Le milieu Chapman est un milieu sélectif des bactéries halophiles et plus particulièrement les bactéries fermentant le mannitol, tels que les *Staphylococcus aureus* dont les colonies apparaissent pigmentées typiquement en jaune doré, crémeuses et pouvant atteindre 1 à 2 mm de diamètre. En présence de mannitol, ces colonies sont entourées d'une auréole jaune indiquant la fermentation de ce dernier. Les staphylocoques blancs, quant à eux ne conduisent pas au virage du milieu de culture, vue l'absence de dégradation du mannitol (Figure).

La gélose MRS (deMan, Rogosa, Sharpe) est utilisée pour la culture des Lactobacilles. La sélectivité du milieu est uniquement assurée par son Ph acide. Il permet une poussée plus abondante de toutes les souches présumées d'être des lactobacilles. Généralement, les bactéries lactiques poussent tardivement en donnant de plus petites colonies que les autres microorganismes et ces colonies peuvent être rugueuses ou lisses ; elles sont petites, opaques et plus ou moins blanches (Figure).

La gélose M17 est utilisée pour la culture et l'isolement des espèces, comme *Lactococcus* spp, *Enterococcus* spp./*Streptococcus* spp. L'aspect macroscopique fait apparaître des colonies jaunes de grande taille sur le milieu. C'est un milieu d'identification des

lactobacilles.

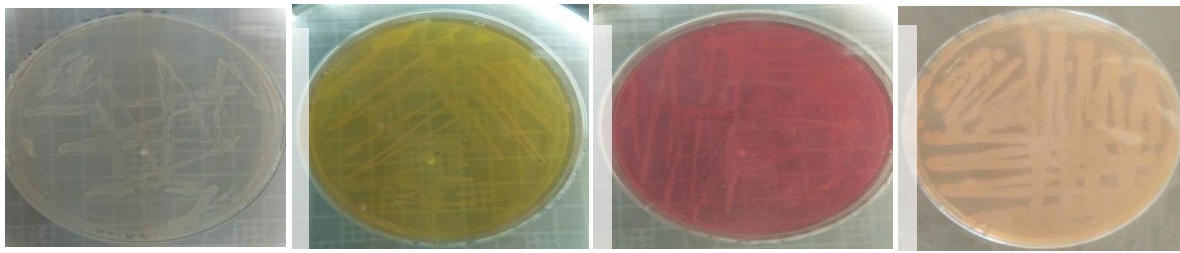


Figure 13 : résultats d'isolement des souches sur les milieux sélectifs

II. Caractères macroscopique et microscopique

Afin d'identifier les souches bactériennes nous avons procédé à un examen macroscopique des colonies, suivi par une observation microscopique des cellules après coloration de Gram. Le tableau 05 donne les aspects macroscopique et microscopique de chaque souche.

Tableau 5 : : aspects macroscopique et microscopique des isolats à partir des prélèvements du pied diabétique

Souches	Observation macroscopique	Observation microscopique
P1E1 S29	Colonies de petite taille, de couleur jaune, un aspect rugueux et le contour irrégulier	Cocci gram+, en mono ; diplo ; en chaînette et amas
P8E1 S17	Colonies de petite taille, de couleur jaune avec un aspect sec	Cocci gram+, en chaînette
P7E1 S21	Colonies de taille moyenne, de couleur blanche, un aspect sec, le relief plissé et le contour arrondi	bacille gram+, en chaînette
P4E1 S2	Virage de couleur milieu vers le jaune, colonies jaunes de taille petite avec pigmentation et le contour arrondi	Cocci gram+, en chaînette et en amas
P1E2 S5	Colonies de grande taille, de couleur crémeuse avec un aspect rugueux	Bacille gram-, en mono et en chaînette
P4E1 S6(2)	Colonies crémeuses de petite taille, plates, brillantes et arrondies	Bacille gram-, en chaînette
P1E2 S5(1)	Colonies crémeuses de grande taille, sec, plissées et de contour irrégulier	Bacille gram-, en chaînette
P1E2 S5(2)(1)JJ-R	Colonies crémeuses de taille moyenne, rugueuses, plissées et irrégulières	Bacille gram-, en chaînette
P4E1 S6	Colonies de taille petite, brillantes, crémeuses et arrondies	Bacille gram-, en chaînette
P4E1 S7	Colonies de taille très petite, blanchâtres avec un contour arrondi	Bacille gram+, en mono et diplo

P7E1S21'	Virage de couleur du milieu vers le jaune, colonies de très petite taille, de couleur jaune avec un aspect rugueux	cocci gram+, en mono ; diplo et en chaînette
P4E2 S4	Colonies de taille moyenne, crémeuses, rugueuses et de contour régulier	Bacille gram+, de petite taille en amas
P9E1 S27	Colonies blanches de taille petite, un contour arrondi et un relief plissé	Bacille gram+, de petite taille, en chaînette et en amas
P1E1 S12	Colonies blanches de grande taille, brillantes avec le contour irrégulier	Bacille gram+, de petite taille en mono ; en diplo et en chaînette
P9E2 S29	Colonies de petite taille, crémeuses, sec avec un contour régulier	Bacille gram+, de petite taille, en mono ; diplo ; en chaînette et en amas
P5E1 S20	Colonies de taille très petite, crémeuses, rugueuses avec le contour arrondi	Bacille gram+, en chaînette et en amas
P2E2 S13	Colonies de grande taille, de couleur blanche avec une pigmentation, un aspect sec et un contour irrégulier	Bacille gram+, de petite taille et en chaînette

La figure 14 montre l'aspect macroscopique des colonies dans le milieu Mac conkey avec une couleur crémeuse de grande taille et microscopique : bacille gram négatif



Figure 14 : aspects macroscopique et microscopique des Enterobacteriaceae

La figure 15 montre l'aspect macroscopique des colonies de bactérie dans le milieu MRS avec une couleur blanche de petite taille, et microscopique : bacille gram positif



Figure 15 : aspects macroscopique et microscopique de Lactobacillus ssp

La figure 16 montre l'aspect macroscopique des colonies de bactérie dans le milieu M17 avec une couleur blanchâtre, bombée et de forme irrégulière, et microscopique : bacille Gram positif



Figure 16 : Aspects macroscopique et microscopique de *Bacillus* spp

La figure 17 montre l'aspect macroscopique des colonies de bactérie dans le milieu Chapman avec une couleur jaune de colonies, de très petite taille, et microscopique : cocci gram positif



Figure 17 : aspects macroscopique et microscopique d'*Enterococcus* spp

Nos résultats sont proches de ceux de El Aoudj (2017) où les *S. aureus* dont les colonies apparaissent pigmentées typiquement en jaune doré, crémeuses et pouvant atteindre 1 à 2 mm de diamètre. En présence de mannitol, ces colonies sont entourées d'une auréole jaune indiquant la fermentation de ce dernier. Les staphylocoques blancs, quant à eux ne conduisent pas au virage du milieu de culture (mannitol négatif).

II.2. Répartition selon le type de Gram

L'examen direct après coloration de Gram montre la prédominance des souches à bacille gram positive avec un pourcentage de 54% suivie par 31% de cocci gram positif et vient en dernière position les bacilles Gram négatif avec un pourcentage de 15% (Figure)

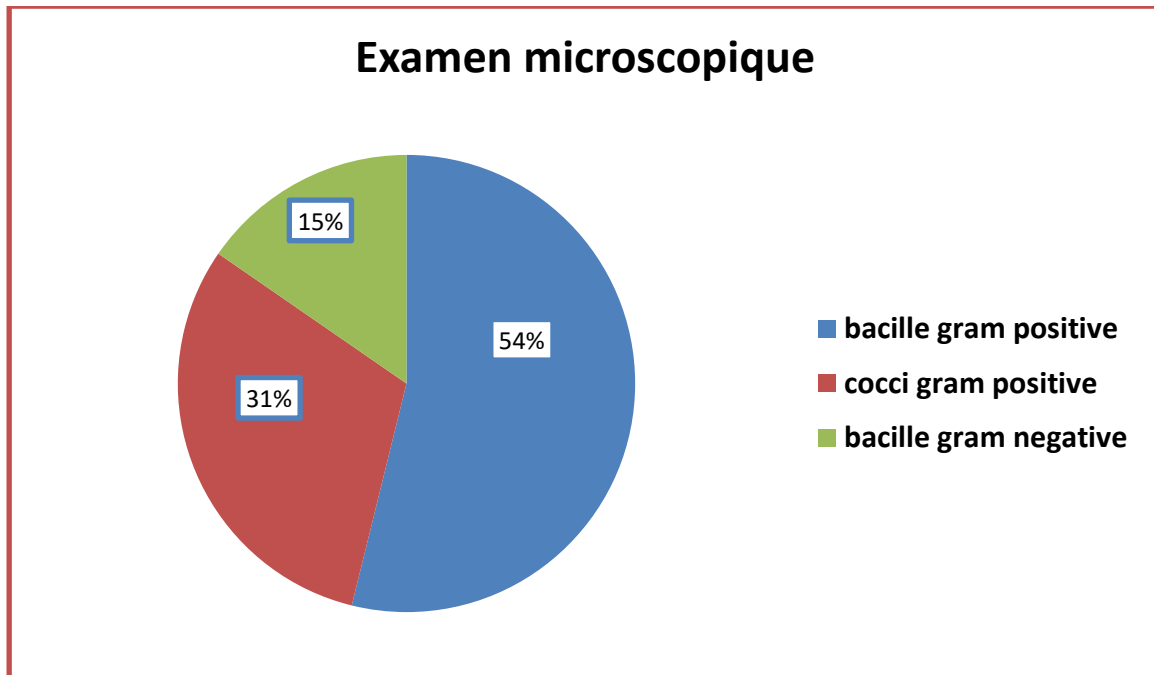


Figure 18 : : répartition des souches originaires de plaies de diabétiques selon le type de Gram.

Nos résultats sont proches de ceux de **Gasmi**, 2018 où les bactéries Gram positif occupent la première place avec 86% chez les patients et 80% dans l'environnement, alors que les pourcentages des bactéries Gram négatif isolées des patients et de l'environnement sont de 14% et 20% respectivement. La prédominance des bactéries Gram positif dans les infections du pied diabétique a aussi été signalé par **Dezfulian et al.**, 2011 et **Kavitha et al.**, 2014. Cependant, **Nata Pratama et al.**, 2015 et **Djahmi et al.**, 2013 signalent la prédominance des bactéries Gram négatif dans ces infections. Cette différence de résultats peut être expliquée par des facteurs climatiques, géographiques, d'hygiène personnelle ou par les techniques utilisées pour le prélèvement (**Uçkay et al.**, 2013).

II. Identification physiologique et biochimique

Test de catalase

La catalase est un caractère quasi-constant chez les staphylocoques. La mise en évidence de la catalase permet de distinguer parmi les cocci à Gram positif les staphylocoques et les streptocoques. Les Streptocoques et les Entérocoques n'ont pas d'enzyme catalase, ils sont catalase -. La détection de la présence de la catalase chez les bactéries est essentielle pour différencier les *Staphylococcaceae* et *Micrococcaceae* catalase-positives des *Streptococcaceae* catalase-négatives. Bien qu'elle soit principalement utile pour différencier entre ces genres, il est également utile dans la distinction entre les espèces appartenant au même genre comme *A. urinae* (catalase positif) et *A. viridians* (catalase négatif) et des organismes gram négatifs comme *C. fetus*, *C. jejuni* et *C. coli* (catalase positif) d'autres espèces de *Campylobacter* (catalase négatif).

Le test de catalase est également utile pour différencier entre les bactéries aérobies et anaérobies obligatoires, car ces derniers sont généralement dépourvus de l'enzyme. Dans ce contexte, le test de catalase sert également à différencier les souches aérotolérantes de *Clostridium*, qui sont catalase négatives, de *Bacillus*, qui est catalase positive.

Le test de catalase différencie les bacilles Gram positifs au niveau du genre : les *Bacillus* spp, *Corynebacterium* spp, *Listeria* spp sont de catalases positives et les *Lactobacillus* spp, sont de catalases négatives.

Les bacilles Gram- de la famille des Enterobacteriaceae présentent l'enzyme de catalase.

Par la faite de l'importance taxonomique du test de catalase, nous avons y avons soumis toutes les souches. Si elles (bactéries) possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles

Tableau 6 : résultats de test catalase à partir des isolats du pied diabétiques

Souches	Catalase	Type de Gram
P1E1 S12	+	Bacille Gram +
P9E1 S27	+	Bacille Gram +
P2E2 S13	+	Bacille Gram +
P9E2 S29	-	Cocci Gram +
P7E1 S21	+	Bacille Gram +
P4E2 S4	-	Bacille Gram +
P4E1 S2	-	Cocci Gram +
P7E1 S21'	+	Cocci Gram +
P8E1 S17	-	Cocci Gram +
P1E2 S5-2	+	Bacille Gram -
P1E2 S5-1	+	Bacille Gram -
P1E2 S5	+	Bacille Gram -
P4E1 S6	+	Bacille Gram -
P5E1 S20	-	Bacille Gram +
P4E1 S7	-	Bacille Gram +

Les ensemble des bacilles Gram négatifs de la famille des Enterobacteriaceae isolées sur milieu Mac conkey ont une catalase positive. Nos résultats sont proches de ceux de Sharma, 2010 où les bacilles aérobies à Gram négatif sont isolés des prélèvements du pied diabétique. Il s'agit essentiellement d'entérobactéries (*P. mirabilis*, *E. coli*, *Klebsiella* spp, *Serratia* spp, *Citrobacter* spp) à catalase positives rencontrées en cas d'infections chroniques ou déjà traitées par des antibiotiques. Parmi les 05 souches de bacilles Gram positifs isolées des pieds infectés, 04 sont de catalase négatives et 01 de catalase positive. Les *Enterococcus*, *Aerococcus* et *Streptococcus* spp. Ne possèdent pas d'enzyme de catalase sauf *S. aureus* qui a une enzyme de catalase.

Nos résultats sont proches de ceux de Bagnoli et al. (2017) où le staphylocoque est un des pathogènes bactériens les plus importants dans la pratique clinique. L'espèce *S. aureus* se distingue généralement des autres staphylocoques appelés staphylocoques à coagulas négative (SCN) par la présence d'une coagulase. *S. aureus* a un potentiel de pathogénicité très important et est responsable aussi bien d'infections communautaires que nosocomiales par opposition, les SCN sont en règle générale des bactéries opportunistes essentiellement responsables d'infections nosocomiales.

Parmi les 07 souches de bacilles Gram positifs isolées des pieds infectés à partir de MRS et M17, 04 sont de catalase positives et 03 de catalase négative. Les *Lactobacillus* spp n'ont pas d'enzyme de catalase contrairement aux autres bacilles Gram positif testés. Nos résultats sont proches de ceux de Sharma, 2010 où ils ont trouvé des bactéries anaérobies strictes à catalase positives souvent associées à des bactéries aérobies à catalase négatives au niveau des plaies du pied diabétique. Leur proportion dépend de la technique de prélèvement, du transport des échantillons et des méthodes de culture utilisées. Les bactéries anaérobies strictes à Gram positif sont en règle présentes dans les plaies peu profondes. La figure ci-dessous montre la prédominance des souches à catalase positive avec un pourcentage de 70 %. La prédominance Catalase positif tel les *Staphylocoques* dans les infections du pied diabétique, suivis des *Streptocoques* et enfin les *Entérocoques* a aussi été constatée dans les travaux de Richard et al., 2010 qui montrent qu'à partir de 210 souches isolées, 54% sont des *S. aureus*, 22% sont des streptocoques et 13% sont des *Entérocoques*. Djahmi et al., (2013) ont aussi décrit que les catalases positives dont le *S. aureus* était la bactérie la plus isolée parmi les cocci de Gram positif dans une étude sur une population algérienne. Nos résultats sont proches de ceux de Kadik et Abed, 2019 où 61.54 % catalase positive et 38.46 % sont catalase négative.

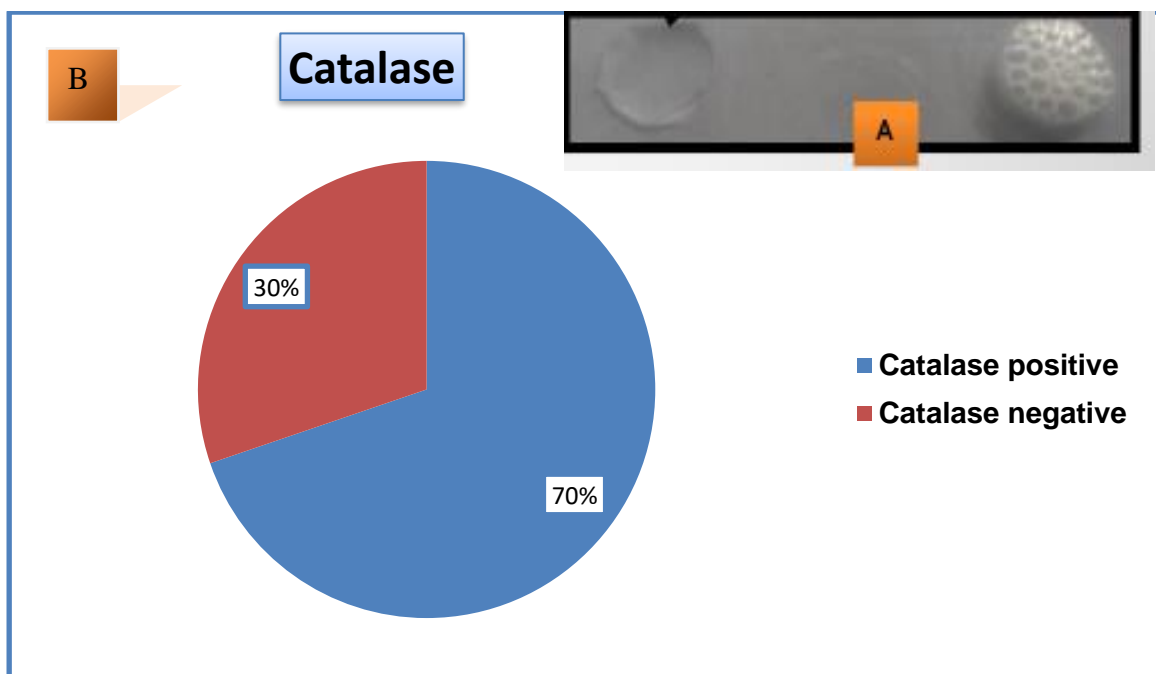


Figure 19 : Résultat du test de catalase. A : lecture du test de catalase ; B : répartition des souches selon le test de catalase

III.2. Type respiratoire sur milieu viande-foie

Le milieu viande foie est un milieu de culture. Il est principalement utilisé en tube profond pour la détermination du type respiratoire des micro-organismes, mais aussi pour la culture de germes anaérobies stricts tels que les Clostridium. Il permet également la mise en évidence de la production de Gaz et la production de H₂S.

L'étude du type respiratoire d'une bactérie (est-à-dire ses rapports avec le dioxygène) nécessite un milieu de culture riche contenant un gradient de pression partielle en dioxygène.

- Type Aérobie strict : culture seulement en présence de dioxygène
- Type aéro-anaérobie : culture en présence et en absence de dioxygène. La technique utilisée ne permet pas de différencier entre les bactéries aéro-anaérobie facultatives et les bactéries anaérobies aéro-tolérantes. On conclut type aéro-anaérobie.
- Type anaérobie strict : culture uniquement en l'absence de dioxygène.
- Type micro-aérophile : culture seulement dans une zone de pression faible en dioxygène

Les bacilles Gram positifs sont différenciés par le type respiratoire au niveau du genre pour les bactéries capables de sporuler : Bacillus spp qui est aéro-anaérobie facultatif et Clostridium spp qui est anaérobie stricte. Le type respiratoire permet de différencier les entérobactéries des autres bacilles Gram négatifs. Les entérobactéries impliquées dans les infections du pied diabétique sont en générales aéro-anaérobie facultatifs : E. coli, S. liquefaciens, E. cloaceae...

Le type respiratoire différencie les Streptococcus/Enterococcus des S. aureus. Les Streptococcus/Entérocooccus de catalase négatives isolées dans les infections du pied diabétique sont anaérobie-strictes et les S. aureus sont aéro-anaérobie facultatives avec une catalase positive.

La figure 23 nous montre une croissance sur toute la hauteur pour les souches aéro- anaérobie facultatives, noircissement de milieu pour les souches productrices d'hydroxyde de sulfure ou capables de sporuler et un décollement de la gélose pour les souches productrices de gaz. La totalité des souches ont un métabolisme aéro- anaérobie facultatif. La production de Gaz et H₂S de chaque souche est donnée dans le tableau ...

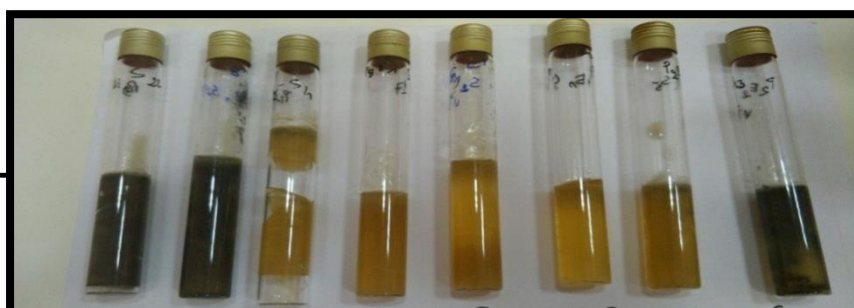


Figure 20 : résultats de test type respiratoire

IV.1.2 Mannitol-mobilité

Le milieu mannitol-mobilité permet de déceler la dégradation du mannitol et la mobilité chez les bacilles. La fermentation du mannitol se traduit par un virage de couleur du rouge au jaune. La présence des bactéries au-delà de l'axe central signifie qu'elles sont mobiles ; cependant leur présence uniquement au niveau de la piqûre centrale signifie qu'elles sont immobiles. La figure 24 montre un virage de couleur du milieu vers le jaune pour les souches capables de dégrader le mannitol et une diffusion des bactéries dans le milieu pour les souches mobiles. Nous avons constaté que toutes les souches de bacilles dégradant le mannitol est de 100%, tandis que 56% des souches sont mobiles et 44% sont non mobiles (Figure 25).

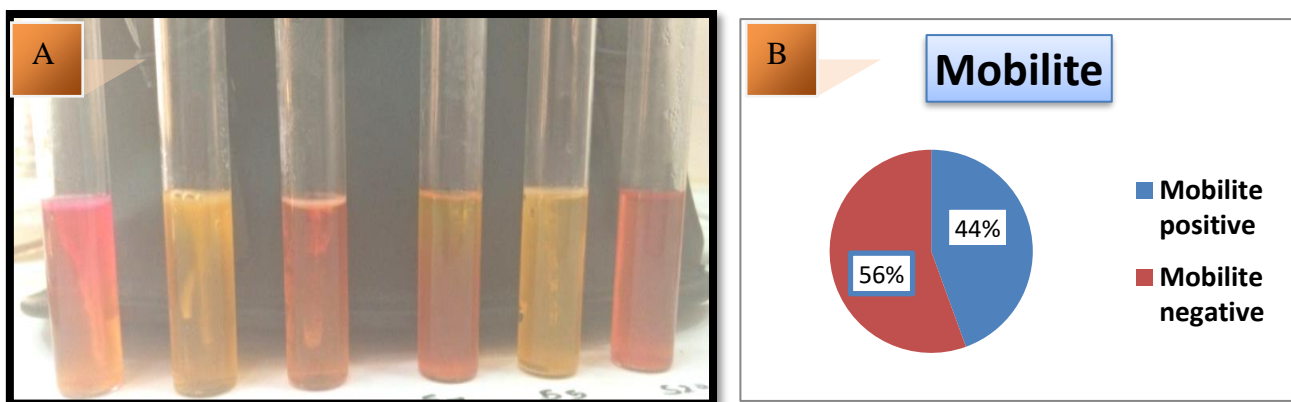


Figure 20 : Résultats du test mannitol mobilité. A : dégradation du mannitol et diffusion à partir de la piqûre centrale. B : répartition des souches selon leur mobilité.

III.4. Galerie classique

III.4.1. Fermentation des sucres (glucose , lactose , saccharose) TSI

Le milieu Triple-Sugar-Iron est un milieu d'identification rapide pour les entérobactéries, permet de mettre en évidence la fermentation du glucose (avec ou sans dégagement gazeux),

du lactose, du saccharose et la production de H₂S. La pente du milieu TSI estensemencée par stries et le culot par piqure centrale. Après, une incubation à 37C° pendant 18 heures.

- Le virage du culot au jaune traduit la fermentation du glucose ;
- La présence de bulles de gaz signifie la fermentation avec production du gaz ;
- Le virage de la pente au jaune traduit l'utilisation du lactose ou saccharose ou les deux à la fois ;
- Une coloration noire, signifie la production d'hydrogène sulfuré(H₂S).

La figure 25 montre un virage de couleur du milieu vers le jaune pour les souches capables de dégrader le saccharose, le glucose et le lactose



Figure 21 : résultats de dégradations A) Glucose, B) Saccharose et C) Lactose après 24h d'incubation

La figure ci-dessous montre que 54% des souches isolées ont la capacité de fermenter le glucose avec un pourcentage de production d'H₂S de 23% . 23% des souches ne fermentent pas le glucose. La majorité des souches ne dégradent pas le lactose, 62% pour lactose positif et 38% pour lactose négatif. La majorité des souches ne dégradent pas le lactose, 62% pour lactose positif et 38% pour lactose négatif.

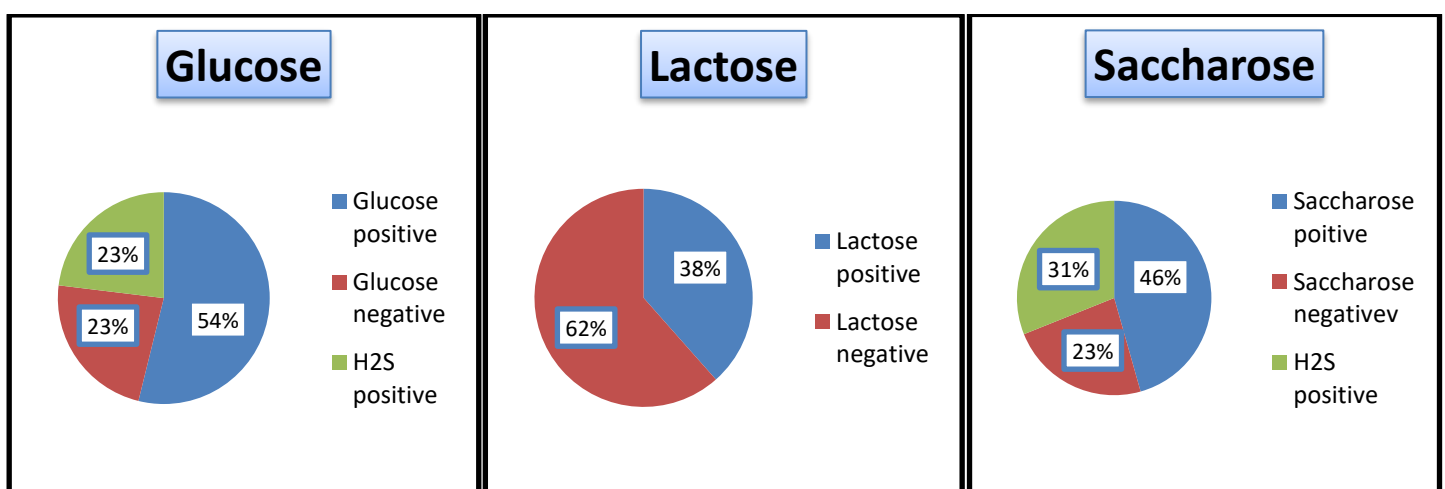


Figure 22 : Répartition des souches selon le test de la fermentation des sucres

D'après Gasmi, 2018 le test au TSI a permis d'identifier particulièrement les entérobactéries capables de fermenter le glucose, le saccharose et le lactose. Les bacilles non fermentaires (*Pseudomonas* /*Acinetobacter*) ne fermentent pas les sucres (glucose, lactose, saccharose).

D'après Rounek (2018) les Entérobactéries fermentent les sucres (glucose, lactose, saccharose) avec production de gaz et de l' H_2S chez certaines espèces.

III.4.2. Citrate de Simmons

Ce milieu est un exemple de milieu synthétique, est à dire de milieu dont la composition, qui est complexe, est connue exactement tant qualitativement que quantitativement. La pente du milieu Citrate de Simmons estensemencée avec une strie sur toute la surface. Incubation à 37°C, pendant 18 heures. Une réaction positive (utilisation de citrate) se traduit par une alcalinisation du milieu en le faisant virer au bleu.

La figure 26 nous montre un virage de couleur du milieu vers le bleu pour les souches capables d'utiliser le citrate comme seule source de carbone. Notre résultat montre la capacité de certaines souches à utiliser le citrate comme source de carbone avec un pourcentage très faible de 23%, avec la prédominance à 77% des souche non qui ne dégrade pas le citrate.

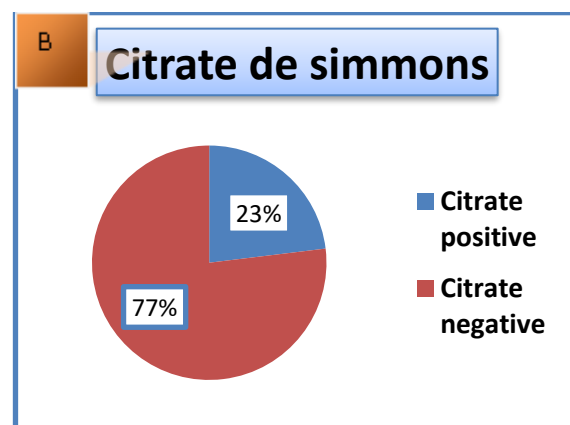
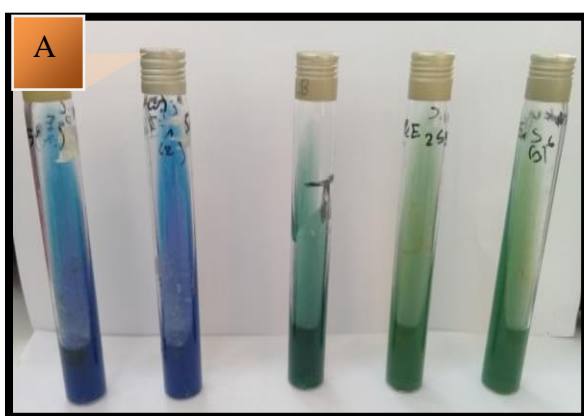


Figure 23 : Résultats du test citrate de Simmons. A : lecture des résultats après 24h d'incubation ; B : Répartition des souches selon l'utilisation de citrate

Nos résultats sont un peu proche de ceux de Kadik et Abed (2019) où certaines souches ont utilisé le citrate comme seule source de carbone. D'après Gasmi, 2018 le test au test de citrate a permis d'identifier particulièrement les entérobactéries des autres bacilles Gram négatifs ayant la capacité d'utiliser le citrate comme seule source de carbone.

IV.1.5 Test Kligler Hajna

Le milieu de Hajna-Kligler est un milieu complexe, qui permet la recherche de plusieurs caractères biochimiques (utilisation du glucose, utilisation du lactose, production H₂S , production de gaz , recherche de la LDC) . Il est très utilisé dans l'identification des Enterobacteriaceae.

La figure 27 nous montre un virage de couleur du milieu vers le jaune (culot et pente), et un décollement de la gélose du milieu pour les souches capables de dégrader les sucres (glucose et lactose) et de produire du gaz. 54 % des souches isolées fermentent le lactose, glucose avec production de gaz (CO₂), et 46 % des souches fermentent le lactose, le glucose sans production de gaz.

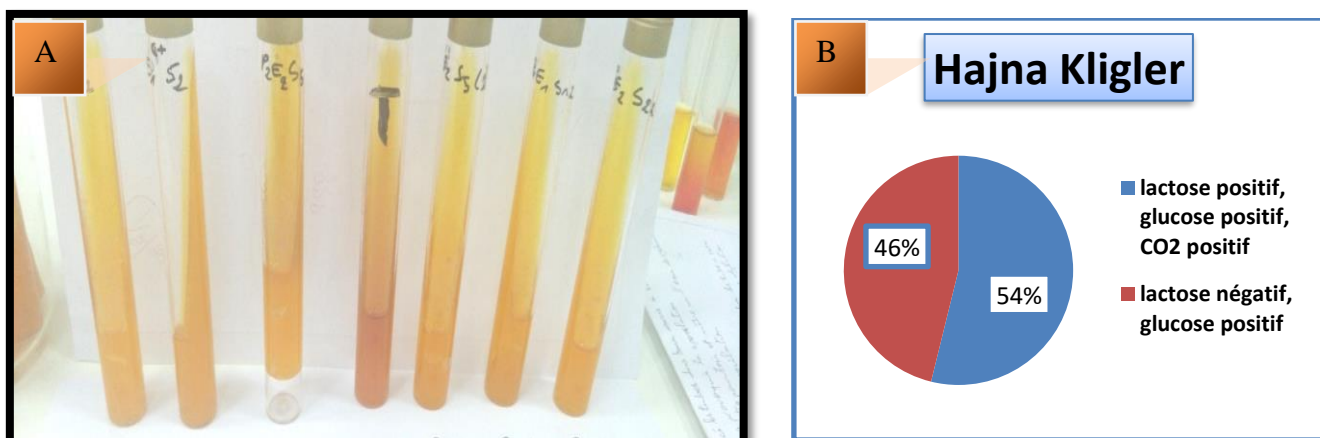


Figure 24 : Résultats du test Kligler Hajna. A : lecture après 24 h ; B : Répartition des souches selon la dégradation des sucres

IV.1.6.1 test voie de fermentation de glucose (test RM et VP) Clark et Lubs

Le milieu de Clark et Lubs permet l'étude des produits de fermentation du glucose et la différenciation entre les fermentations « acides mixtes » et « butylène glycolique ». A partir du test VP, 100% des souches qui se révèlent positives. On voit que dans la figure que juste 38% des souches peuvent faire de la production d'acétoïne (ou 3-hydroxy-butanone) au cours de la fermentation butylène glycolique : en présence d'une base forte (soude ou potasse) l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné, et une prédominance à 62% ne peuvent pas de faire de la production d'acétoïne au cours de la fermentation butylène glycolique.

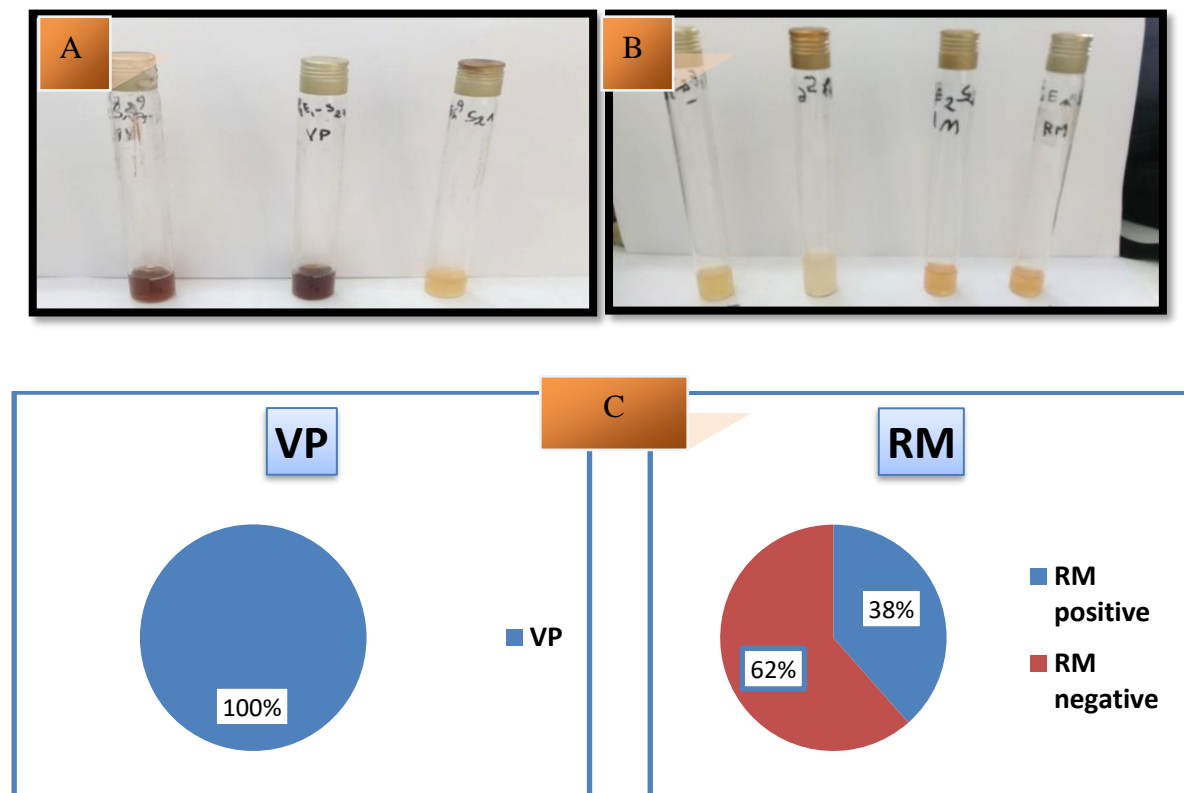


Figure 25 : résultat de la voie de fermentation du glucose. A : lecture du test RM ; B : lecture du test VP ; C : répartition de la production d'acétoïne par fermentation butylène glycolique.

III. 5. Interprétation du résultat des tests physiologique et biochimique de la galerie classique

l'identification biochimique est un examen qui permet d'identifier une bactérie en appuyant sur ces caractères biochimiques. Les galeries d'identification biochimique permettent une identification rapide des bactéries grâce à différents tests tels que : RM, TSI, VF, Mannitol-mobilité, catalase, Hajna-Kligler et Citrate de Simmons (Tableau)



Tableau 7 : interprétation des résultats de la galerie classique

SOUCHE	Type respiratoire (VF)	Dégradation Gluc, lact, sac(TSI)			Dégrd du citrate	Dégradationde lactose,glucose) kligler Hajna)	Type fermentaire Clark et lubs (VP et RM)	Mannitol-mobilité	Genres
		GLU	LAC	SAC					
P9E2 S29	Aéro-anaérobie facultatif ; Co2+	+	+	+	-	Lac+ Gluc+ Co2+	VP+ RM-	Man + Mbl +	Lactococcus spp
P4E1 S7	Aéro-anaérobie facultatif	+	+	+	-	Lac+ Gluc+	VP+ RM+		Bacillus spp
P4E1 S6	Aéro-anaérobie facultatif ; Co2+	+	+	+	-	Lac+ Gluc+ Co2+	VP+ RM+	Man+ Mbl+	<i>Serratia spp</i>
P9E1 S27	H2S+ Co2+	-	+	-	-	Lac+ Gluc+ Co2+	VP+ RM+	Man- Mbl-	Bacillus spp

P5E1 S20	Aéro-anaérobie facultatif	+	+	+	-	Lac+ Gluc+	VP+ RM+	Man- Mbl-	Bacillus spp
P2E2 S5	Aéro-anaérobie facultatif	+	+	+	-	Lac+ Gluc+	VP+ RM-	Man+ Mbl-	<i>Enterobacter spp</i>
P2E2 S5(2)(1)JJ-R	Aéro-anaérobie facultatif Co2+	+	+	+	-	Lac+ Gluc+ Co2+	VP+ RM-	Man+ Mbl+	<i>Enterobacter spp</i>
P2E2 S13	H2S+	+	+	+	-	Lac+ Gluc+	VP+ RM+	Man+ Mbl-	Bacillus spp
P4E2 S4	Aéro-anaérobie facultatif ; Co2+	+	+	+	-	Lac+ Gluc+ Co2+	VP+ RM+	Man+ Mbl+	Bacillus spp
P1E1 S12	H2S+ Co2+	+	+	+	-	Lac+ Gluc+ Co2+	VP+ RM-	Man+ Mbl+	Bacillus spp
P2E2 S5(1)	Aéro-anaérobie facultatif ; Co2+	+	+	+	-	Lac+ Gluc+ Co2+	VP+ RM-	Man+ Mbl+	<i>Enterobacter spp</i>
P7E1 S21	Aéro-anaérobie facultatif	+	+	+	+	Lac+ Gluc+	VP+ RM+	Man+ Mbl-	Streptococcus spp
P4E1 S2	Aéro-anaérobie facultatif	+	+	+	-	Lac+ Gluc+	VP+ RM+		Streptococcus spp
P8E1 S17	Aéro-anaérobie facultatif	+	-	+	-	lac- Gluc+	VP+ RM-		Streptococcus spp



IV.2 Galerie api

IV.2.1 api 20E

La figure ci-dessous montre les caractères biochimiques, avec la galerie api 20e comme résultats : H2S-, URE-, TDA-, INO- pour **Serratia liquefaciens**



ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

Figure 26 : : caractères biochimiques de Serratia liquefaciens selon la galerie API 20 E

Tableau 8 : interprétation des résultats de la gaelrie api 20e de Serratia lliquefaciens

Nos résultats sont un peu proches de Kadik et Abed, 2019 où E. sakazaki sur api 20e donne

les caractères suivants : ODC, ADH, URE, VP positifs et ONPG, LDC, CIT, ARA négatifs.

La figure ci-dessous montre les caractères biochimiques, avec la galerie api 20e comme résultats : H2S-, URE-, TDA-, INO- pour d'Enterobacter cloaceae

La figure ci-dessous montre les caractères biochimiques, avec la galerie api 20e comme résultats : H2S-, URE-, TDA-, INO- pour **d'Enterobacter cloaceae**



ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+

Figure 27 : caractères biochimiques d'Enterobacter cloaceae selon la galerie API 20 E

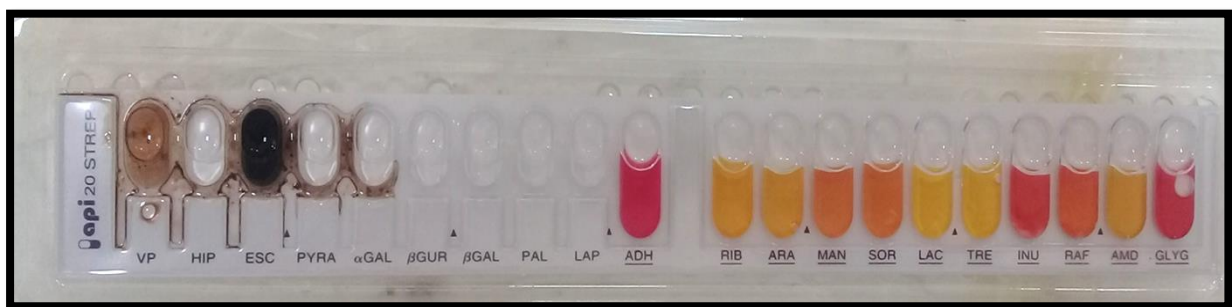
Tableau 9 : interprétation des résultats de la galerie api20e d'Enterobacter cloaceae

Nos résultats sont proches de Kadik, 2019 où B. megaterium sur api 20e donne les caractères

Suivants : H2S, URE positifs et ONPG, ADH, LDC, ODC, CIT, VP, AMY négatifs

IV.2.2 API 20Strept

La figure ci-dessous montre les caractères biochimiques, avec la galerie api 20Strept comme résultats : HIP- ; PYRA- ; alpha GAL- ; Beta GUR- ; Beta GAL- ; PAL- ; LAP- ; INU- ; RAF- ; GLYG- ; MAN- ; SOR- pour **Enterococcus durans**



vp	HIP	ESC	PYRA	αGAL	βGUR	βGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG
+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-

Figure 28 : caractères biochimiques d'Enterococcus durans selon la galerie API 20 Strept

Tableau 10 : interprétation des résultats de la galerie api 20Strept d'Enterococcus durans

Nos résultats sont proches de Kadik, 2019 où E. faecalis sur api 20Strept donne les caractères

suivants : ARA, SOR, LAP, PAL négatifs et ADH, RIB, ESC positifs

La figure ci-dessous montre les caractères biochimiques, avec la galerie api 20Strept comme résultats :HP- ; PYRA- ; Alpha GAL-, Beta GUR-, Beta GAL-, PAL-, LAP-, MAN-, Sor-, INU- ; RAF- ; GLYG- pour **Aerococcus viridans 1**



VP	HP	ESC	PYRA	α Gal	β Gur	β Gal	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG
+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-

Figure 29 : caractères biochimiques d’Aerococcus viridans 1 selon la galérie API 20 Strept

Tableau 11 : interprétation des résultats de la galérie api 20Strept d’Aerococcus viridans I

Nos résultats sont proches de Kadik, 2019 où E. faecalis sur api 20Strep donne les caractères suivants : ARA, SOR, LAP, PAL négatifs et ADH, RIB, ESC positifs

La figure ci-dessous montre les caractères biochimiques, avec la galérie api 20Strep comme résultats : HP- ; PYRA- ;Beta GUR- ;Alpha Gal- ; LAP- ; PAL- ; Beta Gal- ; INU- ; RAF- ; GLYG- ; MAN- ; SOR- pour **d’Enterococcus faecalis**



VP	HP	ESC	PYRA	α Gal	β Gur	β Gal	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG
+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-

Figure 30 : caractères biochimiques d’Enterococcus faecalis selon la galérie api 20Strept

Tableau 12 : interprétation des résultats de la galérie api 20Strep d’Enterococcus faecalis

Nos résultats sont proches de Kadik, 2019 où E. faecalis sur api 20Strep donne les caractères suivants : HP- ; PYRA- ;Beta GUR- ;Alpha Gal- ; LAP- ; PAL- ; Beta Gal- ; INU- ; RAF- ; GLYG- ; MAN- ; SOR-

IV.2.3 API 50CHL

La galérie Api 50 CH est utilisée pour déterminer le profil de fermentation de souches de bactéries lactique.Cette galérie combinée est constituée de 50 microtubes qui contiennent différents substrats carbonés et un indicateur de pH, le bromocrésol pourpre. Les microtubes sont présentent

Résultats et discussion

deux parties, un tube et une cupule. Les tubes sont remplis avec le milieu API 50 CHL Medium inoculé par la souche à tester. La cupule est remplie d'huile de paraffine stérile. L'incubation à 30 °C dure 24 h à 48 h. Un test positif se traduit par le virage au jaune de la couleur du tube qui témoigne de l'acidification du milieu après 24 et/ou 48 h d'incubation. Les figures ci-dessous montrent les caractères biochimiques de bacilles Gram positifs à partir de la galerie api 50CH

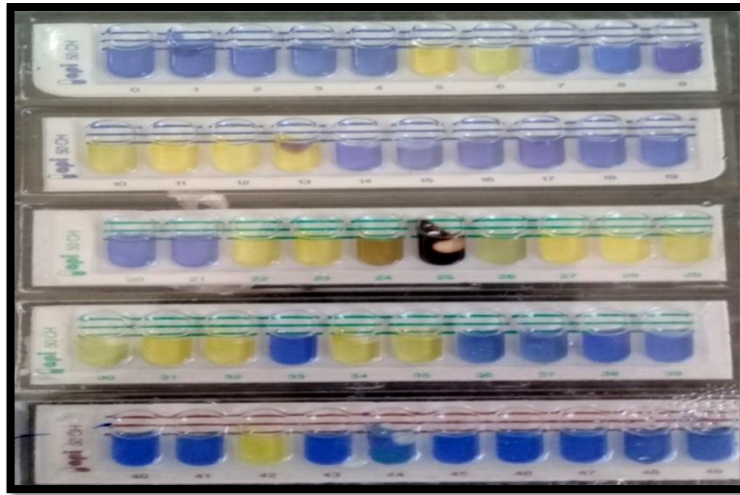


Figure 31 : caractères biochimiques de *Lactobacillus* spp, sur la galerie api 50CHL

Tableau 13 : interprétation des résultats de galerie api 50CHL

Tests	Caractères	P4E1S7	P2E2 S13	P1E1 S12
0	.Temoin	-		
1	Glycerol	-	-	-
2	Erythritol	+	+	+
3	D-Arabinose	-	-	-
4	L-Arabinose	-	-	+
5	D-Ribose	+	+	+
6	D-Xylose	+	+	+
7	L-Xylose	-	+	+
8	D-Adonitol	-	-	-
9	Methyl-βD-	+	+	-
10	D-Galactose	-	-	-
11	D-Glucose	+	+	+
12	D-Fructose	+	+	+
13	D-Mannose	+	+	+
14	L-Sorbose	+	+	+
15	L-Rhamnose	+	-	-
16	Dulcitol	-	+	+
17	Inositol	-	-	+
18	D-Mannitol	-	-	-
19	D-Sorbitol	+	+	+

20	Méthyl-αD-	+	+	+
21	Méthyl-αD-	+	-	-
22	N-Acetyl-	+	+	-
23	Amygdaline	+	+	+
24	Arbutine	+	+	+
25	Esculine citrate de fer	-	+	+
26	Salicine	+	+	+
27	D-Celiobiose	+	+	+
28	D-Maltose	+	+	+
29	D-lactose	-	+	+
30	D-Melibiose	-	+	+
31	D-Sacharose	+	+	+
32	D-Trehalose	+	+	+
33	Inuline	+	+	+
34	D-Mélézitose	-	-	-
35	D-Raffinose	+	+	+
36	Amidon	+	+	+
37	Glycoène	-	-	-
38	Xylitol	+	-	-
39	Gentiobiose	+	-	-
40	D-Turanose	+	-	+
41	D-Lyxose	-	-	-
42	D-Tagatose	-	-	-
43	D-Fucose	+	+	+
44	L-Fucose	-	-	-
45	D-Arabitol	-	-	+
46	L-Arabitol	+	-	-
47	Potassium Gluconate	+	-	-
48	Potassium 2-	+	+	+
49	Potassium5	-	-	-
	genre	Bacille Gram positif	<i>Lactobacillus spp</i>	<i>Lactobacillus spp</i>

V. Étude de l'antibiorésistance

Nous avons évalué la résistance des souches par deux méthodes, celle de l'antibiogramme et par détermination de la CMI.

V.1. Antibiogramme

Chaque souche a été testé pour les antibiotiques qui sont préconisés par l'EUCAST(2020). La figure ci-dessous montre les zones d'inhibition après 24h d'incubation obtenues pour quelques souches testées.



Figure 32 : comportement d'*E. durans*, d'*A. viridans* 1, d'*E. faecalis*, d'*E. cloacea* et de *S. liquefaciens* sur Muller Hinton après 24h d'incubation.

Le tableau 14 donne les antibiotype de résistance des souches testées.

Tableau 14 : interprétation des résultats de l'antibiogramme d'*E. cloacea* et de *S. liquefaciens*

Souches	AMX	P	AF	CTX	NA	OX	VA
<i>E. cloacea</i>	R	R	R	R	R	ND	ND
<i>S. liquefaciens</i>	R	R	R	R	R	ND	ND
<i>A. viridans</i>	R	R	R	ND	S	ND	S
<i>E. durans</i>	R	R	R	ND	ND	R	S
<i>E. faecalis</i>	R	R	R	ND	R	ND	R

Légende : AMX : Amoxicilline ; P : Pénicilline ; AF: Acide fusidique ; CTX : Ceftiaxone ; NA: Acide Nalidique ; OX: Oxacilline ; VA: Vancomycine

V.3. Comportement des entérobactéries vis-à-vis des antibiotiques testés

Dans notre étude les entérobactéries présentent un taux de résistance de 100% à tous les antibiotiques.

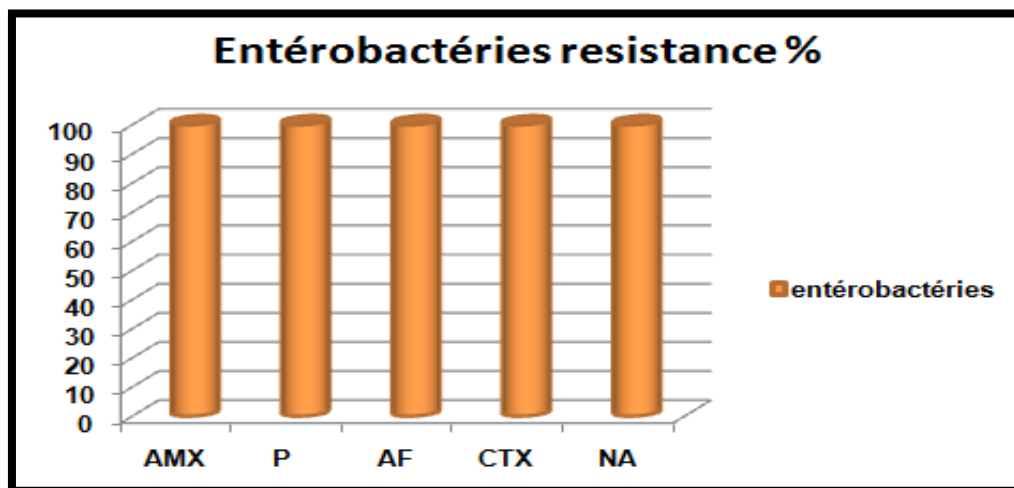


Figure 33 : taux de résistance des isolats des entérobactéries : *E. cloacea*, *S. liquefaciens* vis-à-vis des antibiotiques

Nos résultats sont proches de ceux de Yagoubat et al., 2016 qui décrivent que les entérobactéries isolées à partir de l'environnement hospitalier, sont résistantes à l'amoxicilline et à Ceftiaxone. Nos résultats sont différents de ceux de Agbemadon Kokou Eliké, 2015 où

l'amoxicilline, la cefotaxime, la ceftazidime, l'acide nalidixique et le chloramphénicol étaient plus actifs sur *E.coli* dans le traitement du pied diabétique chez les patients admis à l'hôpital point G de Bamako

Nos résultats sont un peu proches de ceux de Benzidia, 2010 où la résistance des entérobactéries à l'Amoxicilline était de 54,2%, la résistance des entérobactéries à l'amoxicilline associée à l'acide clavulanique était de 33,33%. Les entérobactéries étaient à 95,83% sensibles aux céphalosporines de troisième génération.

Nos résultats sont proches de ceux de Asmaa, 2017 où les entérobactéries sont résistantes à l'amoxicilline

V.4. Comportement des *Enterococcus* vis-à-vis des antibiotiques testés

Dans notre étude les cocci à gram positifs présentent un taux de résistance de 100% à l'amoxicilline, à la pénicilline, et à l'acide fusidique. Le taux de résistance à la vancomycine, à l'acide nalidixique et à l'oxacycline est de 33,33%.

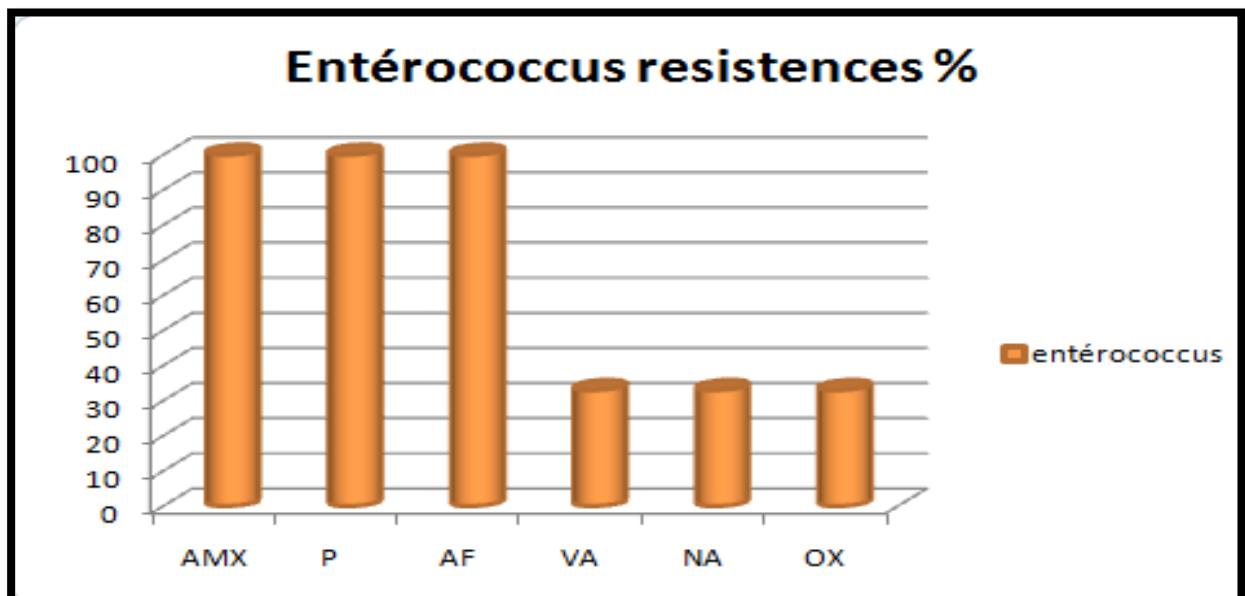


Figure 34 : taux de résistance des isolats des entérocoques : *Aerococcus viridans* 1,

Nos résultats sont proches des études menées par Hadjer, 2018 où les entérocoques isolés d'infection du pied diabétique ont un taux de résistance très élevé aux antibiotiques que ceux isolés des surfaces hospitalières.

Nos résultats sont proches de Hadjer, 2018 où les entérocoques sont identifiés comme bacille multi résistantes s'ils présentent une résistance à la vancomycine.

Nos résultats sont un peu proches de ceux de Kadik et Abed, 2019 où ils ont trouvé *E.faecalis* 100% résistante à la vancomycine.

V.2. CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

V.2.1. CMI en microplaques

La figure ci-dessous montre des souchesensemencées avec différentes concentrations d'antibiotiques de vancomycine et le bouillon Muller Hinton dans des puits sur microplaque des souches *A.viridans* 1, *E.durans*, *E.faecalis*. Les souches *E.cloaceae*, *S. liquefaciens* sont testées vis-à-vis de l'ampicilline sur microplaque (Figure)

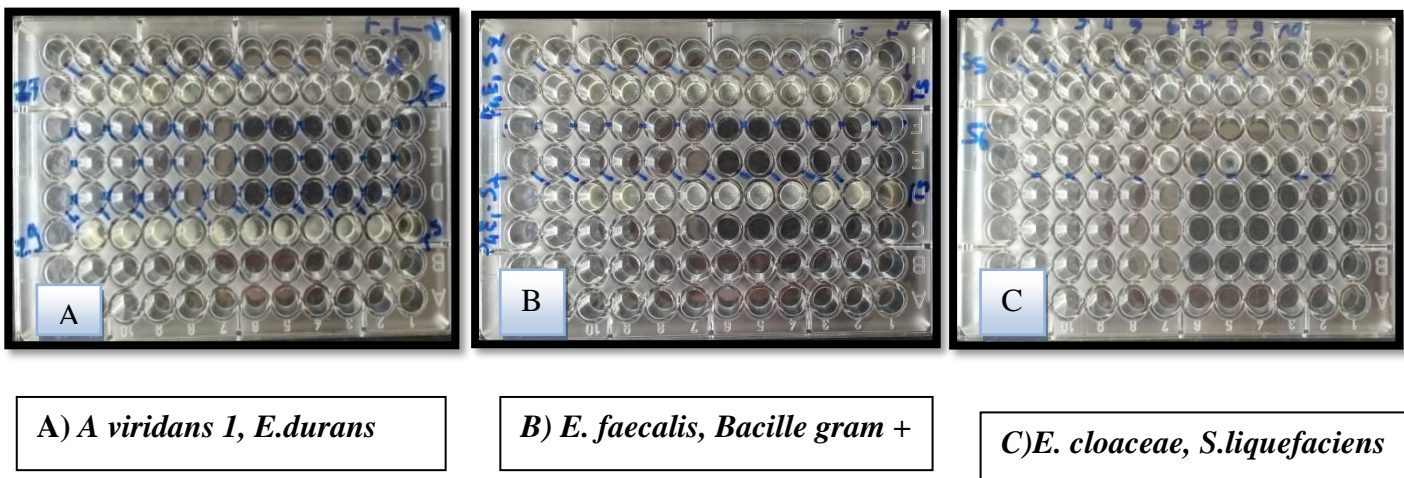
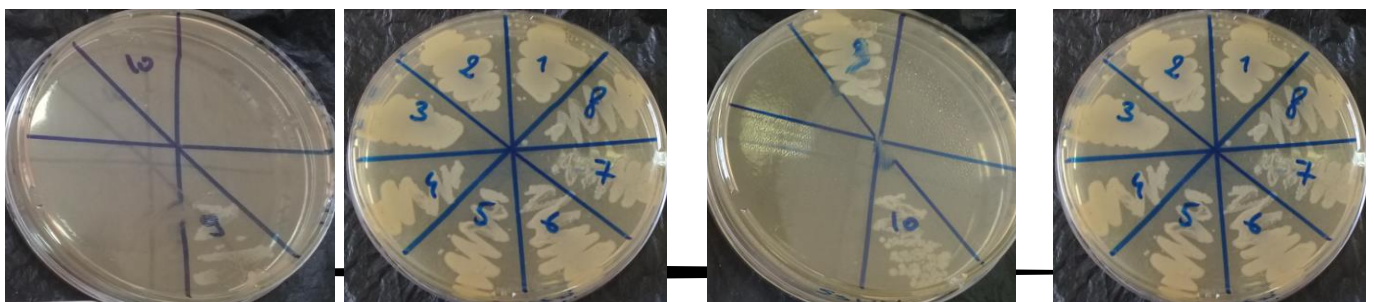


Figure 35 : résultats de la CMI en microplaques d'*E.cloaceae*, de *S. liquefaciens*, d'*A.viridans* et d'*E.durans* et d'*E.faecalis* après 24h d'incubation

V.2.2. Isolement des souches sur gelose muller hinton à partir des microplaques

La figure ci-dessous nous montre la croissance d'*A.viridans* 1, d'*E.durans*, d'*E.faecalis*, d'*E.cloaceae*, de *S.liquefaciens* après mise en contact avec l'antibiotique. La CMI est de 5120µg/ml pour *E. faecalis* vis-à-vis de la vancomycine. La CMI est de 5120µg/ml pour *E.cloaceae* vis-à-vis de l'ampicilline.



Resistance de S. liquefaciens à l'ampicilline

CMI *E.faecalis* vis-à-vis de la vancomycine

Figure 36 : résultats de la CMI après repiquage des souches sur milieu solide.

Tableau 15 : interprétation des résultats de la CMI pour les entérocoques, les enterobacteries et bacille Gram positive

Antibiotiques	Souches	Dilutions									
		5120	2560	1280	640	320	160	80	40	20	10
Vancomycine (VA)	<i>A. viridans 1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>E. durans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Bacille Gram positive	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ampicilline	<i>E. cloaceae</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>S. liquefaciens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Légende : (+) : présence de colonies sur boîte ; (-) : absence de colonies sur boîte ; C : concentration d'antibiotique µg/ml.

V.5. Comportement de bacille et cocci gram positifs vis-à-vis de la vancomycine à partir de la CMI

Dans notre étude la souche P4E1 S7(bacille gram positive) est pratiquement résistante à la vancomycine. Ce résultat est différent de l'étude de Turhan et al, 2013 où la vancomycine était active sur toutes les bacilles gram positives.

Dans notre étude les cocci à gram positifs (*A. viridans*, *E. durans* 1 et *E. faecalis*) sont majoritairement résistantes à la vancomycine. Notre étude est semblable avec celle de Hadjer, 2018 où les entérocoques (cocci gram+) isolées à partir des plaies infectées sont pratiquement toutes résistantes à la Vancomycine.

Les entérocoques sont considérés comme des germes commensaux, mais parfois chez les sujets diabétiques, ils peuvent réagir comme pathogènes opportunistes Citron et al, 2007. De plus les entérocoques sont identifiées comme bacille gram positifs multirésistantes s'ils présentent une résistance à la Vancomycine, ce qui est le cas dans notre étude concernant les entérocoques responsables des infections du pied diabétique et résistantes à la vancomycine

V.6. Comportement des entérobactéries vis-à-vis vis de l'ampicilline à partir de la CMI

Dans notre étude les bacilles gram négatifs (*E. cloacae*, *S. liquefaciens*) de la famille des Enterobacteriaceae ne sont pas toutes résistantes à l'ampicilline. Nos études sont différentes de celles de LABANI , 2016 où les souches d'entérobactéries isolées dans leurs études sont majoritairement résistantes à l'ampicilline.



CONCLUSION



Conclusion

Les infections du pied diabétique (IPD) sont un problème majeur de santé publique avec un taux d'amputations de membres inférieurs toujours très élevé même dans les pays de haut niveau socioéconomique.

L'antibiothérapie est le moyen pour venir au bout des infections de pied diabétique, mais elle est aussi la raison pour laquelle des bactéries résistantes aux antibiotiques sont apparues. L'identification des agents causaux et l'étude de la résistance aux antibiotiques sont des étapes primordiales dans la prise en charge de ces infections. L'identification permet d'identifier les souches incriminées afin de se préparer à l'antibiothérapie dans le choix des antibiotiques pour chaque souche.

Dans cette optique, notre travail consistait à une étude prospective pour déterminer les bactéries responsables de ces infections, et d'étudier le profil d'antibiorésistance des souches isolées.

L'isolement des souches a permis de mettre en évidence la prédominance des bactéries Gram positives à partir de nos isolats des infections du pied diabétique.

Durant notre travail sur un ensemble de 13 souches isolées, nous avons identifié par la galerie api 20E 02 bacilles gram négatifs et 03 cocci gram positifs par la galerie api 20Strept. A partir de nos isolats identifiés, nous avons eu à réaliser l'antibiogramme et la CMI. L'antibiogramme a été réalisé à partir des bacilles gram négatifs (*Serratia liquefaciens* et *Enterobacter cloacae*) et les cocci gram positifs (*Aerococcus viridans 1*, *Enterococcus durans* et *Enterococcus faecalis*).

La détermination de la concentration minimale a été réalisée à partir des bacilles gram négatifs (*Serratia liquefaciens* et *Enterobacter cloacae*), des cocci gram positifs (*Aerococcus viridans 1*, *Enterococcus durans* et *Enterococcus faecalis*) et une souche de bacille gram positif (P4E1 S7).

A l'issue des résultats de la résistance aux antibiotiques des souches testées, il ressort que les entérobactéries (*Serratia liquefaciens*, *Enterobacter cloacae*) sont multirésistantes à tous les antibiotiques testés : amoxicilline, pénicilline, acide fusidique, ceftiaxone et l'acide nalidixique. Les enterocoques (*Aerococcus viridans 1*, *Enterococcus durans* et *Enterococcus faecalis*) ont un taux de résistance de 100% à l'amoxicilline, à la pénicilline, à l'acide fusidique et un taux de résistance de 33,33% à la vancomycine, à l'acide nalidixique et l'oxacycline.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) à l'ampicilline pour *Enterobacter cloacae* et à la vancomycine pour *Enterococcus faecalis* est de 5,12 mg/l. Après une étude sur la recherche de la CMI de la souche bacille gram positive (P4E1 S7) on a pas obtenu de résultat significatif vu qu'elle est pratiquement résistante à la vancomycine.

Conclusion



De part l'obtention de concentration minimale inhibitrice pour *Enterobacter cloacae* et d'*Enterococcus faecalis* nous montre la possibilité d'un succès thérapeutique. Et d'autre, la multi résistance et résistance aux antibiotiques des entérobactéries et des entérocoques à partir de l'antibiogramme nous indiquent la chance minimum de réussite de l'antibiothérapie dans le traitement du pied diabétique.

En prescriptive de ce travail, il serait intéressant d'approfondir nos recherches par une étude génétique dont le but serait d'avoir des informations plus précises, et plus claires sur l'acquisition de l'antibiorésistance afin de trouver de nouvelles stratégies préventives ou curatives dans le cadre de la prise en charge des infections du pied diabétique



BIBLIOGRAPHIE

Références bibliographiques

A

Andrew B. 2005. Le pied diabétique : épidémiologie, facteurs de risque et état des soins, pp2.
Akwah L., Ntungwen.F, Nukenine E., KagningTsinda E., Nwabo Kamdje A. H. (2015). Bacteriology of Diabetic Foot Ulcers with Reference to Multidrug Resistance Strains at the Yaounde Central Hospital (Cameroon). Journal of Diseases and Medicinal Plants. Vol. 1, No. 4, , pp. 53-58. doi: 10.11648/j.jdmp.20150104.11 ;

AGBEMADON Kokou Eliké. Bacériologie et antibiothérapie des plaies diabétiques dans le service de médecine interne de l'hôpital de point G. 2015.

B

Benabbou Taha Ahmed . 2012, Antibiorésistance des bactéries lactiques isolées de produits artisanaux algériens.

Bernard L et al. Recommandations pour la pratique clinique. Prise en charge du pied diabétique infecté. Méd Mal Infect. 2007 ;37(1) :26-50.

Bagnoli, Fabio, Rappuoli, Rino, Grandi, Guido (2017).Staphylococcus aureus.Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis

Ben Haj Khalifa A, Moissenet D, Vu Thien H, Khedher M. (2011) , Les facteurs de virulence de Pseudomonas aeruginosa : mécanismes et modes de transfert

Bayot D., Faron G. (2014). Pharmacologie pour les sages-femmes, 2ème édition de Boeck.

Bustany P., Chaumet-Riffaud P., (1993) Internat, nouveau programme Tome 17: Pharmacologie

Bahorun T. 1997. Substances Naturelles Actives: La Flore Mauricienne, Une Source D'approvisionnement Potentielle. AMAS. Food and Agricultural Research Council. Réduit. Mauritius.

Baran, J.-M. 2000. Daturas, plantes magiques, hallucinogènes et médicinales à l'île de la Réunion et dans le monde. Thèse de doctorat en médecine. Université de Nancy, France.

Benzidia. Ecologie des bactéries isolées du pied diabétique infecté et leurs comportements vis-à-vis des antibiotiques. Etude prospective, réalisée à l'hôpital militaire d'instruction Med V (octobre 2009-Mars 2010); université Mohamed V Rabat (Badia)
<http://ao.um5.ac.ma/xmlui/handle/123456789/5237>

Cundell AM. Microbial Ecology of the Human Skin. Microb Ecol. 31 mai 2016;

Cristian C. (2008). Microbiologie Hygiène Base microbiologiques de la diététique. Ed. TEC & DOC Lavoisier, Paris. p.76 -86, 257.

C

Caruba T., Jaccoulet E. (2015). Pharmacologie et thérapeutiques, 2 ème édition

Chabbert Y.A. (1982). Sensibilité bactérienne aux antibiotiques : Bactériologie Médicale (L. Le Minor & M. Véron, eds.), Flammarion Médecine Sciences, Paris, pp. 204-212

Courvalin P., F. Denis, M.C. Ploy, M. P. d. garilhe, P. Trieu-Culot (2001), Antibiotiques.From

Cowan M.M. 1999. Plant product as antimicrobial agents. Clinical microbiology reviews. 12 (4), 564-582.

Cruciain M, Lipsky BA, Mengoli C, de Lalla F. Are Granulocyte Colony-Stimulating Factors beneficial in treating diabetic foot infections ? Diab Care 2005;28:454-60.

D

Daskalopoulos G, Karyotis I, Heretis I, Anezinis P, Mavromanolakis E, Delakas D. Spontaneous perirenal hemorrhage : a 10-year experience at our institution. Int Urol Nephrol 2004 ; 36 : 15-9.

D.M. Citron, Goldstein E.JC., Merriam C.V., Lipsky B. A., Abramson M.A., (2007). Bacteriology of Moderate-to-Severe Diabetic Foot Infections and In Vitro Activity of Antimicrobial Agents

Dellaras Camille. (2014). Pratique en microbiologie de laboratoire, Recherche de bactéries et de levures et moisissures. Edition Lavoisier.

Delaere B. (2001), La résistance aux antibiotiques en médecine générale. Louvain médical, (2) : 16-22

David B.2013. Infections du pied diabétique : vers une harmonisation des pratiques, Journées du GERICCO, Maladies Infectieuses et Tropicales CHU de Nantes, , pp5.

Dubois J, Demelin M. La peau: de la santé à la beauté : notions de dermatologie et de dermocosmétologie. Toulouse: Privat; 2007.

Dedet J-P. La microbiologie, de ses origines aux maladies émergentes. Paris: Dunod; 2007.

E

E. Senneville Infection et pied diabétique La revue de médecine interne 29 (2008) S243–S24

Eneroth M, Larsson J, Apelqvist J. Deep foot infections in patients with diabetes and foot ulcer: an entity with different characteristics, treatments, and prognosis. J Diabetes Complications 1999;13:254–63.

Ezaitouni F., Rhou H., Benamar L., Ouzeddoun N., Bayahya R., Balafrej L. (1999). Rein et Aminositides, Médecine du Maghreb n°77.

Elsevier Masson. Physiopathologie du pied diabétique Physiopathology of the diabetic foot. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S024886630873950X>

F

Fournier P-E. La Flore Cutanée. Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes. Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection; 2014.

Favet . (2013), Antibiotiques et résistance bactérienne : offensives et contreoffensives. Séminaire de bactériologie 7. 14p.

Faucher M., Ssourisse J. (2010). Pharmacologie, Les anti-infectieux, édition VERDIER-LORNE

G

Guergouri F.Z. (2014), classification des antibiotiques. Faculté de médecine Département de pharmacie Module de pharmacologie spéciale

Gazengel J-M., Orecchioni A-M. (2013). préparateur en pharmacie - Guide théorique et pratique 2 ème édition

Gaurdabassi L., Courvalin P. (2006), Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance , Aarestrup F.M. (Ed.), Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin , Washington, 1-18

Guillet C. (2010), Implication des produits terminaux de glycation dans les complications liées au diabète, Nutrition clinique et métabolisme, p24 ; 109– 114.

Gourdi P., Hanaire H., Mathis A., Martini J, (2008), Le diabète et ses complications, Diabétologie. Module 14. Decm.3. Faculté de Médecine Université Paul Sabatier. Toulouse France.

Geoffroy K. (2005). Rôle des sphingolipides dans la modification de la prolifération des cellules mésangiales rénales en réponse au produit avancé de glycation (AGE) : implication dans le développement de la néphropathie diabétique. Thèse Doctorat en biochimie, Université Paris VII. Denis Didero. P : 31-97.

Références bibliographiques

Grayson ML, et al. Use of ampicillin/Sulbactam versus imipenem/cilastatin in the treatment of limb-threatening foot infections in diabetic patients. *Clin Infect Dis*, 1994,18, 683-693.

GASMI K-H. Antibiorésistance des souches bactériennes impliquées dans les infections du pied diabétique. 2018

H

Haute Autorité de Santé. Séances de prévention des lésions des pieds chez le patient diabétique par le pédicure-podologue. Juillet 2007. Disponible sur le site web : http://www.hassante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/rapport_pied_diabetique.pdf

Haute Autorité de Santé. Guide ALD Diabète de type 2. Juillet 2007. Disponible sur le site web

http://www.hassante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/ald8_guidemedecin_diabetetype2_revunp_vucd.pdf

Haddoun Ar., Waaziz A., Zryouil B., Rafai M. Le pied diabétique. *Espérance médicale* 2004, 11, 108 :441-446.

Hunt TK, Pai MP. The effect of varying ambient oxygen tensions on wound metabolism and collagen synthesis. *Surg Gynecol Obstet.* 1972;135(4):561–7. [PubMed] [Google Scholar]

Hartemann H-A., Marty L., G. Ha Van, A. Grimaldi. (2000), Place de l'antibiothérapie dans le traitement du pied diabétique. *Diabetes & Metabolism* Vol 26, N° 3 p. 219 <http://www.universalisedu.com/encyclopedie/antibiotiques/>.

Ha Van G. Le Pied Diabétique. Paris: Elsevier-Masson; 2008 (201).

I

ibo issa maman Nasser Antibiothérapie des infection du pied diabétique Thèse de doctorat en médecine N °148 RABAT 2013

International Diabètes Fédération(FID), (2015), facteurs de risque. International Working Group on the Diabetic foot. Recommandations pratiques quant à la prise en charge et la prévention du pied diabétique. Basées sur le Consensus International sur le Pied Diabétique. 2011. Disponible sur:

http://www.sfdiabete.org/sites/default/files/files/Pdf/RecosRéférentiels/Recommandations_I_WGDF_2011.pdf

J

J.-L. Bessea, T. Leemrijseb, P.-A. Deleu .Le pied diabétique : place de la chirurgie orthopédique. Revue de chirurgie orthopédique et traumatologique (2011) 97, 302—319, Acceptation définitive le : 28 Février 2011

Jacques M ., Marie L., Agnès H & Jocelyne B.2015. Médecine des maladies métaboliques, Revu de formation médicale contenue, société francophone du diabète alfediam, ELSEVIER MASSON, pp 11.

Joel I, Sylvie G., Jean P & Olivier R . 2012. Infection du pied diabétique de l'adulte, Guide infections du pied diabétique de l'adulte, Bon usage de l'antibiothérapie en franche comté, pp 6.

Jean-Rocques Courtault. Place de la phagothérapie dans le traitement des infections humaines bactériennes: intérêts, enjeux et limites. Sciences pharmaceutiques. 2014. dumas-01020724

Jemni H, Tlili K, Saad J et al. Subcapsular hematoma complicating acute pyelonephritis. J Radiol 1996 ; 77 : 575-8.

Jawetz Ernest, Melnick Joseph, Edward A. Adelberg. (1973) Microbiologie médicale.

K

Kanter M., Coskun O., Uysal H. 2006. The antioxidative and antihistaminic effect of *Nigella sativa* and its major constituent, thymoquinone on ethanol-induced gastric mucosal damage. Arch. Toxicol., 80 (4): 217-224.

Kong HH. Skin microbiome: genomics-based insights into the diversity and role of skin microbes. Trends Mol Med. juin 2011;17(6):320-8.

Khalid S .2011. Pied diabétique, pp13.

Krankel N, Adams V, Linke A et al. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005;25:698-703.

Kirkiacharian Serge, (2010). Guide de chimie médicinale et médicaments, édition Lavoisier

Kim PJ, Steinberg JS. Complications of the diabetic foot. Endocrinol Metab Clin North Am. 2013 Dec;42(4):833-47

Kastenbauer T, Hornlein B, Sokol G, Irsigler K. Evaluation of granulocyte colony-stimulating factor (Filgrastim) in infected diabetic foot ulcers. Diabetologia 2003;46:27-30.

L

Lipsky BA et al. 2012 Infectious diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infection. *Clin Infect Dis.* 2012;54(12):e132-e173.

Lipsky BA, Armstrong DG, Citron DM, Tice AD,

Morgenstern DE, Abramson MA. Ertapenem versus piperacillin/tazobactam for diabetic foot infections (SIDESTEP): prospective, randomised, controlled, doubleblindedmulticentre trial. *Lancet* 2005;366:1695-703.

Lipsky BA, Berendt AR, Deery HG, Embil JM, Karchmer AW, LeFrock JL, Lew DP, Mader JT, Norden C, Tan JS. Diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis* 2004;39:885- 910.

Lozniewski A, Rabaud C. (2010). Résistance bactérienne aux antibiotiques. Infections associées aux soins.

Lecointre G, Le Guyader H. Classification phylogénétique du vivant. 3. éd., revue et augm. Paris: Belin; 2006. 559 p.

M

Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. (2000). In: Brockbiology of microorganisms, Prentice Hall Upper Saddle River, NJ, USA. *Ninth Edition*, pp. 749-771.

Martini J. Diabetic foot: detection and prevention. *Rev Med Interne.* 2008 Sep;29 Suppl 2:S260-3. Management of diabetic foot infections. French Clinical Practiceguidelines. *Med Mal Infect* 2007;37:14-25.

Mouton Y., Bingen E., Deboxker Y., Dubreuil L. (2000). Antiviraux Anti infectieux. Éditions John Libbey Eurotext. P116.

Mehdi S. (2008), La fréquence des bactéries multi résistante à l'hôpital Hassan II de Settat, U Lozniewski A, Rabaud C. (2010). Résistance bactérienne aux antibiotiques. Infections associées aux soins. NIVERSITE MOHAMMED V .FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE RABAT, 48-51p.

Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell (2009). Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Sixième édition

Maurice Bouysset. (2004), Pathologie ostéo-articulaire du pied et de la cheville: Approche médico-chirurgicale Springer Science & Business Media.

N

Nicolas J-F., Cousin F., Thivolet J. (2002). Immunologie clinique et allergologie: compte rendu du séminaire du diabétique. In: Richard JL, Vannereau D, eds. Le Pied Diabétique. Paris: MF Editions. 2002

P

Peters EJ, Lipsky BA. Diagnosis and management of infection in the diabetic foot. Med Clin North Am. 2013 Sep;97(5):911-46.

Picard E. La chirurgie de revascularisation du pi:299-310.

Pons-Guiraud A. La Lettre du Collège de Dermocosmétologie 16 – Microbiote cutané et santé de la peau. | Collège de Dermocosmétologie d'Unilever [Internet]. 2012. Disponible sur: <http://www.dermocosmetologie.fr/la-lettre-du-college-de-dermocosmetologie-16%e2%80%93-microbiote-cutane-et-sante-de-la-peau/>

Pons-Guiraud A. La Lettre du Collège de Dermocosmétologie 16 – Microbiote cutané et santé de la peau. | Collège de Dermocosmétologie d'Unilever [Internet]. 2012. Disponible sur: <http://www.dermocosmetologie.fr/la-lettre-du-college-de-dermocosmetologie-16%e2%80%93-microbiote-cutane-et-sante-de-la-peau/>

Prescrire-Rédaction. Diabète : prévenir les lésions graves des pieds. Revue Prescrire. Mars 2001 ;Tome 21,N°215 :204-213.

Prescrire-Rédaction. Infection d'une plaie du pied chez un patient diabétique. Revue Prescrire. Sept 2014 ;tome 34,N°371 :674-680.

R

Raccah D. (2004). Epidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. EMC-Endocrinologie. Elsevier SAS ; 1: 2942. Razika et Abed Meraim Manel. Isolement et identification de Bacille Gram positif à partir d'infection de la peau lésée chez les diabétiques et étude de l'antibiorésistance des souches isolées. SIDI BEL ABBès. 2019

S

Sanford JA, Gallo RL. Functions of the skin microbiota in health and disease. Semin Immunol. nov 2013;25(5):370-7.

Sanders LJ, Frykberg RG. the Charcot foot. In: Levin ME, O'Neal LW, Bowker JH, editors. The diabetic foot. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2008. p. 257-83.

Scharschmidt TC, Fischbach MA. What lives on our skin: ecology, genomics and therapeutic opportunities of the skin microbiome. Drug Discov Today Dis Mech. déc 2013;10(3-4):e83-9.

Références bibliographiques

SPILF. Recommandations pour la pratique clinique. Prise en charge du pied diabétique infecté. Texte long. Médecine et maladies infectieuses. 2007;37:26-50.

Sylvie Gerche . (2009), Diabète insulino-dépendant. En line <http://www.docteurclic.com>

Senneville E. (2008). Infection and diabetic foot.

Sanford JA, Gallo RL. Functions of the skin microbiota in health and disease. *Semin Immunol.* nov 2013;25(5):370-7.

SanMiguel A, Grice EA. Interactions between host factors and the skin microbiome. *Cell Mol Life Sci.* avr 2015;72(8):1499-515.

T

Travkine M. L'intérêt des produits hydro-alcooliques en milieu hospitalier, collectivité et milieu individuel et familial. [Lorraine]: Faculté de pharmacie; 2012.

Tibbles PM, Edelsberg JS. Hyperbaric oxygen therapy. *N Engl J Med.* 1996;334(25):1642–8. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)].

Turhan V, Mutluoglu M, Acar A, et al. Increasing incidence of Gram-negative organisms in bacterial agents isolated from diabetic foot ulcers. *Journal of infection in developing countries.* 2013;7(10):707-712.

V

Van Damme H, Rorive M, Martens De Noorthout BM, Quaniers J, Scheen A, Limet R. Amputations in diabetic patients: a plea for footsparing surgery. *Acta Chir Belg* 2001;101:123-9.

Verdier I., Gérard, Lina, Yves G., François V. (2015), Cours de Bactériologie Médicale: STAPHYLOCOCCUS. <http://www.microbes>

W

Wukich DK, Armstrong DG, Attinger CE, et al. Inpatient management of diabetic foot disorders: a clinical guide. *Diabetes Care.* 2013 Sep;36(9):2862-71.

Y

Yagoubat M., Ould El-Hadj-Khelil A., Malki A., Bakour S., Touati A., Rolain J-M. (2016), Genetic characterisation of carbapenem-resistant Gram negative bacteria isolated from the University Hospital Mohamed Boudiaf in Ouargla, southern Algeria

Yala D., Merad A.S., Mohamedi D., Kourichi M.N. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques, *Médecine de Maghreb*, n°91 129.

Références bibliographiques

Yala D., Merad A.S., Mohamedi D., Ouar Korich M.N., (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. Médecine du Maghreb n°91. 130.

Yala D, Merada S, D. Mohamedi, M.N. Ouar Korich. (2001). RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES, médecine du meghreb n°91.

Yernault J.-Cl. , Demedts M. (1997). Infections respiratoires pour le spécialiste, édition garant.

Yamashita SK., Louie M., AE. Simor, A. Rachis. (2000), Microbiological surveillance and parenteral antibiotic use in a critical care unit. Can J Infect Dis 2000;11:107-11.

Youness LABAN. Profil bactériologique et fréquence de résistance aux antibiotiques de l'infection du pied diabétique. 2016

Z

Zhang JQ, Fieling JR, Zou KH. Etiology of spontaneous perirenal haemorrhage : a meta-analysis. J Urol 2002 ; 167 : 1593-6.

A decorative rectangular frame with a black border. The corners are adorned with intricate, stylized scrollwork in shades of brown and red. The word "ANNEXES" is centered within the frame.

ANNEXES



Annexe

Annexe1: Milieux de cultures

1/Gélose Nutritive g/l

Extrait de viande	3g
Gélatine peptone.....	5g
Agar	15g
pH = 6.8 +/- 0.2	

2/0 Chapman g/l

Poudre de laboratoire-lemco	1g
Peptone	10g
Mannitol	10g
Chlorure de sodium	75g
Rouge de phénol.....	0.025g
Agar	15g
pH = 7.5 +/-0.2 à 25C°	

3/ gelose mac conkey

Pour 1000 mL de milieu

- peptone pancréatique de gélatine17 g
- peptone pancréatique de caséine..... 1,5g
- peptone peptique de viande1,5 g
- lactose.....10 g
- chlorure de sodium..... 5 g
- sels biliaires1,5 g
- rouge neutre30 mg
- violet de gentiane1 mg
- agar.....13,5 g

Ajuster le pH à $7,1 \pm 0,2$ à 25°C (après autoclavage).

4/ Gélose MRS

- peptone..... 10,0 g
- extrait de viande.....8,0 g
- extrait de levure..... 4,0 g
- Glucose..... 20,0 g
- Acétate de sodium trihydraté..... 5,0 g
- Citrate d'ammonium2,0 g
- Tween 80..... 1,0 ml
- hydrogénophosphate de potassium..... 2,0 g
- sulfate de magnésium heptahydraté0,2 g
- sulfate de manganèse tétrahydraté0,05 g
- Agar10,0 g
- pH = 6,2



6/Bouillon Nutritive g/l

Solides d'infusion de cerveau	125g
Solides d'infusion de coeur de boeuf	5g
Protéase peptone	10g
Glucose.....	2g
Chlorure de sodium.....	5g
Phosphate disodique	2.5g
pH = 6.8 +/- 2 à 25C°	

7/BHIBBouillon cœur-cervelle

- protéose-peptone.....10,0 g
- infusion de cervelle de veau
- infusion de cœur de bœuf
- glucose.....
- chlorure de sodium
- hydrogénophosphate de sodium.....
- pH = 7,4

8/Milieu Muller-Hinton g/l

Amidon.....	1.5g
Infusion de viande	2g
Hydrolysate de peptone de caséine	17.5g
Agar	17g
pH = 7.4 +/- 0.2	

9/Milieu T.S.I

Extrait de boeuf.....	3g
Extrait de levure.....	3g
Peptone.....	20g
Chlorure de Sodium.....	5g
Lactose.....	10g
Saccharose.....	10g
Glucose.....	1g
Citrate ferrique.....	3g
Thiosulfate de Sodium.....	3g
Rouge de phénol.....	0.025g
Gélose.....	12g
pH = 7.4	

Annexe 02 : Réactifs**1. Sérum physiologique :**

Chlorure de Sodium.....	9g
Eau distillée	1000 MI

2. Réactifs de la coloration de Gram

Violet de gentiane

Phénol.....	2.0 g
Violet de gentiane.....	1.0 g
Éthanol à 90°.....	10 ml
Eau distillée.....	100 ml

Lugol

Iodure de potassium.....	2.0 g
Iode métalloïde.....	1.0 g
Eau distillée.....	300 ml

Fuschine de ziehl

Fuchine basique.....	1.0g
Phénol.....	5.0 g
Éthanol à 90°.....	10 ml
Eau distillée.....	100 ml

Annexe 03

Tableau 17 :Corrélationsclinicobactériologiquesentrelespathogèneshabituellementidentifiéset les types de plaies(LIPSKY *et al.*,2004).

Typedeplaiedupied	Pathogènes
Plaie superficielle récente sansantibiothérapie récente	<i>Streptocoquesβ-hémolytiquesStaphylococcus aureus</i>
Plaie chronique(≥1 mois) Plaie antérieurement traitée par antibiotiques	<i>Streptocoquesβ-hémolytiquesStaphylococcus aureusEntérobactéries</i>
Plaie traitée par descéphalosporinesd'évolution défavorable	<i>Entérocoques</i>
Lésion macérée	<i>Pseudomonas sp.</i> (fréquemment en association avec d'autres bactéries)
Plaie de longue durée (ulcère ≥ 6 mois),Traitement antérieur par des antibiotique à large spectre	Association de cocci à Gram positif aérobies (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>streptocoques β-hémolytiques</i> , <i>staphylocoques à coagulasi négative</i> , <i>entérocoques</i>), et de bacilles à Gram négatif (<i>entérobactéries</i> , bacilles à Gram négatif non fermentatifs, <i>Pseudomonas sp.</i>), ± <i>corynébactéries</i> , ± <i>Candida sp.</i>

Odeur nauséabonde, Nécrose, Gangrène	Cocci à Gram positif aérobies, <i>Entérobactéries</i> , Bacilles à Gram négatif non fermentatifs, <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Anaérobies stricts</i>
--------------------------------------	--

Annexe 04

Tableau 18 : Les antibiotiques d'*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (NCTC 12697; CIP 103214) selon CASFM

Antibiotiques	CMI (mg/L)		Charge du disque	Diamètres d'inhibition (mm)	
	Cible	Limites acceptables		Cible	Limites acceptables
Ampicilline	1	0,5-2	2	18	15-21
Ciprofloxacine	0,5-1	0,25-2	5	22	19-25
Gentamicine	8	4-16	301	15	12-18

Antibiotiques	CMI (mg/L)		Charge du disque	Diamètres d'inhibition (mm)	
	Cible	Limites acceptables		Cible	Limites acceptables
Imipénème	1	0,5-2	10	27	24-30
Lévofloxacine	0,5-1	0,25-2	5	22	19-25
Linézolide	2	1-4	10	22	19-25
Nitrofurantoïne	8	4-16	100	21	18-24
Norfloxacine	4	2-8	10	19	16-22
Quinupristine/dalfopristine	4	2-8	15	14	11-17
Streptomycine	-	-	300 ¹	17	14-20
Teicoplanine	0,5	0,25-1	30	18	15-21
Tigécycline ²	0,06	0,03-0,125	15	23	20-26
Triméthoprime	0,25	0,125-0,5	5	28	24-32
Timéthoprime-sulfaméthoxazole	≤0,5/9,5	-	1,25/23,75	30	26-34
Vancomycine	2	1-4	5	13	10-16



Annexe 05: Les familles des antibiotiques

Familles ou molécules non classées (Modes d'action)	Principales groupes ou molécules	Spécifique
Acide fusidique (Inhibition de la synthèse des protéines)	Acide fusidique	Étroit (coques et bacilles à Gram positif, coques à Gram négatif,)
Aminosides ou aminoglycosides (Inhibition de la synthèse des protéines)	Amikacine, Apramycine, Dibécacine, Dihydrostreptomycine, Framycétine, Gentamicine, Isépamicine, Kanamycine, Néomycine, Nétilmicine, Paromomycine, Sisomicine, Spectinomycine, Streptomycine, Tobramycine.	Large (sauf bactéries anaérobies).
	groupe de la pénicilline G Clométocilline, Pénicilline G, Pénicilline V	Étroit (coques et bacilles à Gram positif et à Gram négatif)
	Pénicillines antistaphylococciques Cloxacilline, Dicloxacilline,	Étroit (identique à pénicilline G).
	Méticilline, Nafcilline, Oxacilline	Large.
	aminopénicillines	
	Amoxicilline	
Bêta-lactamines (Inhibition de la synthèse du peptidoglycane)	Ampicilline et molécules libérant de l'ampicilline in vivo (bacampicilline, pivampicilline, métampicilline, hétacilline)	
	Epicilline	Large.
	Carboxypénicillines	
	Carbénicilline, Carfécilline	
	Ticarcilline	Large.
	Uréido-pénicillines	
	Azlocilline, Mezlocilline	
	Pipéracilline	Inhibiteurs des bêta-lactamases.
	Pénicillines-sulfones Sulbactam, Tazobactam.	
	Carbapénems Imipénème	
Clavams ou oxapénams Acide clavulanique	Inhibiteur des bêta-lactamases (utilisé en association avec une autre bêta-lactamine).	

Annexes



	Monobactams Aztréonam.	Étroit (bacilles à Gram négatif aérobies
--	---------------------------	---