

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 :

**Contribution à l'évaluation de la
formation de biofilm des souches
bactérienne isolées de la peau lésée
chez les diabétiques**

Présenté par : **Melle** ACHI Sabrina

Melle BOUHAFS Naila

Mémoire soutenu devant l'honorable jury composé de :

Président de jury : **Mr** MARROKI Ahmed (**M.C.A/** UDL/SBA)

Examineur : **Mme** BOUSMAHA MARROKI Leila (**M.C.A/** UDL/SBA)

Promoteur : **Mme** ZAHZEH Touria (**Professeur/** UDL/SBA)

Année universitaire 2020 - 2021

Session : « Juin »

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا

إنك أنت العليم الحكيم

سورة البقرة: الآية 32

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمَ

Remerciements

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie appliquée de l'Université Djilali Liabes.

Nous tenons à remercier dans un premier temps particulièrement notre encadreur Madame Bousmaha Marroki Leïla Maître de conférence classe A, Département de Biologie, Université Djilali Liabes pour nous avoir dirigé et pour sa disponibilité, son encouragement, ses orientations, sa patience et surtout pour ses précieux conseils, tout au long de la réalisation de ce travail

Nous remercions également Monsieur le Président de jury Dr Marroki Ahmed Maître de conférences A à l'université Djilali Liabes pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de cette soutenance.

Nous tenons à remercier également Madame ZAHZEH, professeur à l'Université Djilali LIABES-SBA de faire partie de ce jury et d'évaluer ce travail

Nous tenons à remercier également tous nos enseignants pour leurs bonnes orientations et pour leur aide précieuse.

Nous remercions également les ingénieurs du Laboratoire de Microbiologie appliquée, département de Biologie pour leur précieuse collaboration.

Dédicaces

Du profond de mon cœur, je dédie ce modeste document

A mes chers parents, source de vie, d'amour, d'affection, de joie et de bonheur, je n'arriverai jamais à leur exprimer mon amour sincère, votre bienveillance me guide et votre présence à mes côtés a toujours été ma source de force

Mon adorable mère qui n'a jamais cessé de me conseiller, de m'encourager et de me soutenir tout au long de mes études.

Que dieu lui offre la chance et le bonheur.

A mon père, à qui je dois ma vie, ma réussite et tout mon respect, quoi que je fasse, quoi que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Puisse dieu vous prêter bonne santé et longue vie.

A ma grand-mère, mes oncles, mes tantes et toute ma famille Que dieu leur donne longue et joyeuse vie.

A Faïza , Younes ,Insaf , Naïla et à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin pour que ce travail soit possible , Merci pour votre soutien plus que précieux.

A mes professeurs Monsieur Marroki et Madame Bousmaha pour leur soutien moral et leurs précieux conseils, pour leur aide et support tout au long des études, je vous remercie vivement pout tout.

Dédicace

Je dédie ce travail

À mes parents,

Sans qui je ne serai pas là aujourd'hui, je ne saurais exprimer ma gratitude, mon amour et mon attachement envers vous pour votre patience, votre tendresse, votre attention et vos encouragements.

À mes frères Wissem Eddine, Ibrahim El Khalil et Nadir pour leurs encouragements.

À ma grand-mère pour ces encouragements tout au long de mon cursus.

À ma famille : tantes, oncle et cousines, ainsi qu'à mes amis pour leurs soutiens durant la réalisation de ce travail.

Bouhafis Naïla

Résumé

Les infections du pied diabétique sont un problème majeur lié au diabète dans le monde en raison de la forte prévalence du diabète dans la population. L'ulcération diabétique du pied représente un problème médical, social et économique mondial majeur. L'organe cutané considéré comme un écosystème microbien complexe montrant une diversité microbienne contribue de façon considérable dans la fréquence et l'évolution de cette infection chronique. Les biofilms bactériens, lors d'infections chroniques, constituent des réservoirs de pathogènes à l'origine de nombreuses infections notamment dans l'infection du pied chez les diabétiques.

Le but de notre étude, est de déterminer le profil microbiologique des infections du pied diabétique, et d'analyser la distribution des isolats microbiens. Sur la base des différentes méthodes d'étude du biofilm, notre étude a été axée sur le potentiel de ces bactéries dans la contribution à la formation de biofilm.

Notre étude portée sur 10 patients diabétiques, présentant des plaies infectées au niveau du pied. Cette échantillon de population, concerne la tranche d'âge [60-70] ans. La majorité de nos patients, sont de sexe masculin, soit 70% hommes, contre 30 % de femmes, et les patients ayant un diabète de type 2 représentaient 60%.

A partir des prélèvements effectués nous avons isolé 10 souches bactériennes. D'autres isolats issus du pied diabétique de travaux antérieurs nous ont été octroyé par notre encadreur. Au total 23 souches ont fait l'objet de cette étude réparties en six familles. L'identification a été réalisée à l'aide de différents tests de la galerie biochimique classique et ainsi que des galeries miniaturisés API. La famille la plus dominante est celle des *Corynebacteriaceae* avec un taux de 26,08 %, comprenant les espèces *Corynebacterium pyogènes*, *Corynebacterium ulcerans*, et *Cellulomonas spp*. La seconde famille, est celle des *Staphylococcaceae*, avec un taux de 21,73 %, représentée par *Staphylococcus aureus* et les Staphylocoques à coagulase négative (SCN). La troisième famille est celle des *Enterobacteriaceae*, avec un taux de 21.73 %, représentée par *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella choleraesuis*, et *Raoutella ornithinolytica*. La quatrième famille est celle des *Pseudomonadaceae*, avec un taux de 8.68 %, représentée par les souches, *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas maltophilia*. La cinquième famille est celle des *Sreptococcaceae*, avec un taux de 4.34 %, représentée par *Streptococcus acidomonimus*. La sixième famille est celle des *Aerococcaceae* (Ordre des Lactobacilles), avec un taux de 4.34%, représentée par *Aerococcus viridans*. D'autre bacilles à Gram positif, avec un taux de 13.02 % ont également été identifiés.

La mise en évidence de la production de slime par des souches sur milieu RCA a révélé que 91.30 % des souches testées sont productrice de slime. La méthode TCP a révélé que 65.21 % des isolats ont un potentiel à former des biofilms : 34.78% des souches ayant présenté un pouvoir d'adhésion visible et fort sur microplaques, 30.43% des souches ont présenté un pouvoir d'adhésion modéré. Les résultats de la technique TM sont différents à ceux obtenus par la méthode TCP, il est possible de constater que 39.13 % et ont un fort potentiel d'adhésion cellulaire sur un support en verre. La recherche de la capacité d'adhésion sur lame a révélé que 73.91 % adhèrent après 3h et 91.30% après 24h d'incubation, et parfois, avec une production de slime microbiens. Pour la détermination de l'hydrophobicité des souches La totalité des souches, à l'exception de *Raoutella ornithinolytica*, ont présenté un pourcentage plus ou moins élevé, d'hydrophobicité, et plus à même de former des biofilms.

Mot clés : Pied diabétique, Infection, Profil microbiologique, Biofilm.

Summary

Diabetic foot infections are a major diabetes related problem worldwide due to the high prevalence of diabetes in the population. Diabetic foot ulceration is a major global medical, social and economic problem. The skin organ considered as a complex microbial ecosystem showing microbial diversity contributes significantly to the frequency and course of this chronic infection. Bacterial biofilms, during chronic infections, constitute reservoirs of pathogens at the origin of many infections, especially in foot infections in diabetics.

The aim of our study is to determine the microbiological profile of diabetic foot infections, and to analyze the distribution of microbial isolates. Based on the different methods of studying biofilm, our study focused on the potential of these bacteria in contributing to biofilm formation.

Our study focused on 10 diabetic patients with infected wounds on the foot. This sample of the population concerns the age group [60-70] years. The majority of our patients are male, i.e. 70% male, compared to 30% female, and patients with type 2 diabetes accounted for 60%.

From the samples taken, we isolated 10 bacterial strains. Other isolates from diabetic foot from previous work were given to us by our supervisor. A total of 23 strains were the subject of this study divided into six families. The identification was carried out using various tests of the classical biochemical gallery and as well as the miniaturized API galleries. The most dominant family is that of *Corynebacteriaceae* with a rate of 26.08%, comprising the species *Corynebacterium pyogenes*, *Corynebacterium ulcerans*, and *Cellulomonas spp.* The second family is that of *Staphylococcaceae*, with a rate of 21.73%, represented by *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococci* (SCN). The third family is that of *Enterobacteriaceae*, with a rate of 21.73%, represented by *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella choleraesuis*, and *Raoutella ornithinolytica*. The fourth family is that of *Pseudomonadaceae*, with a rate of 8.68%, represented by the strains, *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas maltophilia*. The fifth family is that of *Streptococcaceae*, with a rate of 4.34%, represented by *Streptococcus acidomonimus*. The sixth family is that of *Aerococcaceae* (Order *Lactobacilli*), with a rate of 4.34%, represented by *Aerococcus viridans*. Other Gram-positive bacilli, with a rate of 13.02% have also been identified.

The demonstration of the production of slime by strains on RCA medium revealed that 91.30% of the strains tested produced slime. The TCP method revealed that 65.21% of the isolates have a potential to form biofilms: 34.78% of the strains having shown a visible and strong adhesion capacity on microplates, 30.43% of the strains showed a moderate capacity of adhesion. The results of the TM technique are different from those obtained by the TCP method, it is possible to see that 39.13% and have a high potential for cell adhesion on a glass support. Research on slide adhesion capacity revealed that 73.91% adhere after 3 hours and 91.30% after 24 hours of incubation, and sometimes with microbial slime production. For the determination of the hydrophobicity of the strains All of the strains, with the exception of *Raoutella ornithinolytica*, exhibited a greater or lesser percentage of hydrophobicity, and more likely to form biofilms.

Keywords: Diabetic foot, Infection, Microbiological profile, Biofilm.

ملخص

التهابات القدم السكري مشكلة رئيسية لمرض السكري في جميع أنحاء العالم بسبب انتشار مرض السكري في تعداد السكان. قرحة القدم لمرضى السكري تمثل مشكلة طبية و اجتماعية و اقتصادية عالمية.

جلد الإنسان يعتبر كبيئة جرثومية معقدة يظهر من خلالها تنوع جرثومي يساهم بكيفية عظيمة لتردد و تطور هذا الالتهاب بصفة مزمنة. البيوفيليمات البكتيرية تمثل خزائن كبيرة من مسببات الأمراض التي بدورها تصبح مصدر الالتهابات و خاصة للقدم السكري عند المصابين بالسكري.

الهدف من دراستنا هو تحديد الصورة الميكروولوجية للالتهابات التي تصيب القدم السكري و تحليل توزيع المستخلصات الجرثومية. على أساس طرق دراسة مختلفة للبيوفيلم دراستنا تمحورت على قدرة هذه البكتيريا للمساهمة على تكوين البيوفيلم.

لقد ركزت دراستنا على 10 مرضى مصابين بمرض السكري و مصابين بجروح على مستوى القدم. هذه العينة من الناس تخص الفئة العمرية (60-70) سنة. معظم المرضى الذين اتصلنا بهم من جنس ذكر يعني سبعون بالمائة و ثلاثون بالمائة إناث و المرضى المصابين بالنوع السكري 2 يمثلون ستون بالمائة.

انطلاقا من العينات استطعنا ان نحصل على 10 سلالات بكتيرية. مستخلصات أخرى من القدم السكري كانت بحوزة الاستعادة المشرفة علينا و قد سلمتهم ألينا لإتمام الدراسة و بالتالي يصبح عدد السلالات 23 بحوزتنا و كانت مصدر دراستنا و توزعت هذه السلالات إلى 6 عائلات جرثومية.

و تم تحديد هذه السلالات بواسطة عدة اختبارات بيوكيميائية وكلاسيكية و معارض مصغرة " ا ب ي" و العائلة *Corynebacteriaceae* الأكثر سيطرة بنسبة 26.08 بالمائة.

كما تحتوي هذه العائلة على الأنواع التالية *Corynebacterium ulcerans, Corynebacterium pyogens*

العائلة الثانية هي *Staphylococcaceae* افرادها بنسبة مائبة 21.73 *Staphylococcus aureus, Staphylococcus*

العائلة الثالثة هي عائلة *Enterobacteriaceae* بنسبة مائبة 21.73 مع الافراد

يلها العائلات التالية بالنسب المائبة على التوالي 8.08 و 4.34 *Pseudomonadaceae, Streptococcaceae, Aerococcaceae*

و كذا بكتيريا غرام + بنسبة مائبة 13.02

الكشف على السلالات التي تقوم يصنع البيوفيلم تم عن طريق الوسط " احمر الكنق" و بنسبة مائبة 91.30 من السلالات المفحوصة و الصناعة للبيوفيلم. طريق العلب كشفت على نسبة مائبة من المستخلصات ب 65.21 و الصناعة للبيوفيلم. بينما نسبة أخرى ب 34.78 مائبة كانت لها انخراط كبير و التصاق ظاهر على العلب المهجرية بينما نسبة مائبة أخرى كان لها التصاق متوسط .

نتائج تقنية الأنابيب اختلفت تماما تقنية العلب و نستطيع أن نسبة مائبة ب 39.13 كان لها التصاق كبير على صفيحة زجاجية.

البحث على قدرة الالتصاق على الصفائح الزجاجية بين أن نسبة مائبة من السلالات 73.91 التصقت بعد ثلاثة ساعات و نسبة اخرى التصقت بعد 24 ساعة من الحضانة و مرفقة بصنع بيوفيلم.

للحصول على الكشف لكراهية الماء كل السلالات قامت بصنع البيوفيلم ما عدى سلالة *Raoutella ornithinolitica*

الكلمات الدالة / قدم سكري- التهاب- صورة ميكروبيولوجية- بيوفيلم

TABLE DES MATIERES

Page

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

| | | |
|----------|--|----|
| I- | LA PEAU ET LES INFECTIONS CUTANEEES | 1 |
| I.1- | LA MICROFLORE RESIDENTE CUTANEE | 1 |
| I.1.1. | Définition | 2 |
| I.1.2. | Description | 2 |
| I.1.3. | Le genre Staphylocoque | 2 |
| I.1.4. | Le genre Propionibacterium | 3 |
| I.1.5. | Le genre Corynebacterium | 3 |
| I.1.6. | Les Bacilles à Gram négatif | 4 |
| I.1.7. | Autres microorganismes retrouvés sur la peau | 4 |
| I.2- | MODIFICATION DE LA FLORE CUTANEE | |
| I.2.1. | Facteurs liés à l'individu | 4 |
| I.2.1.1. | Facteurs physiques | 4 |
| I.2.1.2. | Facteurs chimiques | 5 |
| I.2.1.3. | Facteurs exogènes | 6 |
| I.2.1.4. | Facteurs bactériens | 6 |
| I.3- | LES INFECTIONS BACTERIENNES CUTANEEES | |
| I.3.1. | Les infections et les suppurations | 7 |
| II- | LE PIED DIABETIQUE | |
| II.1. | DEFINITION | 8 |
| II.2. | ANATOMIE | 8 |
| II.3. | ETIOLOGIE..... | 9 |
| II.4. | EPIDEMIOLOGIE | 10 |
| II.5. | PHYSIOPATHOLOGIE DU PIED DIABETIQUE | 10 |
| II.5.1. | L'Infection du pied diabétique..... | 10 |
| II.5.2. | Stades de l'infection | 10 |
| II.5.3. | La Neuropathie | 11 |
| II.5.4. | L'Artériopathie | 12 |
| II.5.6. | Le Pied de Charcot | |
| II.6. | CLASSIFICATION DE L'INFECTION CHEZ LES DIABETIQUES | 13 |

| | | |
|----------|---|----|
| III- | LES BIOFILMS | 14 |
| III.1. | DEFINITION | 1 |
| III.2. | CYCLE DU BIOFILM | 14 |
| III.2.1. | Mise en place d'un biofilm conditionnant | 14 |
| III.2.2. | Etape de transfert | 14 |
| III.2.3. | L'Adhésion réversible et irréversible | 15 |
| III.2.4. | Colonisation du matériau | 16 |
| III.3. | RESISTANCE DU BIOFILM | 16 |
| III.3.1. | Définition | 16 |
| III.3.2. | Caractéristiques | 17 |
| III.4. | LE QUORUM SENSING | 18 |
| III.4.1. | Définition | 18 |
| III.4.2. | Les molécules du Quorum sensing et leur mode d'action | 18 |
| III.5. | LE QUORUM QUENCHING | 19 |
| III.5.1. | Définition | 19 |
| III.5.2. | Mécanismes d'action du Quorum quenching | 19 |
| III.5.3. | Potentiel thérapeutique du Quorum quenching | 20 |
| III.5.4. | Inhibiteurs du Quorum sensing | 20 |
| III.6. | PHYSIOPATHOLOGIE DES BIOFILMS..... | 20 |
| III.6.1. | Les biofilms et les infections associés aux plaies chroniques | 20 |
| III.7. | LES BIOFILMS FACE AUX ANTIBIOTIQUES | 21 |
| III.8. | STRATEGIES THERAPEUTIQUES POUR LUTTER CONTRE LES BIOFILMS | 22 |
| III.9. | LES NOUVELLES APPROCHES ANTI-BIOFILMS | 23 |

MATERIEL ET METHODES

| | | |
|---------|---|----|
| I- | Lieu et période d'étude | 23 |
| II- | Prélèvements et isolats bactériens | 23 |
| II.1. | Isolats bactériens | 23 |
| II.2. | Prélèvements | 23 |
| III- | Isolement et Purification | 23 |
| IV- | Identification | 23 |
| IV.1. | Examen macroscopique | 23 |
| IV.2. | Examen microscopique | 23 |
| IV.2.1. | Coloration de Gram | 24 |
| IV.2.2. | Coloration des spores bactériennes..... | 24 |
| IV.3. | Identification par la galerie classique | 25 |
| IV.3.1. | Test de catalase | 25 |
| IV.3.2. | Test de coagulase | 25 |

| | |
|---|----|
| IV.3.3. Test de plasma de lapin | 25 |
| IV.3.4. Mise en évidence du type respiratoire des bactéries | 26 |
| IV.3.5. Test de mannitol mobilité | 26 |
| IV.3.6. Test de citrate | 27 |
| IV.3.7. Mise en évidence de la fermentation du glucose, du saccharose et du lactose | 27 |
| IV.3.8. Test ONPG | 27 |
| IV.4. Identification par micro étude | 28 |
| IV.4.1. API 20 E | 28 |
| IV.4.2. API 20 NE | 28 |
| IV.4.3. API Coryne | 29 |
| IV.4.4. API 20 Strept | 30 |
| V. Evaluation de la formation des biofilms | 31 |
| V.1. Méthode au Rouge Congo Agar | 31 |
| V.2. Méthode de plaque de culture tissulaire TCP | 31 |
| V.3. Méthode en tube TM..... | 32 |
| V.4. Méthode de visualisation sur lames de microscope : Méthode de goutte | 32 |
| V.5. Evaluation de l'hydrophobicité | 32 |

RESULTATS ET DISCUSSION

| | |
|--|----|
| I. DESCRIPTION DE LA POPULATION | 34 |
| I.1. REPARTITION DE LA POPULATION SELON L'AGE | 34 |
| I.2. REPARTITION DE LA POPULATION SELON LE SEXE | 35 |
| I.3. REPARTITION DES PATIENTS SELON LE TYPE DE DIABETE | 35 |
| II. IDENTIFICATION PAR MACROMETHODE | 36 |
| II.1. RESULTATS DES EXAMENS MACRO ET MICRO DES SOUCHES ISOLEES | 36 |
| II.1.1. Le genre Staphylocoque | 36 |
| II.1.2. Les Entérobactéries | 37 |
| II.1.3. Le genre Streptocoque | 38 |
| II.1.4. Le genre Pseudomonas | 38 |
| II.1.5. Les Corynébactéries | 39 |
| II.1.6. Le genre Aerococcus | 39 |
| II.1.7. Les bacilles à Gram positif | 39 |
| II.2. Coloration des spores | 40 |
| II.3. Test de catalase..... | 40 |
| II.4. Test de coagulase | 41 |

| | |
|---|----|
| II.5. Mise en évidence du type respiratoire des bactéries | 41 |
| II.6. Test de Mannitol mobilité | 43 |
| II.7. Mise en évidence de la fermentation du glucose et du saccharose et du lactose | 44 |
| II.7.1. Test sur milieu TSI | 44 |
| II.7.2. Test sur milieu Kligler et Hajna | 44 |
| II.8. Test ONPG | 45 |
| II.9. Test de citrate de Simmons | 45 |
| II.10. Les galeries biochimiques | 46 |
| III. IDENTIFICATION PAR MICROMETHODE | 47 |
| III.1. LA GALERIE API 20 E | 47 |
| III.2. LA GALERIE API 20 NE | 47 |
| III.3. API STREPTO | 48 |
| III.4. API CORYNE | 48 |
| IV. REPARTITION DES SOUCHES ISOLEES | 49 |
| V. RESULTATS DE L'ETUDE DE LA FORMATION DE BIOFILMS | 53 |
| V.1. Culture sur milieu RCA | 54 |
| V.2. La méthode TCP | 55 |
| V.3. La méthode en tube TM | 57 |
| V.4. La méthode de visualisation sur lames de microscope : méthode de goutte | 58 |
| V.5. Evaluation de l'hydrophobicité | 60 |
| CONCLUSION | 64 |
| REFERENCES | 66 |
| ANNEXES | 71 |

Liste des abréviations

LPD : le pied diabétique

UFC : unité formant colonie

QS : Quorum sensing

OMS : Organisation mondiale de la santé

QQ : Quorum quenching

RCA : Méthode du rouge Congo agar

SCN : Staphylocoques a coagulase négative

TM : Méthode en tube

TCP : Méthode de Plaque de culture de tissus

TSI : Triple Sugar Iron

AI : Auto inducteur

DO : densité optique

Liste des figures

| | Page |
|--|-------------|
| Figure1 : Localisation anatomique des infections de la peau..... | 7 |
| Figure 2 : Les os du pied | 8 |
| Figure3 :Vascularisation du pied..... | 8 |
| Figure 4 : Infection du pied diabétique | 10 |
| Figure 5 : Le pied de Charcot | 12 |
| Figure 6 : Représentation schématique des forces d'interaction pouvant être mises en jeu lors de la formation d'un biofilm | 13 |
| Figure7 : Exemple de cinétique de croissance d'un biofilm aérobique sur support Tygon, modèle dynamique (nombre d'UFC adhérees/cm ² et nombre d'UFC/mL d'effluent..... | 14 |
| Figure 8 : Représentation schématique du cycle de la vie d'un biofilm..... | 14 |
| Figure 9 : Mécanismes de résistance des biofilms aux défenses de l'hôte | 15 |
| Figure 10 : Rôle du Quorum sensing dans la mise en place de l'infection et rôle du quorum quenching dans la protection (utilisation d'enzymes | 17 |
| Figure 11 : Infections associées aux plaies chroniques | 18 |
| Figure 12 : Représentation schématique de la résistance des biofilms aux antibiotiques | 19 |
| Figure13 : Histogramme relatif à la tranche d'âge [30-90] ans..... | 34 |
| Figure 14 . Secteur correspondant à la population concernée [30-90]..... | 34 |
| Figure15 : Répartition des patients selon le sexe de l'individu..... | 34 |
| Figure16 : Répartition des patients selon le type de diabète..... | 35 |
| Figure 17 : examen macroscopique et microscopique des bactéries du genres Staphylococcus Manitol +.. | 36 |
| Figure18 : Examen macro et microscopique des bactéries du genre Staphylococcus à colonies blanches..... | 36 |
| Figure19 : Examen macro et microscopique des bactéries du genre Staphylococcus (microscopique) | 36 |
| Figure 20 : Aspect macroscopique et microscopique des bacilles Gram négatif à colonies rouges..... | 37 |
| Figure 21 : aspect macroscopique et microscopique des entérobactéries à colonies jaune..... | 37 |
| Figure22 : Aspect macro et microscopique des bactéries du genre Sreptococcaceae..... | 38 |
| Figure23 : Aspect macro et microscopique des bactéries appartenant au genre Pseudomonadaceae..... | 38 |
| Figure 24 : aspect macroscopique et microscopique des Corynébacteries..... | 39 |

| | |
|---|----|
| Figure25 : aspect macroscopique et microscopique des <i>Aerococcus</i> | 39 |
| Figure26 : aspect macroscopique et microscopique des bacilles à Gram positif..... | 39 |
| Figure27 : Aspect microscopiques après coloration au vert de Malachite..... | 40 |
| Figure28 : résultat positif au test du catalase..... | 40 |
| Figure29 : résultat positif du test LATEX..... | 41 |
| Figure30 : résultat négatif du test Latex..... | 41 |
| Figure31 : Croissance sur milieu VF des souches aéro-anérobie facultatif..... | 41 |
| Figure32 : Répartition des souches selon la production du CO ₂ | 42 |
| Figure33 : Croissance sur milieu VF avec production de CO ₂ | 42 |
| Figure34 : Croissance sur milieu (Mannitol mobilité)..... | 42 |
| Figure35 : Résultat positif du test Mannitol-mobilité..... | 43 |
| Figure 36 : test glucose – (B) à côté du témoin (A)..... | 43 |
| Figure37 : test glucose + (B) à côté du témoin (A)..... | 43 |
| Figure38 : test lactose + (à droite) à côté du témoin (à gauche)..... | 44 |
| Figure39 : Résultat du test citrate..... | 45 |
| Figure 40 : Identification des souches par la galerie API 20 E..... | 45 |
| Figure 41 : Identification des souches par la galerie API 20 NE..... | 46 |
| Figure 42 : Identification des souches par la galerie API Strepto..... | 46 |
| Figure 43 : Identification des souches par la galerie API CORYNE..... | 46 |
| Figure 44 : Répartition des souches isolées..... | 47 |
| Figure 45 : souche non productrice de slime sur milieu RCA..... | 52 |
| Figure 46 : Souches productrice de slime sur milieu RCA..... | 52 |
| Figure 47 : Résultat de la formation de biofilm par technique TCP..... | 52 |
| Figure48 : Résultats de l'ensemencement sur milieu PCA..... | 53 |
| Figure49 : Les résultats après mesure de la densité optique des tubes..... | 54 |
| Figure50 : Résultats de la formation de biofilm par technique TM..... | 55 |
| Figure51 : pourcentage d'adhésion après 3h d'incubation..... | 56 |
| Figure52 : Pourcentage des souches adhésives et non adhésives après 24h d'incubation..... | 56 |
| Figure53 : <i>P. aeruginosa</i> après incubation de 3h et après 24h..... | 57 |
| Figure54 : L'adhésion de <i>Corynebacterium ulcerans</i> après 3h et après 24h d'incubation..... | 57 |
| Figure55 : L'adhésion de <i>S.aureus</i> après 3h et après 24h..... | 57 |

| | |
|--|----|
| Figure56 : La densité optique des Staphylocoque..... | 58 |
| Figure57 : La densité optique des Corynébacteries..... | 58 |
| Figure58 : Densité optique des Entérobactéries..... | 59 |
| Figure59 : la densité optique des Streptocoques -Aerococcus-Pseudomonas-Les autres BGP..... | 59 |
| Figure60 : Pourcentage de l'hydrophobicité de la totalité des souches..... | 60 |

Liste des Tableaux

Page

| | |
|--|----|
| Tableau 1. : Diversité régionale des différentes espèces microbiennes cutanées | 2 |
| Tableau 2. Espèces prédominantes des Staphylocoques de la flore résidente selon leur localisation | 3 |
| Tableau 3 : Principaux germes identifiés en fonction du type de lésion | 7 |
| Tableau. 4 : Germes identifiés dans les infections du pied diabétique | 9 |
| Tableau5 : Evolution de la flore microbienne et les signes cliniques..... | 10 |
| Tableau 6 : Ecologie des ostéites du pied chez le diabétique. | 11 |
| Tableau 7 : Classification de WAGNER | 12 |
| Tableau. 8: Classification de l'infection du pied diabétique PEDIS | 12 |
| Tableau 9. Antibiotiques curatifs étudiés en clinique | 20 |
| Tableau 10 : Les souches adhésives sur lame en 3h d'incubation..... | 54 |
| Tableau 11 : Répartition des souches selon le dénombrement des colonies sur milieu PCA..... | 56 |

Introduction

Le corps humain est sans cesse « bombardé » par des myriades de micro-organismes présents dans l'environnement. Les bactéries non évacuées par le flux d'air circulant continuellement à la surface de la peau, se retrouvent face à une barrière cutanée de type mécanique constituée par l'épithélium stratifié de la couche cornée. La cohésion de cette barrière empêche la pénétration des micro-organismes dans les couches les plus profondes de la peau, mais aussi dans le corps

Les microorganismes sont ubiquitaires, et colonisent toute sorte de support ou de matériau. La plupart d'entre eux sont des commensaux de l'homme, et colonisent la peau, et font partie de la microflore cutanée de l'homme. Bien qu'inoffensifs, ces microorganismes acquièrent une pathogénicité, lors d'une lésion de la peau, et causent des dégâts considérables.

Dans l'environnement, les micro-organismes peuvent exister dans deux états principaux, à savoir : planctonique et sessile. À l'état planctonique, les bactéries se déplacent librement dans leur environnement. À l'état sessile, les microorganismes sont attachés soit à des surfaces solides (p. ex. cathéter urinaire ou prothèse), soit plus fréquemment, les uns aux autres, constituant des agrégats multicellulaires qui peuvent mener à la formation de biofilm. (**Cassandra et al.,2020**)

Ces microorganismes ne vivent pas individuellement, mais sont organisés en communautés structurées appelées « biofilms ». Cette nature communautaire et sociale, leur confère un pouvoir pathogène puissant, en leur donnant la capacité d'exprimer leur virulence, lors d'une infection, et c'est particularité du problème qui sera traité dans notre étude, pratiquement, et d'essayer de cerner le problème posé, sous tous ses aspects.

Les infections du pied diabétique sont un problème majeur lié au diabète dans le monde en raison de la forte prévalence du diabète dans la population. L'ulcération diabétique du pied représente un problème médical, social et économique mondial majeur. C'est le critère de jugement majeur le plus fréquent des complications diabétiques. La neuropathie diabétique et les maladies vasculaires périphériques sont les principaux facteurs étiologiques de l'infection du pied et peuvent agir seuls, ensemble ou en association avec d'autres facteurs tels que les maladies microvasculaires, les anomalies biomécaniques, la mobilité articulaire limitée et la susceptibilité accrue à l'infection. (**Prabhu et al .,2015**)

Les infections humaines chroniques, y compris les plaies chroniques, constituent 60 à 80 % de toutes les maladies infectieuses humaines (**Costerton et al .,1995**). Les personnes atteintes de diabète ont une incidence à vie de 15 à 25 % de développer une infection du pied diabétique (**Armstrong et al .,2017**).

Le développement d'une infection cutanée du pied d'un diabétique est une affection médicale grave qui, si elle n'est pas guérie rapidement, peut entraîner une amputation. Chaque année, les plaies du pied diabétique qui ne cicatrisent pas représentent plus de 100 000 amputations et, chez 60 % des patients, l'événement déclencheur était une infection du pied. (**Dennis et al.,2019**)

Les ulcérations du pied, sont fréquentes chez les patients diabétiques : Près de 25 % d'entre eux, feront une Infection du pied diabétique au cours de leur vie. Secondairement, ces ulcérations s'infectent dans 40-80 % des cas, augmentant significativement, la morbidité et la mortalité des patients. La difficulté de la prise en charge de ces plaies, réside dans la nécessité de différencier les infections, des colonisations). Les patients diabétiques, sont plus exposés que la population générale, aux infections, et en particulier, à celles localisées, au niveau du pied (**Lavigne et al.,2016**).

Le pied diabétique est le résultat de 3 mécanismes physiopathologiques impliqués : la neuropathie diabétique, l'ischémie et l'infection dont la coexistence expose à des infections sévères et étendues pouvant devenir incurables, mettant ainsi en jeu le pronostic fonctionnel voire le pronostic vital. L'infection constitue ainsi une part essentielle dans la genèse du pied diabétique, elle se caractérise la plupart du temps par la multiplicité des souches bactériennes souvent multi résistantes (**Zemmouri et al.,2015**.)

La diversité des bactéries dans les plaies chroniques est considérée comme un contributeur important à la chronicité et à la gravité des infections du pied diabétique (**Sugandhi et al.,2014**)

Introduction

Les biofilms, par définition, sont le phénotype ubiquitaire et naturel des bactéries. Ils sont généralement constitués de populations polymicrobiennes de cellules, qui sont attachées à une surface et s'enveloppent dans des substances polymères extracellulaires hydratées. « Populations microbiennes qui se sont attachées à une surface biologique ou non biologique » est la description la plus élémentaire d'un biofilm médical. Ainsi, la plupart des infections chroniques, y compris bactériennes associées aux plaies chroniques, existent sous forme de communautés de biofilms (**James et al.,2008 ; Dowd et al.,2008**)

Les biofilms bactériens, lors d'infections chroniques, constituent des réservoirs de pathogènes à l'origine de nombreuses infections notamment dans l'infection du pied chez les diabétiques (**Lebeaux et al ., 2012**).

L'interface hôte-micro-organisme joue un rôle majeur dans le développement de infections du pied diabétique. Dans cette infection, les bactéries sont classiquement organisées en pathogroupes fonctionnellement équivalents, où les bactéries pathogènes et commensales se regroupent en symbiose dans un biofilm pathogène pour maintenir une infection chronique. Ce biofilm polymicrobial a été observé à la fois dans des études précliniques utilisant des modèles animaux et dans la recherche clinique sur les infections du pied diabétique. Il représente la principale cause de guérison retardée. (**Dowd et al .,2008**).

Sur la base des souches microbiennes fournies par notre professeur encadreur, Mme BOUSMAHA, et les souches que nous avons-nous même prélevées, nous avons procédé à l'identification de celles-ci par l'étude microscopique, l'étude macroscopique, l'étude par les galeries classiques, et l'étude par les galeries biochimiques.

Une fois, ces souches identifiées, nous avons procédé à la recherche de la formation de biofilms par les méthodes RCA, TCP, TM, l'observation de l'adhésion sous le microscopique et le calcul de l'hydrophobicité.

Notre travail se divise en grandes parties : Synthèse bibliographique, Matériel et Méthodes, Résultats et discussion.

Le but de notre étude, est de déterminer le profil microbiologique des infections du pied diabétique, et d'analyser la distribution des isolats microbiens. Sur la base des différentes méthodes d'étude du biofilm, notre étude a été axée sur l'implication de ces bactéries dans la contribution à la formation de biofilm.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. LA PEAU ET LES INFECTIONS CUTANÉES

I.1. LA MICROFLORE RESIDENTE CUTANÉE

I.1.1. Définition

La flore cutanée résidente désigne des espèces bactériennes ou fongiques viables, commensales, implantées de façon prolongée voire permanente, sur la peau et s'y multipliant. Cette flore n'est, ni passive, ni neutre, et prolifère en fonction des variations climatiques selon le degré d'hygrométrie et de chaleur des sites. La flore retrouvée dans une partie du corps, ne peut, en aucun cas, être considérée comme représentative de la flore totale cutanée, car elle varie de façon considérable d'un site à un autre. Cette flore permanente (tableau 1) constitue, de plus, une barrière efficace contre la colonisation des espèces exogènes, par antagonisme bactérien, et les micro-organismes appartenant à cette flore sont généralement peu virulents, sauf s'ils sont introduits dans l'organisme, après une effraction cutanée (Bojart *et al.*, 2002 ; Fleurette.,1995).

Tableau 1. : Diversité régionale de la flore cutanée-fréquence d'isolement des différentes espèces microbiennes cutanées (Fleurette.,1980).

| Territoires cutanés | Face | Aisselles | Main | Périnée | Espace inter Orteils | Tronc |
|--|------|-----------|------|---------|----------------------|-------|
| Espèces | | | | | | |
| <i>S. epidermidis</i> | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| <i>P. acnes</i> | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Autres staphylocoques à coagulase négative | | ++ | | | | |
| <i>S. aureus</i> | | ++ | | + | | |
| Corynébactéries aérobies | ++ | | + | | + | |
| Streptocoques du groupe A | + | | ++ | ++ | ++ | |
| Autres streptocoques | ++ | | +/- | ++ | +/- | + |
| Entérobactéries | | ++ | + | | + | ++ |
| Acinetobacter | | ++ | + | + | | |
| Champignons | + | | | + | ++ | |
| Anaérobies | + | + | | ++ | | |

I.1.2. Description

Le nombre et le type de micro-organismes, présents sur la peau sont variables d'un individu à l'autre, et d'un site cutané à un autre. La majorité des bactéries est constituée par des bactéries Gram + aérobies avec, comme chef de file, *Staphylococcus epidermidis* (Hisata *et al.*,2003)

Les bactéries anaérobies, telles que *Propionibacterium acnes*, sont cependant largement répandues à la surface de la peau. Des bactéries Gram- sont également retrouvées, mais en quantité moins importante, et dans des sites humides. Des champignons peuvent être aussi isolés (Dessinioti *et al.*, 2017).

I.1.3. Le genre *Staphylococcus*

Il est composé de 35 espèces, dont la moitié, environ, a été isolée sur la peau humaine. Les Staphylocoques, à coagulase négative sont les micro-organismes, le plus souvent retrouvés, avec trois espèces dominantes : *Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus* et *S. hominis*. *S. epidermidis* représente l'espèce la plus fréquente et se retrouve dans pratiquement dans toutes les zones cutanées, et constitue plus de la moitié de l'ensemble des staphylocoques cutanées, avec une densité allant de 10^4 à 10^6 UFC/cm², dans certaines régions chaudes et humides du corps (Brun *et al.*, 2003). *S. haemolyticus* et *S. hominis*, sont localisés préférentiellement au niveau des bras, des jambes et des espaces interdigitaux (Ken Hisata *et al.*, 2003).

Synthèse bibliographique

Outre la prédominance des Staphylocoques, à coagulase négative, la présence de *S. aureus* a été également décrite (tableau 2) :

- Les Staphylocoques à coagulase négative : Sont rarement pathogènes chez l'individu sain, mais souvent associés à des infections chez l'individu immunodéprimé. Bien que commensaux, ils peuvent être à l'origine d'auto-infections, notamment grâce à leur capacité d'envahissement des tissus (**Brun et al., 2003**).
- Staphylocoques *S. aureus* : Présente un intérêt particulier puisqu'il constitue une des premières causes d'infections à la suite d'une lésion de la peau après abrasion ou brûlure provoquant ainsi, une infection sous forme « d'impétigo » ou d'un abcès. Les sujets diabétiques présentent une sensibilité (**Brun et al., 2003**).

Tableau 2. Espèces prédominantes des Staphylocoques de la flore résidente selon leur localisation (Kloos.,1986).

| Site cutané | Espèces de Staphylocoques prédominantes | | | | |
|-----------------------|---|------------------|---|-------------------|-----------------------|
| | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. aureus</i> | <i>S. hominis</i> / <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. capitis</i> | <i>S. auricularis</i> |
| Cuir chevelu | | | | +++ | |
| Oreille | | | | ++ | ++ |
| Fosses nasales | +++ | ++ | | | |
| Face | +++ | | ++ | | |
| Aisselles | +++ | | ++ | | |
| Avant-bras | ++ | | ++ | | |
| Périnée | +++ | + | ++ | | |
| Jambe | ++ | | +++ | | |
| Espaces interdigitaux | +++ | | ++ | | |

I. 1.4. Le genre *Propionibacterium*

Il est composé de bactéries à Gram+ anaérobies non sporulées qui sont des habitants habituels des follicules pileux et des glandes sébacées. Les espèces de *Propionibacterium* par leur anaérobiose colonisent les régions pauvres en oxygène. Cependant la présence d'oxygène n'empêche pas leur croissance puisqu'elles possèdent une catalase ou une superoxyde dismutase, et sont parfois impliquées dans certaines pathologies opportunistes. (**Achermann et al., 2018**).

Trois de des bacilles sont présents sur la peau (**Fleurette.,1995 ; Wilson., 2005**) :

1/*Propionibacterium acnes*: Leur densité peut atteindre 8.10^4 bactéries par follicule pilo-sébacé.

2/*Propionobacterium avidum* : au niveau des régions riches en sébum (face, dos, cuir chevelu).

3/*Propionibacterium granulosum* : au niveau des zones humides et riches en sébum.

Ces espèces sont catalases positives, mais la 4^{ème} espèce *P. propionicum* est catalase négative (**Fleurette., 1995 ; Wilson., 2005**).

I.1.5. Le genre *Corynebacterium*

Ces bactéries à Gram + pléiomorphes sont fréquemment appelées « diphtéroïdes », et leur répartition s'effectue sur la base de leur affinité pour les lipides. On distingue :

1/Les Corynébactéries lipophiles : (*C. jeikeium*, *C. urealyticum*) sont principalement présentes au niveau de : périnée, plis inguinaux, axillaires et des mains.

2/Les Corynébactéries non lipophiles :(*C. minutissimum*, *C. xerosis*, *C. amycolatum*, *C. striatum*), se retrouvent dans les zones humides à taux de lipides réduit (**Fleurette., 1995**).

Elles sont impliquées dans la production d'odeurs corporelles à partir d'hormones. Ces bactéries commensales ne produisent pas de toxines (Chiller et al., 2001).

I.1. 6. Bacilles à Gram négatif

Ce sont des composants inhabituels de la flore résidente de la peau, du fait de la sécheresse de celle-ci. Ils sont plus habituellement retrouvés dans la flore transitoire à la suite d'une contamination gastro-intestinale. Ces bactéries peuvent s'intégrer dans la flore résidente au niveau des aires intertrigales humides ou des surfaces des muqueuses (périnée, plis axillaires et les espaces entre les orteils).

I. 1. 7. Autres micro-organismes retrouvés sur la peau

D'autres genres bactériens peuvent être isolés sur la peau tels que *Micrococcus* (Fleurette.,1995), ainsi que le genre *Brevibacterium* qui est à l'origine d'odeurs corporelles au niveau des pieds (Chiller et al., 2001). Des champignons sont également isolés, comme les levures du genre *Malassezia* (*Pityrosporum*) présentes dans les régions riches en sébum (thorax, dos face) (Ljubojevic et al.,2002).

I.2. MODIFICATIONS DE LA FLORE CUTANEE

Bien que la composition de la flore résidente semble relativement constante, plusieurs facteurs peuvent interférer sur la quantité et le taux de chacun des micro-organismes résidents. Ces facteurs peuvent être à la fois des facteurs endogènes propres aux individus ou secondaires aux modifications de l'environnement ou à l'influence d'autres micro-organismes.

I.2.1. Facteurs liés à l'individu

I.2.1.1. Facteurs Physiques

Température corporelle

Alors que la température du corps humain est maintenue à 37 °C, la température de la peau est plus basse et se situe aux environs de 33°C, et certains sites sont physiologiquement plus froids (30°C au niveau des doigts et de la plante des pieds), (34°C-35°C au niveau des aisselles et de l'abdomen).

Humidité

L'eau présente à la surface de la peau provient majoritairement de l'atmosphère, des glandes sudorifères et du sang. Cette quantité est généralement peu élevée en raison de la présence de kératinocytes morts et de nombreux lipides. Les zones sèches sont généralement moins colonisées que les zones humides, cependant certaines bactéries à Gram + peuvent s'adapter à cette situation.

(Bojart et Holland.,2002) ont démontré l'augmentation de la quantité entraînerait un accroissement du nombre de Staphylocoques et de *Corynebacterium*. Les bacilles à Gram -, prolifèrent dans les plis humides (inter orteil).

Ph

Le pH de la peau est acide (4.5-6), en raison de la sécrétion de sueur et de la présence d'acides gras, et les bactéries se développent plutôt à pH neutre. D'autres facteurs interviennent également dans cette acidité cutanée, tels que la sécheresse de la peau.

I.2.1.2. Facteurs chimiques

Salinité

L'évaporation de l'eau contenue dans la sueur entraîne un dépôt de sels présents dans cette même substance. La concentration en NaCl peut atteindre 100 mM dans des zones comportant de nombreuses glandes. La présence de sels à de fortes concentrations dans certaines régions, entrave le développement des bactéries, mais les Gram + parviennent à se développer. La majorité des Staphylocoques à coagulase négative est halotolérante, et peuvent donc se multiplier, ce qui favorise leur prédominance sur la peau (**Bojart et al.,2002 ; Wilson et al., 2005**).

Présence de nutriments

Les nutriments sont apportés par la sueur (Vitamines, Acides aminés), le sébum (lipides, acides aminés), les débris cellulaires (cellules humaines ou bactériennes mortes), ou les autres bactéries.

Les follicules pileux contiennent aussi de nombreux nutriments. Ces substances (protéines, collagène, acides aminés, ADN, ARN et autres facteurs de croissance sont utilisés par les micro-organismes grâce à l'action de leurs enzymes (**Bojart et al.,2002**).

Age et Sexe

La colonisation de la peau commence à la naissance. La peau du nouveau-né est stérile et se colonise dès les premiers contacts avec le monde extérieur. Les bactéries Coroniformes sont largement retrouvées dans la flore du nouveau-né, mais aussi *S. epidermidis*. Les jeunes enfants possèdent une microflore plus variée comportant plus de bacilles à Gram – et bactéries potentiellement pathogènes. L'homme héberge une flore plus abondante et plus variée que celle de la femme, due à la sudation et au sébum (**James et al.,1992**).

Localisation et topographie de la peau

Une flore bactérienne caractérise chacune des trois régions de la peau :

- Plis axillaires, périnée et espaces interdigitaux des orteils (hébergeant plus de micro-organismes).
- Mains, visage et tronc.
- Bras et jambes (**Patrick et al.,2013**)

Modifications pathologiques

Des pathologies peuvent apparaître, à la suite de :

- Une occlusion (pansement étanche) qui augmente l'humidité et la température.
- L'usage de corticoïdes ou de matériel étranger (cathéters, prothèses).
- Une peau lésée (plaies, brûlures, effractions).
- Les déficits immunitaires et leucocytaires (**Patrick et al.,2013**)

Certaines maladies peuvent être causées par des variations d'adhérence des bactéries. Elles peuvent constituer également des facteurs de prédisposition à la colonisation par des micro-organismes variés. C'est le cas du **diabète** par exemple, où une augmentation du taux de sucre dans le sang favorise le portage nasal à *S. aureus*. De même que les sujets diabétiques ont une prévalence augmentée aux infections fongiques à *Candida* (**James et Roth.,2002**).

I.2.1.3. Facteurs exogènes

Climat, Atmosphère et Rayons U.V

Une température et une humidité élevées augmentent la densité de colonisation bactérienne (**Bride.,1992**). La flore résidente est composée de bactéries aérobies strictes (certaines bactéries Corényformes), des bactéries aérobies facultatives (*Staphylococcus* spp.), et de bactéries micro-aérophiles (*Propionibact.* spp.) .C'est pourquoi la colonisation cutanée par ces bactéries dépend de la pression partielle en O₂ et en CO₂ au niveau de la peau. (**Bride.,1992**) L'exposition à certains rayons UV a permis d'observer des diminutions des populations de certains organismes Comme *Pityrosporum* et *Candida* (**Patrick et al.,2013**).

Savons et désinfectants

Les lavages répétés avec des savons peuvent alcaliniser la peau et induire une augmentation des Propionibactéries. Les antiseptiques ou biocides utilisés pour la désinfection de la peau peuvent provoquer une diminution des flores transitaire et résidente. La peau devient plus vulnérable aux espèces pathogènes.

Hospitalisation et Traitements médicamenteux

Corynebacterium jeikeium, bactérie résistante à la plupart des antibiotiques, est retrouvée, avec une fréquence considérable chez les sujets hospitalisés (**Leyden et Mc Ginley.,1992**). Les traitements médicaux peuvent induire des modifications très rapides de la flore cutanée. Les antibiotiques peuvent éliminer la flore normale qui sera remplacée par des micro-organismes pathogènes. Les corticoïdes en agissant sur le système immunitaire peuvent augmenter la sensibilité aux infections bactériennes fongiques, virales et parasitaires (**Larson et al.,1986**).

I.2.1.4. Facteurs bactériens

Colonisation par d'autres bactéries

Sur la peau, les bactéries sont continuellement en compétition. Certaines bactéries produisent des substances qui inhibent le développement d'autres bactéries, comme par exemple des antibiotiques à large spectre pour les bactéries à Gram négatif, et à spectre plus étroit pour les bactéries à Gram + (*S. epidermidis* produit certaines molécules à activité antibiotique comme : épidermine, épilancine..).

Facteurs présents sur la bactérie

Certaines bactéries possèdent des facteurs qui leur permettent de coloniser la peau notamment : les protéines A, les acides téichoïques, les acides lipotéichoïques, les auto lysines et les fibrinogènes binding proteins (**Kodjikian et al.,2005**).

Ces molécules sont responsables de l'adhérence des bactéries aux surfaces vivantes ou inertes, et donc de La formation de « biofilms », phénomène lié à la virulence des bactéries. Certaines enzymes (kératinase, ADN ase.), permettent aussi cette colonisation par modification des nutriments présents sur la peau ou par lutte contre certaines défenses humaines (la cystéine protéase de *S. epidermidis* peut, par exemple, inactiver des IgA sécrétoires et des IgM (**Brueggemann.,1997**).

I. 3. LES INFECTIONS BACTERIENNES CUTANÉES

Les infections bactériennes de la peau et des tissus mous sont fréquentes, constituant une part non négligeable de l'activité de routine de laboratoire de bactériologie. Ce type d'infections regroupe des formes cliniques très divers selon la nature du tissu infecté (épiderme, derme, hypoderme, aponévrose, muscle.) (Plainvert et al., 2016).

I.3.1. Les infections et les suppurations :

Divers microorganismes, principalement ceux de l'organe cutané sont impliqués dans les infections de cet organe (Tableau 3). En fonction de la profondeur du tissu atteint, on distingue trois classes de suppurations qui sont les suivantes (Plainvert.,2016).

- Suppurations de classe I : les plus profondes, normalement fermées et stériles, sans communications avec l'extérieur
- Suppurations de classe II : elles communiquent ou ont communiqué avec un site anatomique colonisé par la flore commensale cutanée susceptible de contaminer les prélèvements (suppurations fistulisées).
- Suppurations de classe III : superficielles et ouvertes avec une forte colonisation par la flore commensale cutanée.

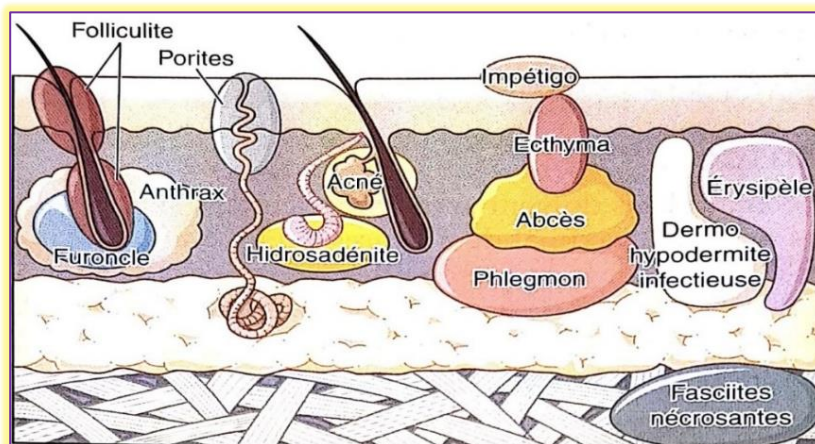


Figure1 : Localisation anatomique des infections de la peau (Plainvert.,2016)

Tableau 3 : Principaux germes identifiés en fonction du type de lésion (Bowler PG et al.,2001)

| Tissus non nécrosés | | Tissus nécrosés | |
|---------------------|--|---------------------|--|
| Tableau | Germes | Tableau | Germes |
| | Les plus fréquents | | Usuels |
| Abcès cutané | <i>Staphylococcus aureus</i> | Cellulite anaérobie | <i>Clostridium perfringens</i> <i>Mélanges anaérobies</i> |
| Anthrax | <i>S.aureus</i> | Fasciite nécrosante | <i>Mélanges aéro anaérobies</i> <i>S.pyogenes</i> |
| Cellulite | <i>S.aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> | Gangrène gazeuse | <i>C. perfringens</i> <i>C. septicum</i> |
| Ecthyma | <i>S. aureus</i> <i>S. pyogenes</i> | Progressif | <i>S. spp</i> <i>S.aureus</i> |
| Erythrasma | <i>C. minutissimum</i> | | |
| Érysipèle | <i>S. pyogenes</i> | | |
| Folliculite | <i>S.aureus</i> | | |
| Furoncle | <i>S. aureus</i> | | |
| Impetigo | <i>S. pyogene</i> / <i>S.aureus</i> | | |
| Panaris | <i>S. aureus</i> | | |

II. LE PIED DIABÉTIQUE

Le diabète est défini comme une affection chronique due soit à une insuffisance génétique ou acquise de la production d'insuline par le pancréas, soit au fait que cette insuline n'est pas assez active. Cette insuffisance provoque une augmentation de la glycémie (concentration du glucose dans le sang), qui conduit, à son tour, à des lésions affectant plusieurs appareils ou systèmes, e, particulier, les vaisseaux et les nerfs (OMS-AM,2016). Deux types de diabète sont décrit » **Le diabète de type 1** : dû à la destruction auto-immune des cellules insu lino-sécrétrices β , des îlots de Langerhans du pancréas. L'hyperglycémie apparaît, lorsqu'il ne reste plus que 10-20% des cellules β fonctionnelles. Il est appelé aussi « diabète insu lino dépendant ». **Le diabète de type 2** résulte de la conjonction de plusieurs gènes de susceptibilité, dont l'expression dépend de facteurs d'environnement, au premier rang comme la consommation excessive de graisses saturées, de sucres rapides et de sédentarité. (Ciangura et al., 2013)

Le pied diabétique est souvent un handicap redouté, avec de longues périodes d'hospitalisation, et des dépenses impossibles et croissantes, avec un résultat final menant souvent à un membre amputé. Le membre fantôme jouant son propre rôle cruel sur la santé mentale du patient déjà détériorée. Le pied diabétique, est l'une des complications les plus redoutées du diabète. Il est caractérisé par une triade classique de neuropathie, ischémie et infection (Pendsey., 2010)

II.1. DEFINITION

Le pied diabétique (LPD), désigne l'ensemble des atteintes affectant une ou plusieurs structures constituant le pied, c'est-à-dire les nerfs, les ligaments, les os et les articulations, atteintes causées par le diabète et/ou par ses conséquences. Afin de mieux cerner les pathologies qui concernent le pied, il est important d'en préciser brièvement ses rapports anatomiques et sa fonctionnalité. (Lavigne.,2016).

II.2. ANATOMIE

Le pied est un organe complexe, constitué de différentes structures, assurant une parfaite coordination entre elles, pour permettre autant de supporter le poids du corps, que d'assurer une marche stable.

Il est constitué de 26 os, et de 107 ligaments, en plus des articulations, des muscles, des tendons, des nerfs, des vaisseaux, assurant l'aspect nourricier et fonctionnel.

C'est dire l'importance de cet organe situé en position distale du corps, possédant un réseau extrêmement fin et élaboré de vaisseaux sanguins, dont l'atteinte par l'hyperglycémie chronique, altère la fonction et peut causer un handicap à vie. Les os du pied, sont divisés en trois segments distincts : l'arrière-pied constitué de l'astragale et du calcaneum ; le médio-pied regroupant les Cuboïde-Scaphoïde-Cunéiformes, l'avant pied, constitué des métatarsiens et des phalanges (Figure 2). Sur le plan cutané on distingue trois régions : la région médiale du pied, la peau est plus fine ; le faciès plantaire, la peau est plus épaisse, en avant, et surtout, au niveau du talon et la couche cellulaire sous-cutanée, riche en graisse, est plus épaisse au niveau du talon, que la région antérieure (Moon., 2019)

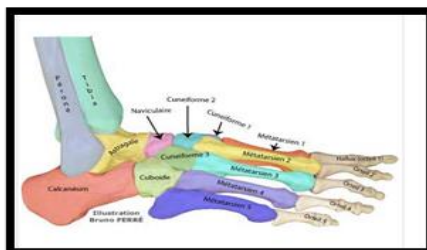


Figure 2 : Les os du pied
(Vazquez-Zorrilla et al., 2020)

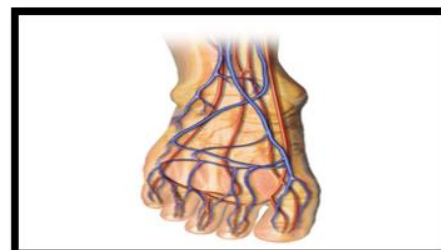


Figure 3 : Vascularisation du pied
(Vazquez-Zorrilla et al.,2020)

II.3. ÉTIOLOGIE

Il existe de multiples forces à l'œuvre dans le développement des ulcères du pied diabétique (**Boulton et al., 2008**). Les quatre principales branches de la physiopathologie comprennent la neuropathie, l'ischémie, le dysfonctionnement nutritionnel et l'infection. Un pied bien perfusé est plus résistant à l'ulcération et à l'infection qu'un pied qui souffre d'une maladie vasculaire périphérique. Chez les personnes atteintes de diabète, cela est encore compliqué par la diminution de l'efficacité de la perfusion causée par la neuropathie autonome où il y a moins de recrutement de capillaires et de dérivation du sang autour des lits capillaires. La neuropathie provoque non seulement une diminution de la sensation, mais une perte de glandes sudoripares et sébacées qui entraîne une peau sèche et une diminution de la réponse neuro-inflammatoire aux stimuli nocifs. De plus, la glycosylation des tendons entraîne un raidissement et un raccourcissement qui peuvent provoquer des déformations du pied (orteils en griffes, orteils en marteau) et un raidissement du tendon d'Achille qui augmente la pression sur l'avant-pied (**Heather.,2021**).

La connaissance des étiologies microbiennes des infections des pieds diabétiques, est essentielle à la gestion efficace et au traitement du pied diabétique, y compris l'antibiothérapie et la résistance des bactéries (**Stock et al., 2004**). Les principaux germes identifiés, au niveau du pied diabétique sont donnés dans le tableau 4.

Tableau. 4 : Germes identifiés dans les infections du pied diabétique (**Plainvert et al.,2016**).

| Aspect de la plaie | Germes usuels |
|--------------------|--|
| Superficielle | Staphylococcus aureus, Streptocoques β -hémolytiques |
| Chronique | S.aureus, streptocoques β -hémolytiques, Entérobactéries |
| Lésion macérée | Pseudomonas en association à d'autres espèces bactériennes |
| Ulcère>6mois | Polymicrobisme : S. aureus, Streptocoques β hémolytiques , Entérobactéries , enterocoques , Corynébacterues, Pseudomonas , Bacilles à Gram négatifs non fermentatifs |
| Nécrose , gangrène | Cocci à Gram positif aérobie, Entérobactéries, Pseudomonas, bacilles à Gram négatif non fermentatifs, anaérobies stricts. |

II.4. ÉPIDEMIOLOGIE

Les infections diabétiques du pied sont des infections courantes chez les patients diabétiques. L'incidence des infections du pied diabétique est plus fréquente chez les patients âgés atteints de comorbidités. Les hommes et les femmes sont également touchés (**Heather.,2021**).

Selon l'OMS, le nombre de personnes diabétiques au niveau mondial est passé de 108 à 422 millions au cours des 30 dernières années.

La mortalité est rare, sauf dans des circonstances inhabituelles. Le risque de mortalité est plus élevé chez les patients atteints d'ostéomyélite chronique, ceux qui ont des infections nécrosantes aiguës des tissus mous et ceux qui ont des problèmes sous-jacents supplémentaires affectant le système immunitaire (**Heather.,2021**).

II.5. PHYSIOPATHOLOGIE DU PIED DIABETIQUE

II.5.1. L'infection du pied diabétique

L'infection d'un pied diabétique est une condition menaçant le membre car ses conséquences sont plus désastreuses qu'ailleurs, principalement en raison de certaines particularités anatomiques. Le pied a plusieurs compartiments, qui communiquent entre eux et l'infection peut se propager d'un compartiment à un autre, parfois l'absence de douleur permet au patient de continuer à marcher, ce qui facilite encore la propagation. Le pied a également des tissus mous, qui ne peuvent pas résister à l'infection, comme l'aponévrose plantaire, les

tendons, les gaines musculaires et le fascia. Une combinaison de neuropathie, d'ischémie et d'hyperglycémie aggrave la situation en réduisant le mécanisme de défense (Pendsey.,2010).

L'infection est considérée comme un envahissement des tissus par des microorganismes avec pour conséquences la destruction tissulaire et la réponse inflammatoire de la part de l'hôte (Bernard et al.,2007). L'infection est souvent superficielle, mais dans certains cas, elle peut s'étendre en profondeur dans les tendons, muscles, os et articulations (Labani.,2016).

Trois facteurs sont incriminés dans le développement du pied diabétique, par suite d'une infection cutanée, aggravée par l'hyperglycémie présente : La Neuropathie- l'Artériopathie- Les anomalies ostéoarticulaires.

II.5.2. Stades de l'infection

Il est bien démontré par la littérature que trois variables importantes sont interalliées dans la progression vers l'infection : le nombre de bactéries, le type de bactéries car leur virulence est plus ou moins grande selon les espèces, et la résistance de l'hôte. Dans le cas du pied diabétique, cette infection est en règle secondaire à une plaie cutanée (Bernard et al.,2007). L'évolution de l'infection du pied diabétique de la plaie vers la nécrose est illustrée dans la figure 4.

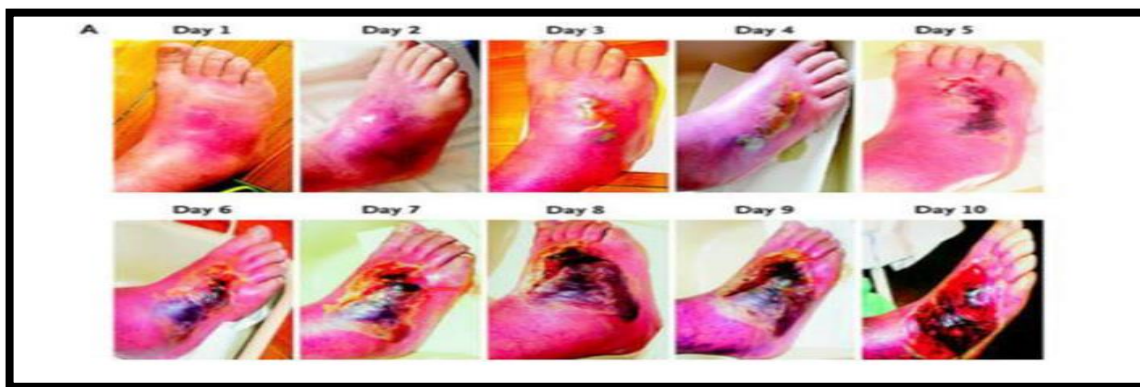


Figure 4 : Infection du pied diabétique (Tobalem et al.,2013).

En novembre 2016, l'*International Wound Infection Institute* (IWII) publiait un consensus faisant état des avancées scientifiques quant à la compréhension de l'évolution de la charge microbienne dans les plaies chroniques. Le tableau ci-dessous présente le continuum de l'infection des plaies. Il décrit les différents stades, les signes, les symptômes et les réponses de l'hôte à la virulente prolifération des microorganismes dans sa plaie.

Tableau 5 : Evolution de la flore microbienne et les signes cliniques (Dow et al.,2013)

| Durée d'évolution | Type de microorganismes | Signes cliniques et résultats des analyses |
|--------------------|--|--|
| Quelques jours | Flore cutanée | |
| 1 à 4 semaines | Flore cutanée accompagnée de coques Gram positif, souvent du streptocoque bêta hémolytique et <i>S. aureus</i> | <ul style="list-style-type: none"> ■ Écoulement purulent ■ Gram positif ■ Espèce unique |
| 4 semaines et plus | Flore cutanée accompagnée de bactéries anaérobies Gram négatif facultatives, tout particulièrement de coliformes, suivies de bactéries anaérobies et de <i>Pseudomonas</i> | <ul style="list-style-type: none"> ■ Nécrose des tissus ■ Ulcération extensive ■ Atteinte profonde ■ Mélanges polymicrobiens de pathogènes aérobie et anaérobies |

Source : AIIAO, 2013. Tiré de Dow et al., 1999. Reproduit avec la permission de HMP Communications.

II.5.3. La Neuropathie

La neuropathie produite par le diabète sucré est une polyneuropathie symétrique, dans laquelle les fonctions motrices, sensorielles et autonomes sont affectées à des degrés divers. Chez certains patients, les fibres motrices périphériques de la myéline sont affectées selon un schéma dépendant de la longueur, les nerfs les plus longs étant affectés en premier, ce qui entraîne une distribution de stockage de la perte ensorielle/motrice. La perte du réflexe d'Achille est le premier signe de ces changements (Bandyk.,2019). Elle concerne les trois types de fibres sensibles, motrices et végétatives. L'atteinte de chacune de ces fibres, sera à l'origine de manifestations cliniques spécifiques :

- L'atteinte des fibres sensibles : responsable d'une hypoesthésie et rend compte d'une absence de douleurs.
- L'altération des fibres motrices : entraîne une amyotrophie des muscles, responsable de la déformation du pied, et du déséquilibre de la statique.
- L'atteinte des fibres végétatives : est à l'origine d'un œdème au niveau du pied, et de l'ouverture des shunts artério veineux, ce qui diminue l'efficacité de la perfusion sanguine, ayant pour conséquence une sécheresse de la peau, facilitant l'apparition de fissures et donc une porte d'entrée de germes (Sekkal.,2016).

II.5.4. L'artériopathie

L'atteinte artérielle est différente chez le patient diabétique par rapport au sujet non diabétique. L'atteinte du contenant provoque la perturbation des fonctions des cellules endothéliales tapissant la paroi vasculaire, notamment le métabolisme du monoxyde d'azote, à l'origine du stress oxydatif et l'atteinte de la paroi vasculaire elle-même. L'Atteinte du contenu cause : l'anomalie de la fibrinolyse et de la coagulation du sang qui s'associe aux atteintes de la paroi vasculaire, exposant le diabétique à un athérome accéléré ; l'artériosclérose atteint les artères de tout petit calibre ($< 500\mu$), et les artéoles, ce qui en résulte une ischémie chronique ; la médiacalcosse affecte les artères musculaires de faible diamètre (dépôt de micro- calcification), qui confère à la paroi artérielle une certaine rigidité, rendant les artères incompressibles puis l'athérosclérose atteint les grosses artères élastiques et musculaires (Kota et al.,2013).

III.5.5. L'Ostéopathie

C'est la première complication diabétologique décrite, toutefois rare, affectant principalement les articulations du pied. Cependant, d'autres localisations ont été décrites notamment au niveau du genou, de la hanche, du poignet. L'ostéoarthropathie est une maladie dévastatrice, chronique et progressive des os et articulations. Elle est caractérisée par la destruction d'une ou plusieurs articulations sur un terrain de neuropathie et est paradoxalement peu, voire non douloureuse (Ha Van.,1990).

Tableau 6 : Ecologie des ostéites du pied chez le diabétique (Plainvert.,2016)

| Bactéries/ Références | Wheat et al., 1986, Arch Intern Med | Newman et al., 1991, JAMA | Lavery et al., 1995, J Foot Ankle Surg | Senneville et al., 2006, Clin Infect Dis | Aragon- Sanchez et al., 2008, Diabetologia | Aragon- Sanchez et al., 2010, Diabetic foot Ankle | Malizos et al., 2010, Injury | Lesens et al., 2011, Clin Microbiol Infect | Elamurugan et al., 2011, Int J Surg |
|--------------------------------|--|------------------------------------|---|---|---|--|---------------------------------------|--|---|
| Cocci à Gram positif | | | | | | | | | |
| <i>S. aureus</i> | 40 % | 31 % | 47 % | 26 % | 47 % | 38 % | 86 % | 33 % | 31 % |
| SCN | 10 % | 50 % | 11 % | 26 % | 11 % | 12 % | 10 % | 14 % | – |
| Streptocoques | 45 % | 27 % | 61 % | 12 % | 3 % | 1 % | – | 9 % | 3 % |
| <i>Enterococcus</i> spp. | 30 % | 8 % | 28 % | 8 % | 1 % | – | 18 % | 12 % | – |
| Autre | 10 % | – | – | 2 % | – | – | – | 4 % | 2 % |
| Bacilles à Gram négatif | | | | | | | | | |
| Entérobactéries | 55 % | 20 % | 14 % | 18 % | 29 % | 36 % | 11 % | 18 % | 32 % |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | 5 % | 15 % | 11 % | 2 % | 9 % | 10 % | 43 % | 2 % | 19 % |
| <i>Acinetobacter</i> spp. | – | – | – | – | – | 3 % | – | – | 13 % |
| Anaérobies | 60 % | 4 % | 15 % | 5 % | – | – | – | 4 % | – |
| Polymicrobien | 70 % | ND | 83 % | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

ND, non déterminé; SCN, staphylocoques à coagulase négative.

II.5.6. Le pied de Charcot

Le **pied de Charcot**, appelée par les spécialistes « **ostéoarthropathie diabétique** », est une complication du diabète (le plus souvent de type 2) qui se manifeste par une déformation souvent sévère du pied (**Trieb et al., 2016**). C'est l'évolution ultime de l'ostéo-arthropathie diabétique. Le pied est entièrement déformé avec affaissement de la voûte plantaire, avec un risque élevé de lésions, avec une destruction progressive, indolore atteignant plusieurs articulations du pied (**Stock et al., 2004**).



Figure 5 : Le pied de Charcot (Jayeesh.,2020).

II.6. CLASSIFICATION DE L'INFECTION DU PIED CHEZ LE DIABETIQUE

L'objectif d'une classification des plaies du pied du diabétique, est :

- Documenter et grader la sévérité de la plaie.
- Evaluer le pronostic (délai de cicatrisation et risque d'amputation).
- Permettre une prise en charge standardisée et adaptée à chaque type de plaie (**Platonpetrides, 1981**).

Il existe quatre types de classifications :

1. Classification WAGNER (tableau 07)
2. Classification UT (université du Texas)
3. Classification PEDIS (tableau 08)
4. Classification IWGDF (International working group on the diabetic foot).

Tableau 7 : Classification de WAGNER (Orioli et Vandeleen, 2003).

| Grade | Description |
|---------|--|
| Grade 0 | Pas de lésion ouverte, mais présence possible d'une déformation osseuse ou d'hyperkératose |
| Grade 1 | Ulcère superficiel sans pénétration dans les tissus profonds |
| Grade 2 | Ulcère profond vers les tendons ou l'os, les articulations sans abcès ni ostéite |
| Grade 3 | Ulcère profond avec abcès, ostéite ou arthrite septique |
| Grade 4 | Gangrène d'un orteil ou de l'avant-pied le plus souvent associée à une infection plantaire |
| Grade 5 | Gangrène massive du pied associée à des lésions nécrotiques et à une infection des tissus mous |

Tableau 8: Classification de l'infection du pied diabétique PEDIS (Orioli et Vandeleen, 2003).

| Sévérité de l'infection (IDSA) | Grade PEDIS | Critères cliniques |
|--------------------------------|-------------|--|
| Non infectée | Grade 1 | Pas de symptôme, ni de signe d'infection |
| Légère | Grade 2 | Atteinte cutanée uniquement (sans atteinte des tissus sous-cutanés, ni systémique) avec au moins deux des signes suivants : - chaleur locale - érythème > 0,5-2 cm autour de l'ulcère - sensibilité locale ou douleur - tuméfaction locale ou induration - décharge purulente (sécrétion épaisse, opaque à blanchâtre ou sanguinolente) Les autres causes de réaction inflammatoire de la peau doivent être éliminées (par exemple traumatisme, goutte, pied de Charcot aigu, fracture, thrombose, stase veineuse) |
| Modérée | Grade 3 | - Érythème > 2 cm et une des constatations décrites ci-dessus ou - infection atteignant les structures au-delà de la peau et du tissu sous-cutané, comme un abcès profond, une lymphangite, une ostéite, une arthrite septique ou une fasciite. Il ne doit pas y avoir de réponse inflammatoire systémique (voir grade 4) |
| Sévère* | Grade 4 | Quelle que soit l'infection locale, si présence de signes systémiques (SRIS) manifestée par au moins deux des caractéristiques suivantes : température > 38 ou < 36 °C fréquence cardiaque > 90 battements/min fréquence respiratoire > 20 cycles/min PaCO ₂ < 32 mmHg leucocytes > 12000 ou < 4000/mm ³ ≥10 % de formes leucocytaires immatures |

IDSA, Infectious Diseases Society of America; SRIS : syndrome de réponse inflammatoire systémique.
 * L'ischémie peut augmenter la gravité de toute infection, et la présence d'ischémie critique rend souvent l'infection sévère. L'infection systémique peut parfois s'associer à d'autres situations cliniques, comme l'hypotension, la confusion, les vomissements, ou des troubles métaboliques, tels que l'acidose, l'hyperglycémie sévère et une azotémie d'apparition récente.

III. LES BIOFILMS

III.1. DEFINITION

Le terme de « biofilm » a été proposé en 1978 pour désigner une communauté de micro-organismes enrobés d'une matrice hydratée, riche en polymères extra-cellulaires, et en contact avec une surface. Il est, maintenant associé à de nombreuses formations microbiennes caractérisée par l'expression de propriétés biologiques originales en comparaison avec des organismes isolés, en suspension (Lebeaux et al., 2012).

III.2. CYCLE DE VIE DES BIOFILMS

La formation du biofilm passe par plusieurs étapes. La figure 6 schématise les principales étapes conduisant à un biofilm mature, puis la reprise du cycle de biofilmisation.

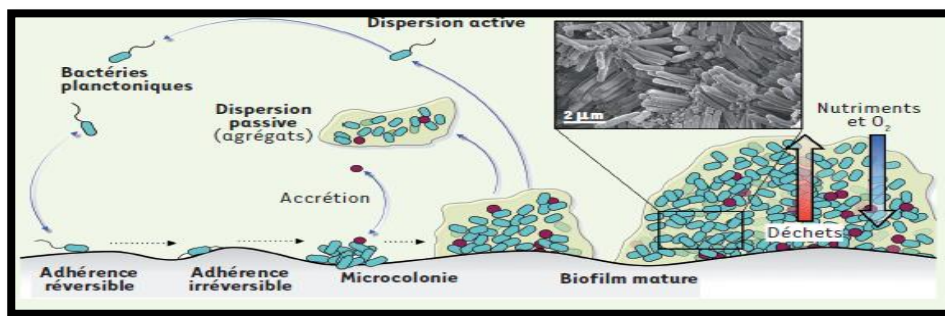


Figure 6 : Représentation schématique du cycle de la vie d'un biofilm (Lebeaux et al.,2012)

III.2.1. Mise en place d'un film conditionnant

Cette étape est rapide, elle a lieu quelques minutes après l'exposition d'une surface propre à un fluide contenant des micro-organismes. Avant qu'une surface ne soit exposée dans un milieu liquide, elle est chargée soit négativement ou positivement. Après l'exposition au milieu, la surface acquiert des molécules de charges différentes.

III.2.2. L'étape de transfert

L'interaction bactérie-surface est influencée par une étape préalable, « l'étape de transfert » vers la surface « cible » conditionnée (Rijnaarts et al.,1993 ; Van Loosdrecht et al., 1990).

Le transfert des micro-organismes vers la surface du matériau combine l'action :

- Des forces convectives du milieu (résultant de l'agitation turbulente du fluide)
- De la diffusion brownienne de la bactérie (assimilée à une particule d'un diamètre moyen apparent variable selon l'espèce de 0.1 à 5 µm) (Schiling.,1968).
- La Sédimentation des micro-organismes associés à une particule de densité variable.
- Implication des flagelles.
- La bactérie, même équipée de chimiorécepteurs, n'a pas le moyen d'orienter son déplacement sur de longues distances met à profit cette capacité de reconnaissance de son environnement chimique sur de courtes distances souvent proches de la surface du matériau.

III.2.3. L'Adhésion réversible et irréversible

Cette étape est rapide et n'impose pas que l'organisme soit vivant. et tout matériau en contact avec un fluide véhiculant des bactéries se verra quand même déposer à sa surface. La théorie générale connue sous le nom de DLVO permet de décrire l'adhésion d'une bactérie à un matériau. Ce modèle DLVO : Derjaguin- Landau- Verwey- Overbeet, décrit la stabilité des colloïdes dans l'eau et considère l'équilibre entre deux types de forces interfaciales : Les forces de dispersion attractives (London- Van Der Waals) ; les forces de répulsion électrostatiques de Coulomb (Appenzeller et al.,2002).

L'adhésion irréversible des bactéries implique le fait que les organismes immobilisés soient vivants (ce qui n'était pas une condition clé dans l'étape réversible. Capable de reconnaître leur position proche d'une surface, sans doute à l'aide d'osmorécepteurs comme le système EnvZ-OmpR 5 (Vidal et al .1998). Elles expriment un certain nombre de gènes et synthétisent en particulier une grande quantité d'exo polymères organiques impliqués dans < l'ancrage irréversible > des bactéries à leur support (Davies et Geesey.,1995 ; McKenney et al.,1998 ; Neu et Marshall.,1990 ; Stoodley et al.,1994). Le terme « irréversible » implique que l'arrachage des bactéries de la surface nécessite alors une force capable de rompre ces exo polymères ou de les dégager de leur multiple point d'interaction avec le matériau. Cette phase est donc considérée comme une étape charnière temps-dépendante, en liaison avec l'acquisition de nouvelles structures adhésives par la bactérie : flagelles latéraux, fimbriae, exo polymères (Sutherland.,1984) très important dans la mise ne place d'interactions irréversibles (Lappin-Scout et Costerton.,1989). La figure 06, décrit l'ensemble des liaisons impliquées dans la formation du biofilm.

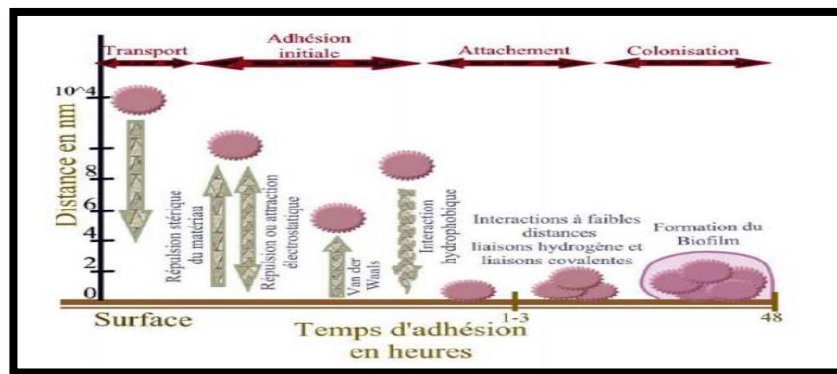


Figure 7 : Représentation schématique des forces d'interaction mises en jeu lors de la formation d'un biofilm (Ploux .,2007).

III.2.4. Colonisation du matériau

L'étape de la colonisation du matériau vise à décrire « l'accumulation » plus ou moins intense et rapide d'un « biofilm », principalement du fait de la multiplication cellulaire, dépendant à la fois de la quantité de matière nutritive disponible et de la quantité de bactéries. Cette étape met en cause deux phénomènes concomitants, la division cellulaire et l'adhésion de nouvelles bactéries. (Capdeville, Nguyen.,1990), décrivent la phase d'accumulation en une succession de cinq étapes (Figure 07).

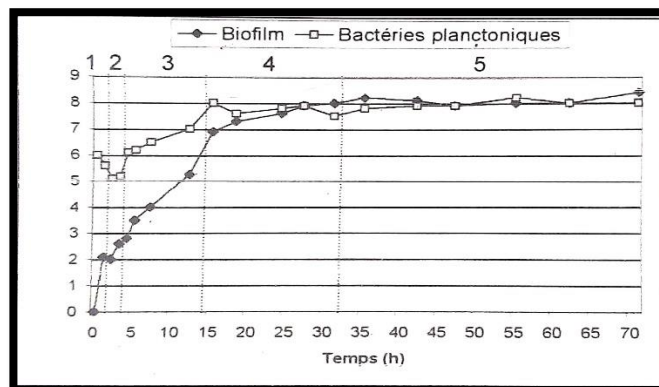


Figure 8 : Exemple de cinétique de croissance d'un biofilm aérobie sur support Tygon, modèle dynamique (nombre d'UFC adhérees/cm² et nombre d'UFC/mL d'effluent).

III.3. RESISTANCE DES BIOFILMS

III.3.1. Définition

La résistance des biofilms se définit comme la possibilité temporaire ou permanente pour un organisme et sa descendance, de demeurer viable et/ou de se multiplier dans des conditions qui détruiraient normalement ou inhiberaient les organismes apparentés (Gilbert et Wright.,1987).

III.3.2. Caractéristiques

- Les bactéries sont donc plus résistantes lorsqu'elles ne sont plus sensibles à une concentration d'agents antimicrobiens utilisés en pratique (Russel et Chopra.,1990).
- Le transfert au travers de cette couche de biofilm, des différentes molécules (Oxygène, désinfectant, éléments nutritifs), est limité par leur vitesse de diffusion.
- Cependant, l'apparition de nouveaux concepts concernant les changements physiologiques des bactéries incluses et leur régulation génétique, mettent en cause d'autres phénomènes, tels que des modifications pariétales et des cibles des antimicrobiens
- L'état physiologique propre des bactéries organisées en biofilm et le matériel extracellulaire associé aux agrégats et aux biofilms, sont reconnus comme un système de protection des bactéries vis-à-vis de l'environnement (Brabda et al.,2005 ; Hunter et Beveridge.,2005).
- Ceci correspond donc à une adaptation aux conditions, facilitant initialement l'adhésion et conduisant à une protection de la bactérie incluse dans la matière extracellulaire.
- Cette résistance des bactéries en biofilm est très étendue puisqu'elle concerne aussi bien les défenses immunitaires que les traitements antimicrobiens au sens large du terme, qu'ils soient chimiques (Antibiotiques, antiseptiques, désinfectants), ou physiques (U.V, température...) (Costerton.,1984)

Ce phénomène de résistance concerne tous les types de biofilms. Exemple : Des doses de chlore peuvent être suffisantes au contrôle des populations microbiennes planctoniques. Par contre ce même traitement s'avère insuffisant lors de la formation d'un biofilm (Tresse et al.,1998).

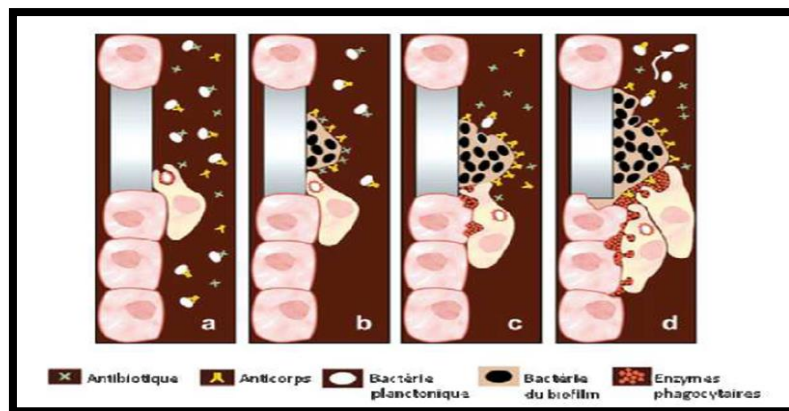


Figure 9 : Mécanismes de résistance des biofilms aux défenses de l'hôte (Costerton J.W.,2007). Les bactéries planctoniques qui pénètrent dans l'organisme vont stimuler la réponse immunitaire de l'hôte. Les phagocytes et les anticorps produits vont pouvoir les éliminer et contrôler l'infection aiguë (étape a). Les bactéries ayant formé un biofilm stimulent également la réponse immunitaire mais son efficacité est limitée par défaut de pénétration des phagocytes et des anticorps dans la matrice du biofilm (étape b). Les phagocytes vont libérer leurs enzymes phagocytaires sur place (étape c). Cette interaction active entre les microbes en biofilms et le système inflammatoire induit un état hyper inflammatoire persistant avec accumulation de neutrophiles, cytokines, augmentation d'enzyme de type protéase et élastase qui endommagent les tissus environnants (étape d).

III.4. LE QUORUM SENSING

III.4.1. Définition

Le quorum sensing (QS) est un mode de communication et de perception, utilisé chez les bactéries, fondé sur la production de petites molécules appelées « auto inducteurs » (AI), qui peuvent diffuser à travers la membrane ou être transportées à l'extérieur de la cellule (**Bassler et al., 2006**).

Les AI, dont la concentration est proportionnelle au nombre bactérien, servent d'indicateurs moléculaires de la densité bactérienne. A partir, d'une certaine concentration de ces molécules, une réponse cellulaire est enclenchée par l'activation de gènes efficaces, pour mettre en place des phénomènes particuliers, comme par exemple, la formation de biofilms, la virulence, la production d'exo-polysaccharides, d'exo-protéases et de sidérophores (**Filloux et al., 2003**).

De nombreux facteurs induits par le Q.S., sont sécrétés dans l'environnement de la cellule. Ils ont un intérêt global pour la communauté bactérienne, pour fournir des nutriments à la population, ou pour la transition du mode de vie « planctonique » vers un mode de vie sessile appelé « biofilm » (**Lee et al., 2015**).

III.4.2. Les molécules du Quorum sensing et mode d'action

Il existe une grande diversité de molécules de communication, entre les bactéries Bactéries à Gram positif et négatif.

Staphylococcus spp, *Clostridium spp*, *Enterococcus spp*, utilisent souvent des « peptides cycliques », d'environ 7-11 acides aminés. Ces peptides sont transportés hors de la cellule bactérienne, puis sont perçus par le senseur membranaire des autres bactéries (senseur à histidine kinase). La fixation du peptide au senseur, entraîne l'activation d'un régulateur de réponse (ex : la phosphorylation), activant l'expression des gènes du Q.S (**West et al., 2012**).

Différentes molécules sont utilisées, les plus communes étant les « acyl homosérine lactone AHL, dont les tailles (de 4-18 atomes de carbone), et les modifications de la chaîne acyl, varient selon les bactéries. Par exemple, *P. aeruginosa*, produit et perçoit, entre autres, AI, deux autres AHL : « la N-(3-oxododécanyl)-L-Homosérine lactone (ou 3-oxo-C12-HSL), et la N-Butyryl-L-homosérine lactone (**Lee et al., 2013**).

Les AHL diffusent librement à travers la membrane bactérienne, et la réponse au Q.S. est déclenchée par leur fixation à un régulateur de transcription de type Lux R qui, ainsi activé, induit l'expression des gènes du Q.S (**Rémy et al., 2018**). D'autres molécules sont impliquées dans le QS des bactéries à Gram négatif. Celles-ci sont spécifiques de chaque espèce bactérienne : des acides gras insaturés, comme le dsf (*diffusible signaling factor*), sont utilisés par les bactéries *Xanthomonas spp.*, *Burkholderia spp.* et *Xyella spp.*; des cétones (CAI-1 [cholerae auto inducteur -1] et LAI-1 [legionella autoinducteur-1] par *Vibrio spp* et *Legionella spp*; l'épinéphrine et ses dérivés sont utilisés par les bactéries entérohémorragiques (**LaSarre et al., 2013**). Un autre AI est utilisé par les bactéries à Gram négatif, le diester AI-2. Il existe sous forme borée (chez *Vibrio spp.*) (**La Sarre et al., 2013**).

III.5. QUORUM QUENCHING

III.5.1 Définition

C'est une stratégie qui consiste à « brouiller » la communication bactérienne, donc à brouiller leurs signaux, pour empêcher leur synchronisation. Celui-ci peut interférer de différentes manières, soit au niveau intracellulaire, soit au niveau extra-cellulaire. (**Tang et al., 2014**).

III.5.2. Mécanisme d'action du Quorum quenching

L'utilisation de molécules inhibitrices du Quorum quenching (QSI), mimant les auto inducteurs AI, permet ainsi d'intervenir au niveau des cellules bactériennes pour inhiber la production ou la perception des AI. (Guendouze et al., 2017).

D'autres stratégies ciblent directement les molécules de communication sécrétées, dans l'environnement, avant qu'elles n'atteignent leur cible, ou en les séquestrant à l'aide d'anticorps, ou de macromolécules comme les « cyclodextrines ». (Guendouze et al., 2017).

- **Les séquestreurs d'AI**

L'anticorps synthétique AP4-24H11 est, par exemple capable de se lier aux peptides auto inducteurs AIP-4 (autoinducting peptide 4), utilisé par *S. aureus* pour réguler sa virulence et inhiber certains mécanismes, comme son activité hémolytique. Le même effet est obtenu avec les cyclodextrines, capables de piéger les AHL, et contrôler le Q.S (Bzdrenga et al., 2017).

- **Les enzymes à activité Q.Q.**

Les enzymes capables de dégrader les AI (QQE, quorum quenching enzyme), ont été découverts chez la bactérie *B. spp.* Ces enzymes agissent au niveau extracellulaire et en quantité catalytique, maintenant les bactéries dans leur état normal : les lactonases, acyclases et oxydoréductases (Guendouze et al., 2017).

III.5.3. Les inhibiteurs du Q.S.

Beaucoup d'inhibiteurs du Q.S. (Q.S.I), ont été isolés à partir de produits naturels comme le thé, les champignons, le miel, l'ail, le clou de girofle et d'organismes marins. (Tang K et al, 2014)

D'autres ont été synthétisés au laboratoire, en mimant la structure des A.I.

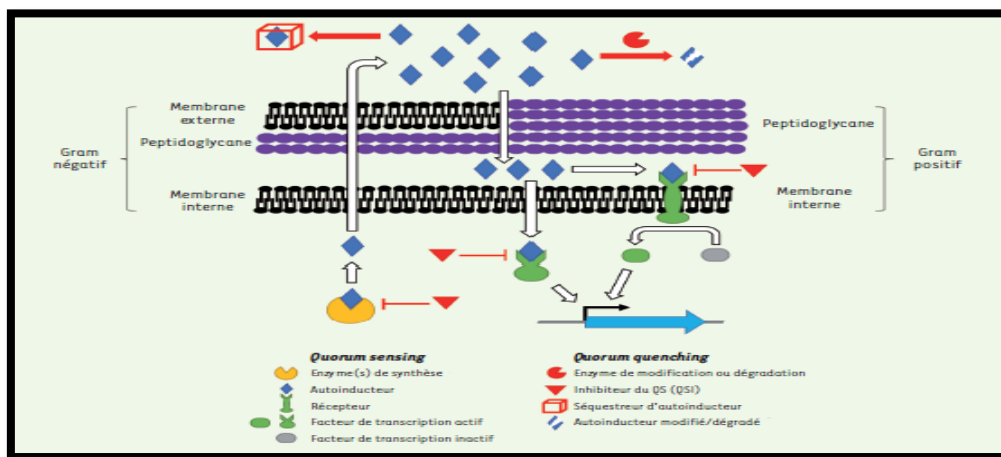


Figure 10 : Rôle du Quorum sensing dans la mise en place de l'infection et rôle du quorum quenching dans la protection : utilisation d'enzymes (Mion et al., 2019).

III.5.3. Potentiel thérapeutique du Quorum quenching

Le Quorum quenching apparaît comme une stratégie idéale, pour élargir l'arsenal thérapeutique, lors de la formation du biofilm, et présente a de ne pas affecter la croissance bactérienne, contrairement aux antibiotiques, ce qui diminue l'apparition de résistance microbienne, et limite la formation de biofilms. (Brackman et al., 2011).

Certains travaux ont montré que le Q.S, induit l'expression de peroxydases d'hydrogène, conférant aux bactéries une protection contre les antibiotiques (β lactamines) chez *P. aeruginosa*. Le Quorum quenching permet d'augmenter la sensibilité aux antimicrobiens (Dufour et al., 2017).

III.6. PHYSIOPATHOLOGIES DES BIOFILMS

Diverses pathologies infectieuses sont liées à la formation des biofilms, tel la mucoviscidose (Lebeaux et al., 2013) ; la plaque dentaire (Houvion.,2014), les biofilms sur les dispositifs médicaux (Florence.,2010), les infections urinaires « pose de sonde urinaire » (Florence, 2010), les infections ostéo-articulaire « matériel orthopédique » (Brady.,2008), les infections oculaires « prothèses oculaires » (Zegans.,2002) et les infections des plaies chroniques.

III.6.1. Les biofilms et infections associés aux plaies chroniques

La formation des biofilms, est reconnue comme étant responsable du développement ou de l'exacerbation de nombreuses infections chroniques, associées au diabète, au tractus urinaire, ou chez les patients atteints de mucoviscidose (Dolan et Costerton.,2002).

L'immunodéficience et la prédisposition de certains patients (diabète), sont deux facteurs de risque de développement d'infection impliquant un biofilm, et les agents bactériens rencontrés appartiennent à la flore commensale de l'individu comme *S. aureus*, *P. aeruginosa* ou *E. coli*. La figure 11 illustre les principales affections de plaies chroniques liées au biofilm.

On estime que 1 à 2 % de la population des pays développés souffrent de plaies chroniques comme les ulcères des membres inférieurs ou les complications cutanées liées au diabète. Soixante pour cent d'entre elles (contre 6 % des plaies aiguës) sont colonisées par des bactéries ou des champignons sous forme de biofilms polymicrobiens tolérants aux antibiotiques qui ralentissent ou empêchent la cicatrisation en favorisant un état d'inflammation chronique (David Lebeaux.,2012).

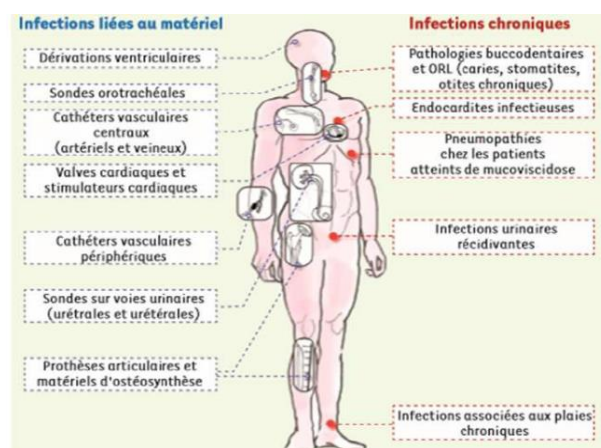


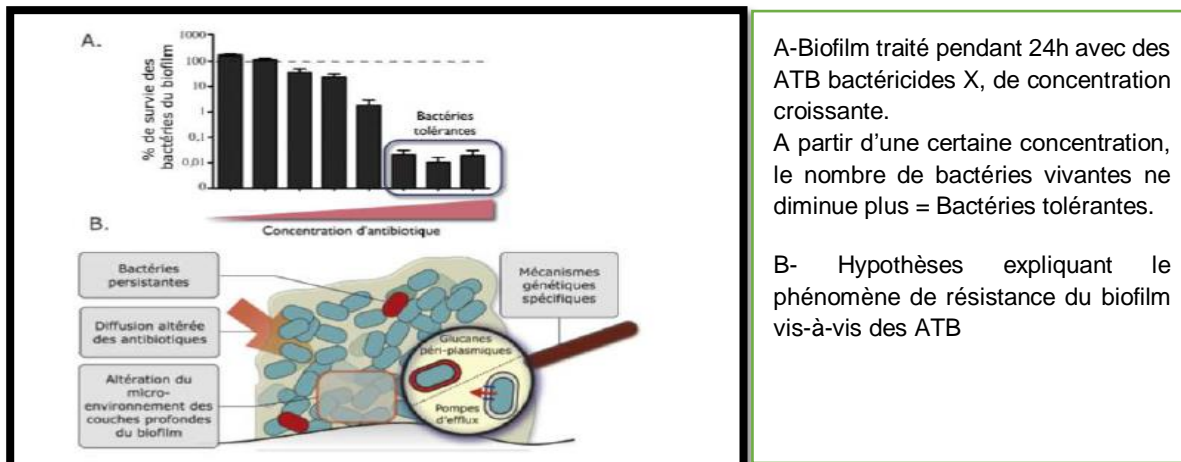
Figure 11 : Infections associées aux plaies chroniques (Lebeaux et al.,2012).

III.7. LE BIOFILM FACE AUX ANTIBIOTIQUES

Les bactéries vivant au sein du biofilm sont moins sensibles aux antibiotiques et aux désinfectants que leurs homologues planctoniques (Bridier et al., 2011). Les concentrations d'antibiotiques nécessaires pour inhiber les bactéries au sein d'un biofilm peuvent être 10 à 1000 fois plus élevées que celles utilisées pour inhiber les mêmes bactéries à l'état planctonique (Bjarnsholt et al., 2005).

En effet, une souche bactérienne est définie comme étant résistante, si sa croissance n'est pas inhibée à une concentration critique (CMI) d'antibiotiques, généralement observée pour la majorité des souches de l'espèce considérée (Figure 12). Il est plus judicieux de parler de « tolérance » plutôt que de résistance, lorsque le

mécanisme impliqué est de nature phénotypique (adaptation des cellules à la vie en biofilm), car les bactéries, revenues à leur état planctonique, retrouvent leur sensibilité initiale (**Daddi Oubekka.,2012**).



A-Biofilm traité pendant 24h avec des ATB bactéricides X, de concentration croissante.

A partir d'une certaine concentration, le nombre de bactéries vivantes ne diminue plus = Bactéries tolérantes.

B- Hypothèses expliquant le phénomène de résistance du biofilm vis-à-vis des ATB

Figure 12 : Représentation schématique de la résistance des biofilms aux antibiotiques (**Daddi Oubekka., 2012**).

Il est, aujourd'hui établi que la résistance des biofilms, aux agents antibactériens, est multifactorielle (**Daddi Oubekka., 2012**), faisant intervenir :

- Limitation de la diffusion de l'antibiotique ;
- Défaut de pénétration des agents antimicrobiens dans les profondeurs du biofilm ;
- Altération du microenvironnement et adaptation phénotypique des cellules incluses dans un biofilm ;
- Réponse des bactéries à un stress : mécanisme génétique spécifique. Dans un biofilm, les bactéries subissent des adaptations génétiques pouvant mener à une augmentation de la résistance aux agents antimicrobiens (**Bridier et al., 2011**).

Les bactéries persistantes : Les bactéries résistantes ou « persisters cell », représentent une sous population très minoritaire de bactéries hyper résistantes (**Keren et al., 2004**).

16. STRATEGIES THERAPEUTIQUES POUR LUTTER CONTRE LES BIOFILMS

Par les dommages qu'ils causent dans les milieux médical et industriel, les biofilms ont un impact économique important. Il est nécessaire de développer des moyens de lutte efficaces et pérennes contre la formation de biofilms (**Cartier et al., 2013**). La lutte contre les biofilms peut se définir selon deux axes principaux : empêcher la formation de biofilms, et lorsqu'ils sont déjà présents, les détruire. Les mesures préventives qui empêchent la formation de biofilms sont :

- L'hygiène (**Lebeaux et Ghigo., 2012**).
- Les dispositifs imprégnés de substance hydrophile (**Francolini.,2010**).
- Les dispositifs imprégnés d'argent ou de substances anti microbienne (**Lebeaux.,2012**).
- Verrous d'antibiotiques ou d'éthanol préventif. (**Donlan et al., 2011**).
- Verrous d'agents chélateurs (**Lebeaux et al., 2012**).

Une fois le biofilm formé, il est très difficile de l'éliminer. Dans le cadre des infections associées à un dispositif invasif, la réussite du traitement est très souvent conditionnée par l'ablation du dispositif. Cependant, l'antibiothérapie à long terme est nécessaire lorsque le dispositif ne peut être retiré (**Oskar Wanner et al., 2006**) :

- Elimination mécanique du biofilm (**Oskar Wanner et al., 2006**).
- Antibiothérapie (Tableau 9): Les biofilms sont caractérisés par des propriétés d'antibiorésistance élevée. De nombreuses recherches sont donc actuellement en cours afin de trouver le moyen de contrer

cette antibiorésistance développée par les biofilms. Une hypothèse étant que l'on n'administre pas les antibiotiques à une dose suffisante pour éliminer le biofilm, c'est pour cette raison certains chercheurs cherchent à déterminer les concentrations d'antibiotiques qu'il faudrait pour éradiquer un biofilm (**Daddi Oubekka., 2012**).

- Ablation du dispositif infecté : En cas d'infection liée à un matériel implanté, l'ablation de ce dernier est souvent recommandée, car son maintien expose à un risque élevé d'échec thérapeutique (**Lebeaux et al., 2012**).

Tableau 9. Antibiotiques curatifs étudiés en clinique (**DAVID et al., 2015**).

| Gram positifs | Gram négatifs | CG+ et BG- | Candida spp |
|--------------------|--------------------|------------------------------|----------------------------|
| Vancomycine | Amikacine | Vancomycine + ciprofloxacine | Amphotéricine B liposomale |
| Téicoplanine | Gentamicine | Vancomycine + ceftazidime | Ethanol 70% |
| Céfazoline | Ceftazidime | Ethanol 70% | |
| Daptomycine | Ciprofloxacine | | |
| Ethanol 70% | Levofloxacine | | |
| | Ethanol 70% | | |

III.9. NOUVELLES APPROCHES ANTI-BIOFILMS

Diverses approches sont proposées pour empêcher la formation ou éradiquer le biofilm. Nous citons ci-dessus les principales approches adoptées pour lutter contre les biofilms.

- Revêtement biocompatible auto défensif destiné aux biomatériaux implantables : Ce revêtement, obtenu par la technique couche-par-couche, est à base de polysaccharides, le chitosan (CHI) et l'acide hyaluronique (HA). Il contient également de la cateslytine (CTL), un peptide endogène antibactérien et antifongique qui a été greffé sur HA(HA-CTL) (**Singh et al., 2002**).

- Vers un vaccin anti-biofilm : Pour inhiber l'adhésion des micro-organismes, on peut utiliser la vaccinologie. Des vaccins sont actuellement en cours de développement, comme par exemple les vaccins contre les caries, dirigés contre *Streptococcus* mutants. Le but de la vaccinologie est de former des IgA qui vont inhiber les phénomènes responsables de l'adhésion des micro-organismes (**Lebeaux, 2008**).

- Brouiller les communications bactériennes et limiter la maturation du biofilm : Dans cette approche, il s'agit d'empêcher la maturation du biofilm en interférant avec les signaux de communication intra ou inter bactéries. Les biofilms formés par *Pseudomonas aeruginosa* reposent sur l'inhibition du quorum-sensing en utilisant des analogues structuraux des homosérines lactones, comme les furanones, qui réduisent le biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*, in vitro et in vivo. Chez les *staphylocoques* une approche similaire a été proposée, le quorum sensing peut être inhibé par le peptide inhibant RNAIII (RIP). RIP est un heptapeptide, et en sa présence, les bactéries ne sont plus virulentes et ne causent pas de maladie (**Lebeaux., 2012**).

- Cibler la matrice polysaccharide : En fonction de la composition des biofilms, différentes enzymes sont utilisables capables de dissocier les polymères composant la matrice extracellulaire du biofilm. Prenons l'exemple des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*. Ces derniers produisent un exo polysaccharide, l'alginate, aux propriétés intéressantes : il retarde la diffusion des aminosides au sein du biofilm et inhibe leur activité antimicrobienne. Si on ajoute au milieu une enzyme dégradant l'alginate, l'alginate lyase, on augmente le pouvoir de pénétration et l'activité antimicrobienne de l'antibiotique (gentamicine, tobramicine) dans le biofilm (**Bridier., 2011**).

La dispersine B est une enzyme bactérienne capable de dégrader le polymère de Nacétyl- glucosamine de la matrice du biofilm de plusieurs espèces bactériennes dont *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Escherichia coli*. La DNase quant à elle peut hydrolyser les acides désoxyribonucléiques contenus dans la matrice de certains biofilms les protéases, cellulases, polysaccharide dépolymérase (**Bridier., 2011**)

- Les bactériophages : Les bactériophages sont des prédateurs naturels des bactéries. Ils exercent sur elle un pouvoir bactéricide et c'est précisément ce pouvoir qui est recherché comme alternative aux antibiotiques. Une fois qu'une bactérie est infectée par un phage lytique, elle est complètement détruite. Pour venir à bout d'un biofilm installé, il est intéressant de combiner des moyens physiques ou chimiques avec des antibiotiques, la combinaison d'un phage et d'un antibiotique permet à ce dernier d'atteindre sa cible (**Christiane., 2014**)
- Les biofilms et les plantes médicinales : Le jus de canneberge est d'ailleurs utilisé traditionnellement pour enrayer les infections urinaires qui sont, comme nous l'avons vu, reliées à des biofilms. Ou encore, *Allium sativum*, ce bon vieil ail utilisé par des milliers de personnes à travers le monde pour enrayer des infections de toutes sortes, a été beaucoup étudié en laboratoire et de manière très concluante (**Vago., 2009**).

MATERIEL
ET METHODES

I. Lieu et Période de l'étude

Notre étude a été réalisée entre avril et juin 2021 au niveau des laboratoires pédagogiques de la Faculté des Sciences et de la Nature de Sidi-Bel-Abbès. Un stage de court séjour a été effectué au niveau des laboratoires de l'Hôpital Mustapha BACHA d'Alger, au niveau des services de Microbiologie et du service du « Pied Diabétique ».

II. Prélèvements et Isolats Bactériens

Notre étude a porté sur l'ensemble des souches, fournis par notre encadreur Mme Bousmaha-Marroki L. Ces isolats sont originaires d'infections du pied diabétique (2019-2018).

Nous avons également procédé à des prélèvements provenant de patients diabétiques (Service Pied diabétique de l'hôpital Mustapha BACHA -souches jeunes), et présentant une infection au niveau du pied, diagnostiqués cliniquement (pied diabétique), traduite par l'apparition du pus, au niveau du foyer infectieux. Différents aspects de l'infection sont inclus, en fonction du sexe et de l'âge du patient (à l'exception de la population pédiatrique).

II.1. Isolats Bactériens

Les souches étaient conservées, dans des « Eppendorf », contenant du glycérol. Chaque souche provenant de l'Eppendorf, estensemencée dans un bouillon cœur cervelle BHIB, ou bouillon nutritif, incubée, pendant 24h à 37°C, et a subi une purification afin d'obtenir des souches pures et jeunes, pour l'étude des biofilms.

II.2. Prélèvements

Des écouvillons stériles, fermés hermétiquement, ont été utilisés, pour assurer un prélèvement aseptique. Après désinfection du pourtour de la lésion infectée, le prélèvement du pus superficiel, est effectué par écouvillonnage, consistant à passer un écouvillon de coton, sur la lésion infectée. Ces prélèvements ont été effectués au niveau des services de Microbiologie et du « pied diabétique » de l'hôpital Mustapha Bacha d'Alger.

III. Isolement et purification

Après enrichissement des prélèvements des ensemencements en stries sur milieux MRS, M17, Chapman, Hektoën, Mac Conkey, Gélose au sang frais ont été effectués. Plusieurs repiquages alternant milieu liquide et solide sont effectués jusqu'à l'obtention de souches pures. Les milieux MRS et M 17, ont été employés pour les bacilles Gram positif. Le milieu Chapman est un milieu sélectif des bactéries halophiles et halotolérantes, telles que les *Staphylocoques*. Les milieux Mac Conkey et Hektöen, sont utilisés pour les *entérobactéries*, et d'autres bactéries à Gram négatif. Pour les germes exigeants (*Streptocoques*), nous avons utilisé la gélose au sang frais, et la gélose au sang.

IV. Identification

IV. 1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique est le premier examen effectué après isolement sur boîtes de Petri. Il permet de déterminer : La taille, la forme (allure des contours, relief et le centre), la pigmentation, l'opacité (opaque, translucide ou transparente), la consistance (crémeuse, sèche, grasse ou muqueuse), l'aspect de la surface (lisse ou rugueux), l'aspect des bords des colonies.

IV. 2. Examen microscopique

Cet examen est effectué à l'aide d'un microscope optique, après coloration de Gram, pour chaque souche pure. Il permet d'observer, les détails morphologiques des cellules bactériennes, leur mode de regroupement, ainsi que leur Gram, ce qui permet d'orienter l'identification.

IV. 2. 1. Coloration de Gram

Cette coloration permet de classer les bactéries selon leurs propriétés pariétales, en deux grand groupe Gram positif et négatif. Elle est réalisée selon le protocole suivant :

- Un frottis est réalisé, en déposant une goutte d'eau distillée sur une lame propre et dégraissée. Une colonie est prélevée à l'aide d'une anse de Platine, et déposée en couche mince.
- La préparation est séchée et fixée, en passant la lame rapidement, au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen.
- Sur le bac de coloration, le frottis est recouvert de violet de Gentiane. Laisser réagir pendant 1 minute et rincer à l'eau distillée.
- Verser du Lugol sur la lame, et laisser agir pendant 1 minute. Rincer à l'eau distillée.
- Une contre coloration est effectuée avec de la safranine, ou de la fuchsine. Laisser agir pendant 10 à 30 secondes, et rincer à l'eau distillée.
- Sécher la lame, et observer au microscope à immersion (objectif x100).
- Avec cette coloration, les bactéries Gram positif apparaissent de couleur violet foncé, tandis que les bactéries Gram négatif apparaissent de couleur rose.

IV. 2. 2. Coloration des spores bactériennes

Certaines bactéries, telles que Bacillus, Clostridium, Sporosarcinia, ont deux formes d'existence, soit la cellule végétative et la forme de résistance aux mauvaises conditions de vie ou d'environnement, avec la spore bactérienne, dénommée endospore. A l'intérieur d'une cellule végétative, le phénomène de sporulation, conduit en plusieurs étapes et sept heures environ, à la formation d'une spore qui, de par sa structure et sa composition, chimique, est multirésistante (thermo-résistance, résistance aux agents physico-chimiques, longévité). Dans cette cellule, devenue sporange au cours de la sporulation, la spore ovale ou sphérique se forme dans une position déterminée, utilisée en taxonomie. Elle se libèrera ensuite, et deviendra une spore libre, qui pourra germer et donner une nouvelle cellule végétative, lorsqu'elle rencontrera des conditions de culture favorable.

Afin de mettre en évidence cette structure de résistance chez les bacilles Gram positif, une coloration spécifique à chaud au vert de malachite est réalisée. Parfois réalisée en routine, cette coloration facilite le repérage des spores, lorsqu'elles sont rares dans un produit. Elle permet aussi de préciser la forme de la spore et sa position dans le sporange. Nous avons suivi les étapes suivantes pour la réalisation de cette coloration :

- Réaliser un frottis de la culture bactérienne à étudier.
- Recouvrir d'une solution aqueuse de vert de malachite à 0.5 %.
- Chauffer pendant quelques minutes, sur une plaque chauffante, jusqu'à émission de vapeurs.
- Rajouter du colorant, pendant le chauffage, si nécessaire, sans jamais laisser évaporer complètement le colorant.
- Lave à l'eau distillée.
- Colorer, ensuite, avec de la safranine, pendant 30 secondes.
- Les cellules végétatives apparaissent colorées en rouge, les spores en vert, dans leurs sporanges rouges, et les pores libres colorées en vert.

IV. 3. Identification par la galerie classique

Les milieux d'identification sont des milieux de culture liquides et/ou solides qui permettent de réaliser des tests biochimiques se rapportant au métabolisme respiratoire, glucidique, protéique et lipidique des bactéries. Convenablement choisis et associés, ces milieux de culture en tubes classiques et leur tests biochimiques forment une galerie biochimique d'identification spécifique d'un groupe de bactéries (famille Entérobactéries – espèces des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus*).

IV. 3. 1. Le test de catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs. Cette enzyme catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), en H_2O et $\frac{1}{2} O_2$. C'est un produit toxique, du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries.

Pour la mise en évidence de cette enzyme, une goutte d'eau oxygénée est déposée sur une lame porte-objet propre, et une colonie est prélevée, et déposée sur la goutte, à l'aide d'une pipette Pasteur. Si la bactérie possède la catalase, elle dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène, visibles par la formation de bulles.

IV. 3. 2. Le test de coagulase (test de Latex, Plasma de lapin)

Le test LATEX est un test rapide d'agglutination sur lame pour la détection simultanée du facteur d'affinité pour le fibrinogène «clumping factor», de la protéine A et des polysaccharides capsulaires de *Staphylococcus aureus*.

Ce réactif permet la recherche simultanée du facteur d'affinité pour le fibrinogène, également appelé coagulase liée ou « clumping factor » ; de la protéine A qui possède une affinité pour le « fragment cristallisable » (Fc) des immunoglobulines gamma (IgG) ; et des polysaccharides capsulaires de *Staphylococcus aureus*.

Avant de procéder au test des colonies pures sont isolées sur gélose Chapman par la suite une coloration de Gram et un test de catalase sont effectués. Les colonies testées avec ce réactif doivent être des cocci Gram positifs catalase +.

Le réactif latex est bien homogénéisé à l'aide d'un Vortex, une goutte de réactif latex test est ajoutée dans un des cercles de la carte d'agglutination (Déposer une goutte de réactif latex témoin négatif sur un autre cercle).

1 à 3 colonies de Cocci Gram-positifs catalase + sont ajoutées avec une ose ou un bâtonnet en plastique, puis les émulsionner avec une goutte de latex pendant 10 secondes (Procéder de la même façon pour le réactif latex témoin négatif.).

Pour la réaction d'agglutination, il est nécessaire de bien homogénéiser le réactif latex, en effectuant un mouvement rotatif de la carte. La lecture doit se faire pendant les 30 secondes qui suivent le début des mouvements rotatifs de la carte.

Effectuer la lecture, puis jeter la carte dans un récipient désinfectant.

Une réaction est positive lorsqu'il y a formation d'agrégats uniquement avec le latex test, visibles à l'œil nu, en moins de 30 secondes, et indique la présence de *Staphylococcus aureus*.

Dans le cas d'une réaction négative, la suspension ne présentera pas d'agrégats et gardera son aspect laiteux ce qui indique la présence des SCN (les Staphylocoques à coagulase négative)

IV. 3. 3. Test de plasma de lapin

Le plasma de lapin lyophilisé est utilisé pour la détection de la coagulase libre produite par *Staphylococcus aureus*. La production de coagulase libre par *Staphylococcus aureus* provoque une coagulation du plasma qui se traduit par la formation d'un culot de coagulation. Ce test est réalisé selon les étapes suivantes :

- 10 ml de solvant sont prélevés à l'aide d'une pipette stérile, et additionné directement dans le flacon de plasma de lapin lyophilisé. Il est nécessaire d'agiter légèrement pour favoriser la dissolution, en évitant la formation de mousse.
- A partir d'une culture de la souche à étudier, on réalise une subculture en bouillon staphylocoagulase (Staphylocoagulase broth, code 53 544), ou en bouillon nutritif ordinaire (certaines préparations de culture ordinaire, nonensemencées, mélangées au plasma, peuvent entraîner une coagulation de celui-ci, donc il est indispensable de faire, au préalable, un témoin bouillon-plasma, si l'on n'utilise pas le bouillon Staphylocoagulase).
- Les souches de *Staphylococcus aureus* provoquent la coagulation du plasma en un temps variant entre 1/2h – 24h.
- La prise en masse du plasma est généralement totale, au point que le tube peut être retourné.
- La formation d'un caillot moins compact visible, avant la 24^{ème} heure, est considéré comme positif.

Le milieu doit être observé toutes les heures, pendant les 4 premières heures. En effet, certaines souches de *S. aureus*, produisent de la fibrinolyse qui lyse les zones de coagulation. Au bout de 24h, cette réaction peut entraîner une fausse réaction négative.

IV. 3. 4. Mise en évidence du type respiratoire des bactéries

La mise en évidence expérimentale, du type respiratoire, est réalisée sur de la gélose viande- foie.

Le milieu est préparé à partir d'un milieu hydraté, coulé en tubes (à raison de 7 à 8 ml par tubes), puis stérilisé à l'autoclave. Une fois les milieux prêts à l'emploi, les tubes sont mis dans un bain marie pendant 20 minutes, afin de liquéfier leur contenu, et refroidis dans un bain marie entre 44-47 °C.

Les milieux VF, sont ensuite ensemencés dans la masse, avec les souches bactériennes à étudier, de la manière suivante :

- Une colonie est prélevée à partir du milieu gélosé, à l'aide de l'effilure d'une pipette Pasteur fermée et stérilisée par flamage.
- La colonie est ensemencée dans le fond du tube, en remontant et en redescendant la pipette, suivant un mouvement en spirale, à plusieurs reprises.
- Les milieux, une fois ensemencés, sont laissés refroidis puis incubés à 37 °C pendant 24-48h (jusqu'à 7 jours éventuellement).
- Les bactéries aérobies strictes se développent dans la zone superficielle.
- Les bactéries anaérobies ou aéroanaérobies facultatives, se développent sur toute la hauteur du milieu.
- Les bactéries anaérobies strictes se développent uniquement en profondeur.
- Les bactéries micro-aérophiles, forment un anneau, dans la zone intermédiaire aérobie-anaérobie.

IV. 3. 5. Le test de Mannitol mobilité

Ce test est utilisé lors de l'identification des entérobactéries, dont les « coliformes ». Il permet de rechercher, simultanément, la mobilité et l'utilisation du Mannitol. Ce milieu se présente en tubes de 10 ml, prêts à l'emploi.

A l'aide d'une anse de Platine à fil droit, les tubes sont ensemencés par piqûre centrale, dans la gélose en culot, jusqu'au fond du tube, avec la souche à tester. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 18-24h.

En cas de fermentation de produits acides, fera virer l'indicateur de pH, de la couleur rouge (du milieu basique) vers la couleur jaune (milieu acide). Un développement, le long de la piqûre d'ensemencement, accompagné d'un trouble, indique un test de mobilité positive. Un développement le long de la piqûre d'ensemencement sans trouble, indique un test de mobilité négative.

IV. 3. 6. Le test de citrate

Certaines bactéries, dont les entérobactéries, sont capables d'assimiler le citrate de Sodium, comme source de carbone et d'énergie, du milieu. La recherche de cette propriété, est effectuée avec le milieu de Simmons au citrate de Sodium.

Le milieu est préparé à partir du milieu déshydraté, puis rempli dans des tubes à 7 ml. Les tubes sont mis en position inclinée, afin d'obtenir une pente.

A l'aide d'une pipette Pasteur, préalablement stérilisée par flambage, la pente du milieu estensemencée, en stries longitudinales, par une colonie isolée, prélevée sur la gélose nutritive.

Les tubes sont ensuite incubés pendant 24h à 37°C (En cas de réaction négative, il est possible de prolonger la durée de l'incubation).

Les bactéries, capables d'utiliser le citrate de Sodium, comme source de carbone, sur ce milieu, produisent une « alcalinisation », faisant virer le bleu de Bromothymol (indicateur de pH de couleur bleue), vers la couleur verte (milieu basique), et les bactéries sont dites citrate positif. Les bactéries dites « citrate négatif », ne donnent ni culture, ni bleuissement, même après 7 jours d'incubation, et le test est « citrate négatif ».

IV. 3. 7. Mise en évidence de la fermentation du glucose, du saccharose et du lactose

Pour la mise en évidence de la fermentation des sucres, les milieux de culture ont été préparés dont les composants sont semblables à ceux du milieu TSI mais en éliminant l'agar-agar et en n'additionnant qu'un seul sucre par milieu. De ce fait nous obtiendrons 3 bouillons, l'un contenant du glucose, l'autre du saccharose et le dernier le galactose.

Les milieux une fois préparés sont répartis dans des tubes (5ml) puis stérilisés.

A partir d'une culture jeune les milieux sontensemencés à l'aide d'une anse de platine. Une foisensemencés, une couche d'huile de paraffine est ajoutée aux tubes afin de créer l'anaérobiose. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24 heures. Après incubation la fermentation de chacun des sucres entrainera une acidification et un virage au jaune du rouge de phénol contenu dans le bouillon.

IV. 3. 8. Test d'ONPG

Le test ONPG, est complémentaire à l'étude de la dégradation du lactose des bactéries à Gram négatif. Il est effectué lorsque la pente du lactose reste de couleur rouge après 24h d'incubation.

Pour que la bactérie dégrade le lactose, il faut qu'elle possède deux enzymes :

-L'enzyme β - galactoside- perméase membranaire, qui permet la pénétration du lactose dans la cellule.

-L'enzyme β -galactosidase qui catalyse l'hydrolyse du lactose en galactose et en glucose.

La réaction de ce test est effectuée comme suit :

Une culture bactérienne sur milieu gélosé, est prélevée, à l'aide d'une anse de Platine, pour obtenir une suspension dense, dans 0.5 ml d'eau distillée stérile, dans un tube à hémolyse, puis un disque à ONPG est ajouté.

Incuber à 37°C pendant 15-30 minutes, et même jusqu'à 24h au maximum, en raison des réactions tardives positives, avec certaines bactéries.

Une coloration jaune du mélange, signifie, un test ONPG positif, tandis que la non coloration, signifie un test ONPG négatif.

IV. 4. Identification par micro-méthode

Depuis les années 1970-1980, les micro-galeries se sont développées dont les galeries API bioMerieux SA. En effet, les travaux réalisés par Buissière et al en 1968 et 1968 sur la micro-méthode d'identification les ont conduits à concevoir une méthodologie nouvelle, qui a été le fondement du (système API) (**Delaras, 1981**). Historiquement, la société API SYSTEME SA qui fabriqua les premières galeries API intégrera dans la décennie 1990 la société bioMerieux SA qui commercialise deux types de galeries d'identification (la galerie API d'origine commercialisée depuis la décennie 1970, et la galerie API Rapid ou ID conçue dans les années 1990).

IV. 4. 1. API 20E

API 20 E, est une galerie, pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés. La galerie API 20 E, comporte 20 micro-tubes, contenant des substrats déshydratés. Les micro-tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne, qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation, se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés, par l'addition de réactifs.

A/- Préparation de l'inoculum

A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, des colonies jeunes et pures sont prélevées, etensemencées dans un tube contenant 10 ml de l'eau physiologique stérile, ou dans une ampoule API-NaCl 0.85% médium (5 ml). La suspension bactérienne est homogénéisée à l'aide d'un Vortex, et sa densité est comparée à un témoin 0.5 de Mc Farland.

B/- Inoculation de la galerie

La suspension bactérienne est introduite dans les tubes de la galerie, à l'aide d'une micro-pipette (pour éviter la formation de bulles, au fond des tubes, la pointe de la micro-pipette est posée sur le côté de la cupule).

- Pour les tests, CIT, VP et GEL, il faut remplir tubes et cupules.
- Pour les autres tests, remplir uniquement les tubes.
- Pour les test ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, il faut créer une anaérobiose, en replissant leurs cupules d'huile de paraffine.

La galerie est incubée pendant 24h, à une température de 37°C.

C/- Lecture de la galerie

La lecture de la galerie doit se faire, en se référant au tableau de lecture. Pour les tests TDA, IND et VP, les résultats sont révélés par l'addition de réactifs respectifs, TDA, réactif de Kovacs, VP1 et VP2.

IV. 4.2. API 20 NE

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif et non entérobactéries (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Aeromonas*...), combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation et une base de données. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline, qui reconstitue les milieux. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum, et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

A/- Préparation de l'inoculum

On ouvre une ampoule d'API NaCl 0.85% Medium (2 ml), ou on utilise un tube contenant 2 ml de solution saline à 0.85%, sans additif.

A l'aide d'une pipette Pasteur, on prélève 1 à 4 colonies de morphologie identique, par aspirations ou par touches successives (on utilise de préférence des cultures jeunes 18-24h).

On réalise une suspension d'opacité égale à 0.5 de Mc Farland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

B/- Inoculation de la galerie

On remplit les tubes (et non les cupules), des tests NO₃ à PNPG avec la suspension précédente, en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, on pose la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte vers l'avant

On ouvre une ampoule d'API AUX Medium, et on transfère environ 200 µl de la suspension précédente tout en homogénéisant avec la pipette, pour éviter la formation de bulles.

On remplit tubes et cupules des tests [GLU] à [PAC] en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave (des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects).

On remplit d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE), pour former un ménisque convexe. On referme la boîte d'incubation et on incube à 29°C +/- 2°C pendant 24h (+/- 2h).

C/- Lecture de la galerie

Après incubation, la lecture se fait conformément au tableau de lecture.

On note sur la fiche toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG).

La révélation des deux tests NO₃ et TRP, doit se faire en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air. Pour cela, on place le couvercle de la boîte d'incubation au-dessus de ces tests, pendant la période de révélation des tests NO₃ et TRP.

Pour le test NO₃, on ajoute une goutte de réactifs NIT I et NIT 2, dans la cupule. Après 5 minutes, une couleur rouge indique une réaction positive. Une réaction négative peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par des micro-bulles). On ajoute 2-3 mg de réactif Zn, dans la cupule NO₃.

Après 5 min, une cupule testée incolore, indique une réaction positive. Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative, car les nitrates (encore présents dans le tube), ont alors été réduits en nitrites, par le Zinc. La réaction utilisée, pour l'identification de la bactérie, est la réduction des nitrates : Elle est positive, si l'une ou l'autre des deux réactions précédentes (production de NO₂ ou N₂, est positive).

Pour le test TRP, on ajoute une goutte de réactif James (Une couleur rose diffusant dans toute la cupule, indique une réaction positive).

IV. 4. 3. API Coryne

API Coryne, se compose d'une galerie constituée de 20 micro-tubules, contenant les substrats déshydratés, pour la mise en évidence de l'activité enzymatique, ou de la fermentation des sucres pour les bacille Gram positif tel les *Corynebactérie*.

Les tests enzymatiques, sont inoculés avec une suspension dense, qui réhydrate les substrats enzymatiques. Les réactions produites pendant la période d'incubation, se traduisent par des virages colorés spontanés, ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests de fermentation, sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de pH), qui réhydrate des substrats carbonés. La fermentation des carbohydrates, entraîne une acidification, se traduisant par un virage spontané, de l'indicateur coloré.

A/- Préparation de l'inoculum :

On ouvre une ampoule d'API Suspension Medium. A l'aide d'un écouvillon, on prélève toute la culture, préalablement préparée. On utilise préférentiellement des cultures jeunes (24-48h).

On réalise une suspension d'opacité supérieure à celle du point 6 de Mc Farland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

B/- Inoculation de la galerie :

Dans les onze premiers tests de la galerie, (tests NIT à [GEL]), répartir la suspension précédente, en évitant la formation de bulles (pour cela, on incline la boîte d'incubation vers l'avant et on place la pointe de la pipette sur le côté de la cupule).

Dans les neuf derniers tests de la galerie (test 0 à GLYG) :

- On ouvre une ampoule d'API GP Medium, et on transfère le reste de la suspension, soit environ 0.5 ml, et on homogénéise.
- On répartit cette nouvelle suspension dans les tubes uniquement.
- On remplit les cupules des tests soulignés URE, O à GLYG, avec de l'huile de paraffine, en formant un léger ménisque convexe.
- On referme la boîte d'incubation, et on incube pendant 24h (+/- 2h), à 36°C (+/-2°C), en anaérobiose.

C/- Lecture de la galerie :

- Après incubation, ajouter les réactifs : Test NIT (1 goutte de NIT1 et NIT 2)- Test PYZ (1 goutte de PYZ)- Test Pyr A, PAL, β GUR, β GAL, α GLU, β NAG (1 goutte de ZYM avant la première utilisation).
- On attend 10 min, puis on lit toutes les réactions se référant au tableau de lecture.
- On réalise le test CAT alase (utilisé comme 21ème test). On ajoute 1 goutte de peroxyde d'hydrogène à 3%, dans le test ESC ou [GEL]. On attend 1 min.
- L'apparition de bulles correspond à une réaction positive.

IV. 4. 4. API 20 Strep

API 20 Strep se compose d'une galerie constituée de 20 micro-tubules, contenant les substrats déshydratés, pour la mise en évidence de l'activité enzymatique, ou de la fermentation des sucres. Elle permet l'identification de cocci Gram positif tel les genre *Streptococcus* et *Enterococcus*.

Les tests enzymatiques, sont inoculés avec une suspension dense, à partir d'une culture jeune, qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation, se traduisent par des virages colorés spontanés, ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests de fermentation, sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de Ph), qui réhydrate les sucres. La fermentation des carbohydrates, entraîne une acidification, se traduisant par un virage spontané, de l'indicateur coloré.

A/- Préparation de l'inoculum :

- On ouvre une ampoule d'API Suspension Medium (2ml), ou on utilise un tube contenant 2 ml d'eau distillée sans additif.
- A l'aide d'un écouvillon, on prélève toute la culture, préalablement préparée.
- On réalise une suspension très dense. Cette suspension doit être supérieure à 4 de Mc.Farland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

B/- Inoculation de la galerie :

Dans la première moitié de la galerie (tests VP à ADH), répartir la suspension précédente, en évitant la formation de bulles (pour cela, on incline la boîte d'incubation vers l'avant, et on place la pointe de la pipette sur le côté de la cupule).

- Pour les tests VP à LAP, verser environ 100 µl dans chaque tube.
- Pour le test ADH, on remplit uniquement le tube.
- Dans la deuxième moitié de la galerie (tests RIB à GLYG) :
- On ouvre une ampoule de GP Medium, et on transfère le reste de la suspension, soit 0.5 ml au minimum, et on homogénéise.
- On répartit cette nouvelle suspension dans les tubes uniquement.
- On remplit les cupules des tests soulignés ADH à GLYG, avec de l'huile de paraffine, en formant un ménisque convexe.
- On referme la boîte d'incubation, et on incube à 36°C +/- 2°C, en anaérobiose, pendant 4 h-4 h 30, pour une première lecture, et 24 h (+/- 2h), si nécessaire, pour une deuxième lecture.

C/- Lecture de la galerie :

Après 4 h d'incubation, ajouter les réactifs :

- Test VP : 1 goutte de VP 1 et VP 2
- Test HIP : 2 gouttes de NIN.
- Tests PYRA, α GAL, β GUR, β GAL, PAL, LAP : 1 goutte de ZYM A et ZYM B

V. Evaluation de la formation des biofilms

V. 1. Méthode au Rouge Congo Agar

Freeman et al. (1989) ont décrit une méthode qualitative simple pour détecter la production de biofilm, elle permet de mettre en évidence de la production de « slime » par les bactéries. Ce milieu est du BHIB -agar enrichi en de saccharose additionné du rouge Congo. Les boîtes ont été inoculées avec les micro-organismes à tester et incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures en aérobie. Les colonies noires avec une consistance cristalline sèche indiquent la production de biofilm, tandis que les souches non productrices de biofilm ont formé des colonies rouges.

V. 2. Méthode de plaque de culture tissulaire : TCP

Ce test quantitatif décrit par **Christensen et al en (1985)** est considéré comme la méthode de référence pour la détection des biofilms. Elle est réalisée sur des microplaques en polystyrène à 96 puits, sur lesquelles les bactéries sessiles vont adhérer et former des biofilms.

Les organismes isolés ont été inoculés dans 10 ml de bouillon BHIB avec 2% de saccharose et 1 % de glucose. Les bouillons étaient incubés à 37 C pendant 24 h. A partir de ces cultures une suspension de 10⁵ UFC/ml est préparée. Les puits des microplaques sont inoculés avec les suspensions. Un puit témoin contenant du BHIB est également rempli. Les microplaques ont été incubées à 37°C pendant 24 h. Après incubation, les puits ont été lavés avec 0,2 ml de tampon phosphate salin (PBS). Les microplaques sont ensuite colorées avec du cristal violet à (1%) puis lavées et mises à sécher.

Les parois des puits sont grattées à l'aide d'une pipette pasteur etensemencé par inondation dans des boîtes contenant le milieu PCA, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h. Ensuite on procède au dénombrement des colonies présentes

V. 3. Méthode en tube (TM)

Décrite par **Christensen et al. (1985)**, il s'agit d'une méthode qualitative de détection de biofilm et peut aussi être semi quantitative par mesure de la densité optique. A partir d'une culture jeune de 24 heures, une colonie estensemencée dans 5 ml de BHIB contenu dans des tubes à essai.

Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24h. Après incubation, les tubes ont été décantés et lavés avec du tampon phosphate salin (pH 7,3). Les tubes ont ensuite été colorés au cristal violet (1%). L'excès de tache a été lavé avec de l'eau distillée stérile et les tubes étaient séchés.

La formation de biofilm était considérée comme positive lorsqu'un film tapissait la paroi et le fond du tube. La quantité du biofilm formé a été noté comme : 1-faible/aucun, 2-moderé et 3-élevé/fort. (**Mathur et al., 2006**).

Pour une évaluation quantitative, un rinçage des tubes avec de l'acide acétique est réalisé afin de dissoudre le colorant à l'intérieur des cellules adhérente et de mesurer la densité optique DO à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm.

V. 4. Méthodes de visualisation du biofilm sur lames de microscope : méthode de goutte

Le microscope a fourni une vaste gamme de méthodologies permettant de visualiser la morphologie de biofilm avec de nombreux objectifs. Cette méthode permet d'observer sous microscope optique l'adhésion des bactéries sur un support en verre qui est une lame de microscope.

Une lame est préparée et conditionné pour ce test. Elle est inoculée d'une suspension jeune et incubée 3 et 24h. Après incubation la lame est lavée avec du PBS puis colorée avec du cristal violet à 1%. L'observation est réalisée au microscope à l'objectif x100 à immersion.

V. 5. Evaluation de l'hydrophobicité

Une culture jeune estensemencée dans 5ml de BHIB puis incubée à 37°C pendant 24 heures. Une suspension de 105 UFC/ml est préparée (**A0**). Un volume de cette suspension est mis en contact avec l'hexane. Le solvant est séparé de la phase aqueuse puis la densité optique de cette dernière est mesurée (**A1**). Le calcul du pourcentage de bactéries adhérentes est effectué.

RESULTATS
ET DISCUSSION

I. DESCRIPTION DE LA POPULATION

I.1. REPARTITION DE LA POPULATION SELON L'AGE

Pour le prélèvement effectué, les échantillons étaient composés de 10 patients, dont 07 hommes et 3 femmes, pour un total de 15 plaies. L'âge de l'échantillon s'étend de 30 à 90 ans, pour un âge moyen de 66,90 ans. Sur les 10 patients, nous avons pu isoler 10 souches bactériennes de différents genres et espèces bactériennes.

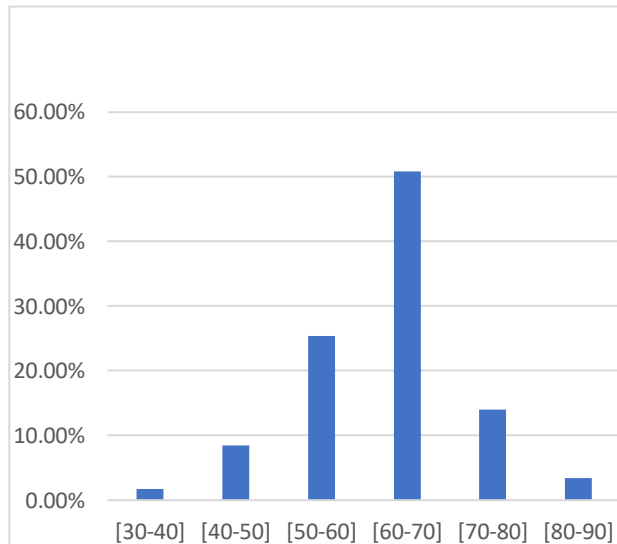


Figure 13 Histogramme relatif à la tranche d'âge [30-90] ans.

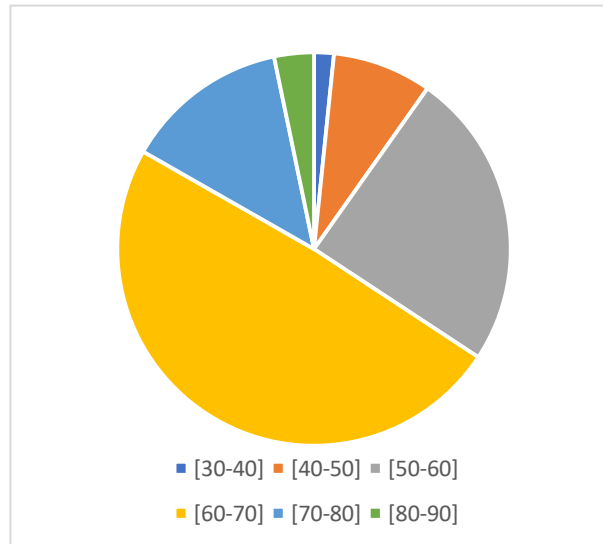


Figure 14. Secteur correspondant à la population concernée [30-90] ans.

Nous pouvons déduire que la population concernée par le pied diabétique, concerne la tranche d'âge [60-70] ans. L'âge influe considérablement sur la sensibilité aux infections. Selon les données rapportées (OMS, 1972), il apparaît que les vieillards sont le plus sujets aux infections (Berche *et al.*, 1989).

L'âge entraîne un déclin fonctionnel du système immunitaire, et est associé à un dysfonctionnement marqué par l'apparition de phénomènes au immunes. Le processus dégénératif chez les personnes âgées, est marqué par une peau atrophiée, fragile sujette à des ulcères chroniques et inexorablement infectés (Berche *et al.*, 1989).

I.2. REPARTITION SELON DES PATIENTS SELON LE SEXE

La majorité de nos patients, sont de sexe masculin, soit 70% hommes, contre 30 % de femmes.

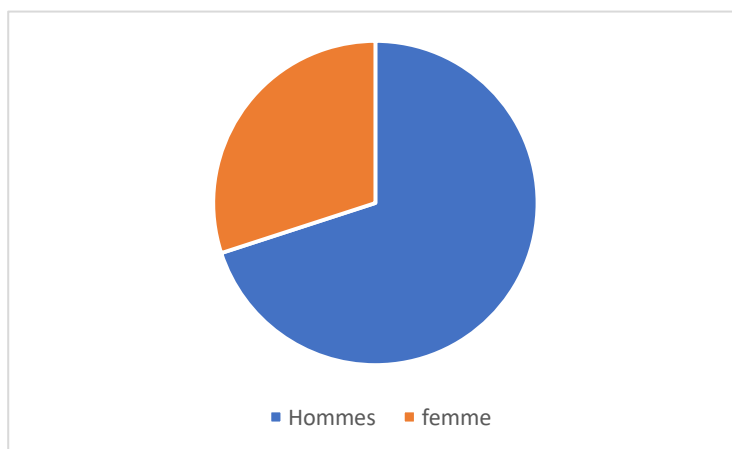


Figure 15 : Répartition des patients selon le sexe de l'individu.

Le pied diabétique touche la population masculine, beaucoup plus que la population féminine. Cela peut s'expliquer par la tendance des femmes à prendre davantage en charge les soins médicaux et l'hygiène personnelle, même si d'autres facteurs ne peuvent être exclus. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que le sexe masculin et un mauvais contrôle glycémique sont des facteurs de risque indépendants des infections du pied diabétique.

Plus d'hommes présentaient des infections plus profondes et plus complexes que les femmes. De plus, nous avons observé un pourcentage accru de infections chez les hommes à des âges plus précoces que chez les femmes.

I.3. REPARTITION SELON LE TYPE DE DIABETE

Sur les 10 patients, sur lesquelles les prélèvements ont été effectués 9 d'entre eux présentaient un diabète de type 2 soit 90%. Les patients ayant un diabète de type 2 représentaient 6 hommes, soit 60 %, contre 3 femmes, soit 30%. Le diabète de type 2 (apanage du pied diabétique), peut passer inaperçu pendant de nombreuses années, car cliniquement « muet », sans signe d'alerte et sans altération général.

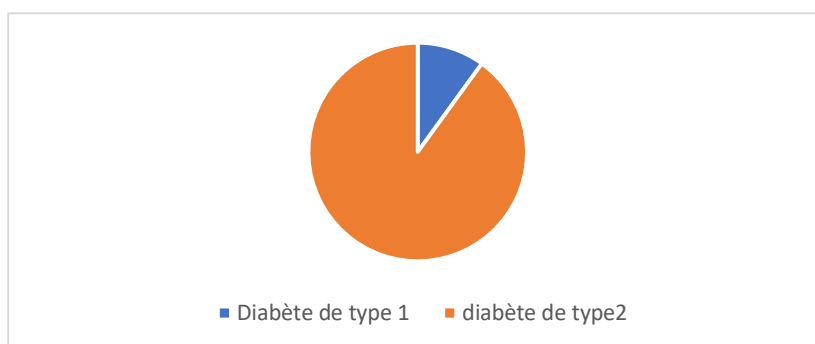


Figure16 : Répartition des patients selon le type de diabète

II. L'IDENTIFICATION PAR MACROMETHODE

II.1. RESULTATS DES EXAMENS MACROSCOPIQUES ET MICROSCOPIQUES DES SOUCHES ISOLEES

A partir des prélèvements effectués et des souches fournis par notre encadreur nous avons pu isoler 23 souches et qui appartiennent à des genres différents :

II.1.1. Le genre staphylocoque

Le milieu de Chapman est un milieu au mannitol, hypersalé, qui est milieu sélectif pour les staphylocoques à l'exception de quelques espèces halophiles appartenant à d'autres genres bactériens.

Les colonies à auréole jaune mannitol + sont présomptives de *Staphylococcus aureus*. Les colonies sont de 0.5 à 1mm de diamètre à 24 heures. Les colonies sont convexes, rondes, lisses, brillantes opaques et avec une consistance translucide (Figure 17).

2^{ème} aspect de colonies sur milieu Chapman (souche 27 A) montre des colonies de taille moyenne de 1 à 3 mm, d'une forme bombée, la surface est lisse, les colonies sont opaques avec une consistance crémeuse et une couleur blanche. Après coloration de Gram, les Staphylocoques apparaissent comme des cocci à Gram positif de 0.8 à 1µm de diamètre isolés, diplocoques et majoritairement en amas (Figure 18).

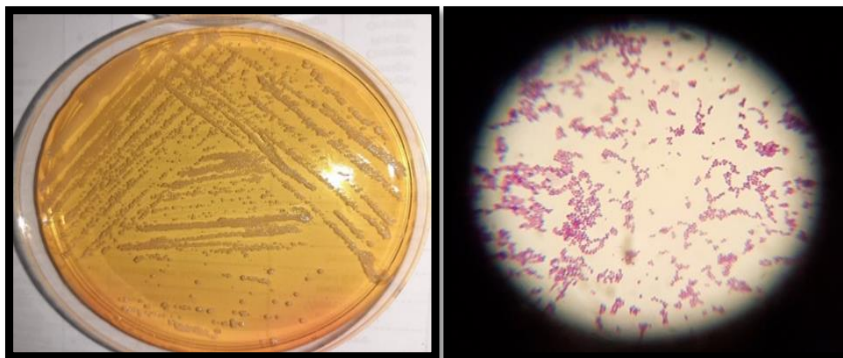


Figure 17 : examen macroscopique et microscopique des bactéries du genres *Staphylococcus* Manitol +

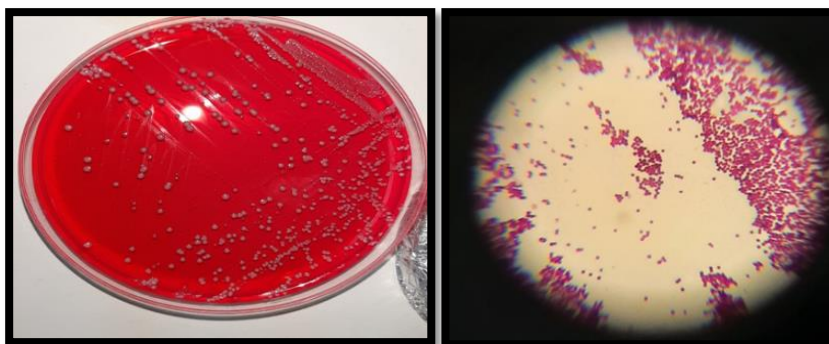


Figure18: Examen macro et microscopique des bactéries du genre *Staphylococcus* à colonies blanches
D'autres souches (S17-S21-S29) présentait un aspect macroscopique semblable à celui de la souche 27A sur la Gélose Chapman. L'aspect microscopique de la souche 17 montre des Cocci gram positif regroupés en tétrade (Figure 19).

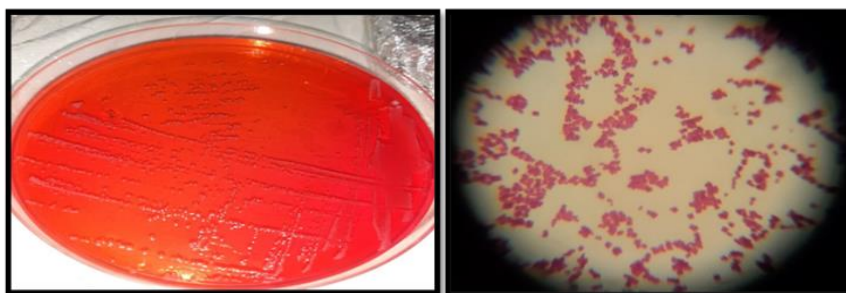


Figure19: Examen macro et microscopique des bactéries du genre *Staphylococcus* à aspect microscopique en tétrade.

II.1.2.les entérobactéries

La figure ci-dessous montre l'aspect macroscopique des colonies sur milieu Mac Conkey, un milieu sélectif pour l'isolement des bacilles Gram négatif, ce milieu contient deux inhibiteurs de la flore Gram +, les sels biliaires et le cristal violet, Le milieu contient un critère de différenciation, le lactose dont l'utilisation est révélée par le virage à la couleur rouge en milieu acide comme pour la souche 5R

Les colonies apparaissent de tailles moyennes, plates, lisses, opaques et crémeuses, leur couleur rouge est dû à l'acidification du milieu, suite à l'utilisation du lactose par la souche (souche lactose positive). L'observation microscopique montre des bacilles à Gram négatif. Les souches présentant ces caractéristiques sont : souche 05R et souche B.

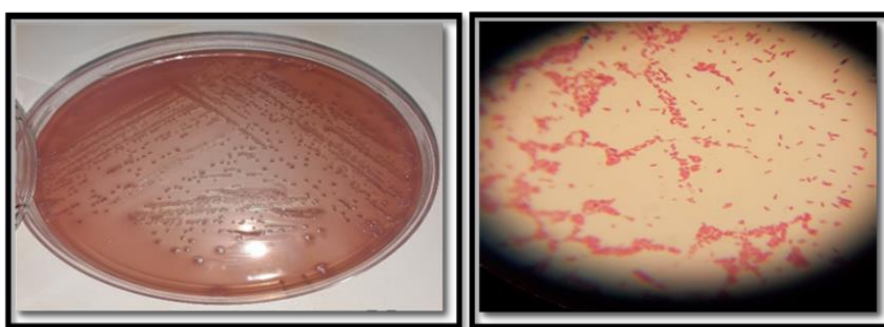


Figure 20 : Aspect macroscopique et microscopique des bacilles Gram négatif à colonies rouges.

La figure 21 montre l'aspect macroscopique et microscopique des colonies sur milieu Mac Conkey. Les colonies apparaissent de tailles moyennes, plates, lisses, brillantes, translucides et crémeuses. Les colonies sont de couleur jaune (souche lactose négative). L'observation microscopique montre des bacilles à Gram négatif. Les souches présentant ces caractéristiques sont : la souche 05 J, la souche 06 et la souche C.

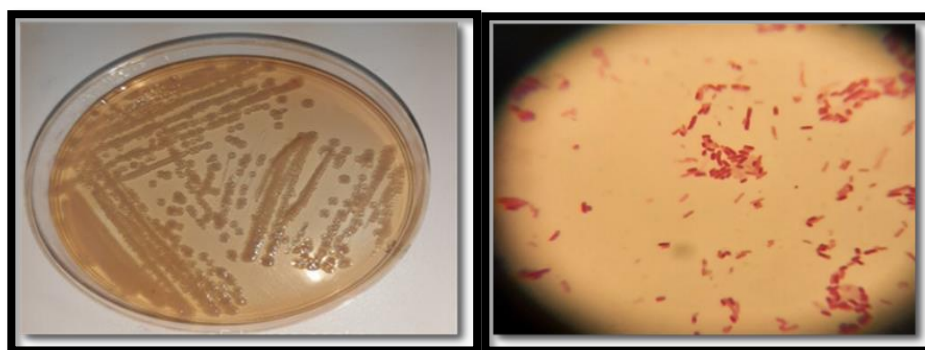


Figure 21: aspect macroscopique et microscopique des entérobactéries à colonies jaune.

II.1.3. Le genre streptocoque

La gélose au sang est une base nutritive additionnée de 5 % de sang frais utilisée pour la culture des germes exigeants et pour mettre en évidence leur pouvoir hémolytiques. L'aspect macroscopique montre que les *Streptocoques* ont donnés de petites colonies grisâtres, translucides, en grain de semoule, lisse et brillante avec absence d'hémolyse. L'examen microscopique après coloration de Gram montre des Cocci gram positifs de diamètre inférieur à 2 μm , ils sont regroupés en diplocoques ou en chainettes de longueur variable (Figure 22).



Figure22 : Aspect macro et microscopique des bactéries du genre Streptococcaceae

II.1.4. Le genre *Pseudomonas*

L'examen macroscopique sur le milieu (Mac conkey) montre des colonies qui produisent un pigment marron verdâtre bombées, irrégulière, coalescentes, de grande taille $>3\text{mm}$, d'une surface brillante avec une consistance muqueuses, l'examen microscopique montre des Bacilles Gram négatif (Figure 23).

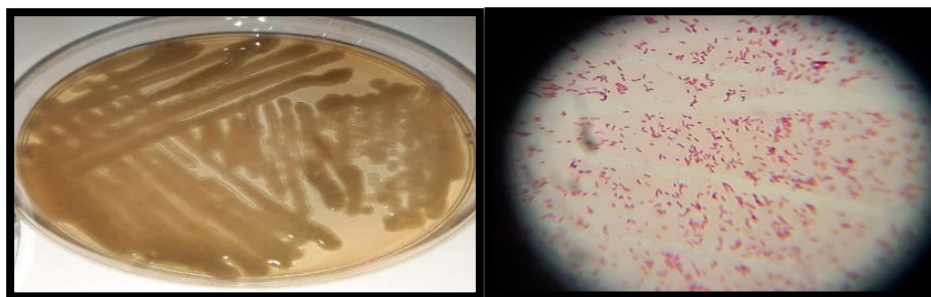


Figure23 : Aspect macro et microscopique des bactéries appartenant au genre *Pseudomonadaceae*

II.1.5. Les *Corynébacteries*

La figure ci-dessous montre l'aspect macroscopique des colonies sur le milieu gélose au sang frais. Les colonies apparaissent de petite taille, hémolytiques, crémeuses. L'observation microscopique montre des bacilles à Gram positif certaines droites d'autre incurvées regroupés souvent en lettre U ou V. Les souches présentant ces caractéristiques sont : la souche D, 12. Souche 7, souche 13, souche 4.

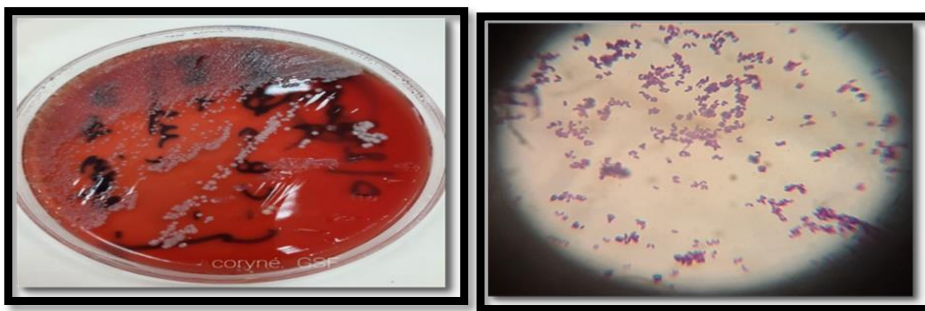


Figure 24: aspect macroscopique et microscopique des *Corynébactéries*.

II.1.6. Le genre *Aerococcus*

Sur boîte les colonies apparaissent grisâtres, taille >3mm bombées, rugueuses, opaques, de type β hémolytique. La coloration de Gram montre des germes disposés en tétrades, associées à des diplocoques et des petits amas ; on ne note pas de chaînettes, ni de grappes la souche présentant ces caractéristiques est la souche 2 (Figure 25).

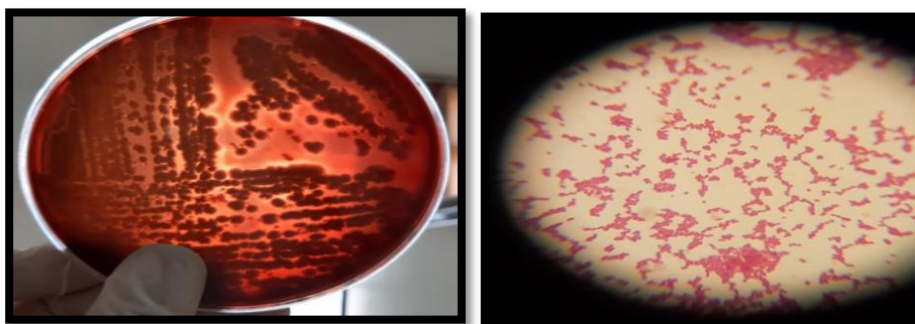


Figure 25 : aspect macroscopique et microscopique des *Aerococcus*.

II.1.7. Bacilles Gram positif

La figure ci-dessous montre l'aspect macroscopique des colonies sur milieu M17. Les colonies apparaissent de taille moyenne, légèrement bombées, lisses, brillantes, translucides, de consistance crémeuse et de couleur crème. L'observation microscopique montre des bacilles à Gram positif. Les souches présentant ces caractéristiques sont : souche 20, souche 22, 27B.

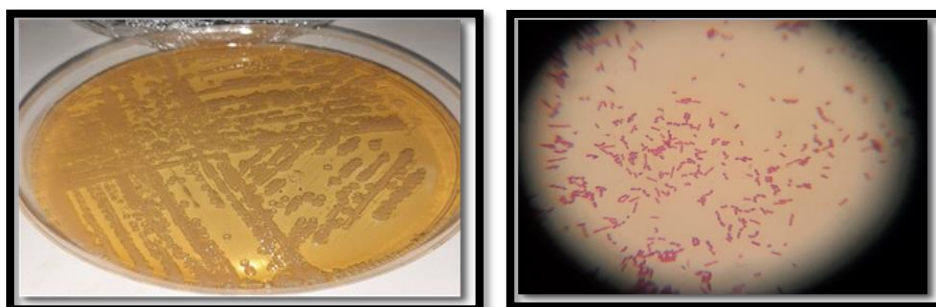


Figure 26: aspect macroscopique et microscopique des bacilles à Gram positif.

II.2. Coloration de spores

La coloration des spores et le type respiratoire sont les test clés pour distinguer les bacilles à Gram positifs, la coloration de spores effectuées (à chaud) ne montre aucune présence de spores pour les souches 04, souches 20, souches 22, ce qui explique que ces bactéries n'appartiennent pas aux genres sporulés, ce test doit être suivi par une confirmation de croissance sur milieu VF pour mettre en évidence leur type respiratoire (Figure 27).



Figure 27 : Aspect microscopiques après coloration au vert de Malachit

L'aspect microscopique après coloration au vert de Malachit montre que les cellules végétatives apparaissent colorées en rouge, et absence de forme sporulée.

II.3. Test de catalase

La détection de catalase permet de différencier, parmi les Cocci à Gram positif, les staphylocoques des streptocoques, après dépôts de colonies sur une goutte de H₂O₂ à 1 % la formation immédiate de bulles d'oxygène témoigne de la présence d'une catalase (Figure 28). La catalase est un caractère constant chez les staphylocoques, les souches *S. aureus*, souche 27 A, S29, souche21, souche17 produisent une catalase.

D'autres souches possédant une catalase, sont : 5J, souche 5R, souche 6, souche C, souche B, qui appartiennent aux genre Entérobactéries, et la souche E également Par ailleurs la catalase est absente chez les souches 2 F et D et les autres BGP.

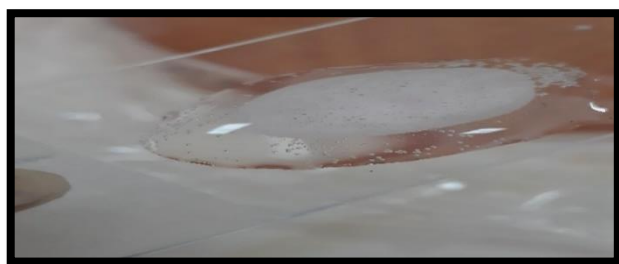


Figure28 : résultat positif au test de la catalase

II.4. Test de coagulase

Le test LATEX concerne les bactéries du genre *Staphylocoque* et consiste à mettre en évidence du facteur d'affinité pour le fibrinogène présent à la surface de *S.aureus* , et également la recherche de la protéine A qui peut être retrouvée chez *S.aureus* , après avoir ajouté sur une goutte du réactif sur l'un des cercles de la carte d'agglutination 2à3 colonies on observe : pour la souche (A) (dans la figure 29) une réaction positive se traduit par des agglutinats rouges visibles à l'œil nu ce qui indique que cette souche est *Staphylococcus aureus*.

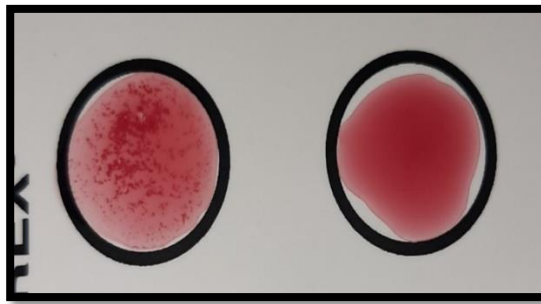


Figure 29 : résultat positif du test LATEX

Pour les autres souches (figure30) on ne remarque pas d'agglutination ce qui indique que ce sont des *Staphylocoques* à coagulase négative (SCN).

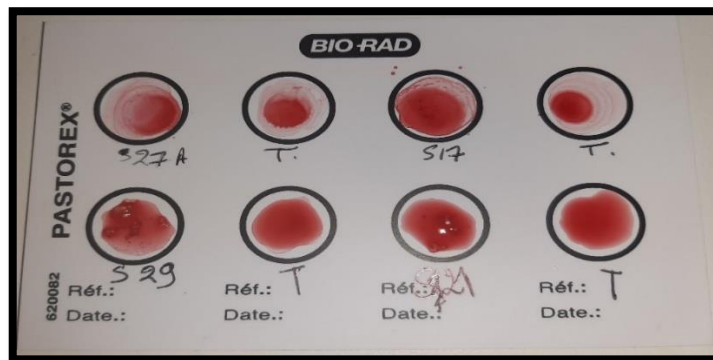


Figure30: résultat négatif du test Latex

II.5. Mise en évidence du type respiratoire des bactéries

Ce test est réalisé à l'aide de la gélose Viande de foie, les résultats montrent que la totalité des souches sont aéro-anaérobies facultatif sauf pour la souche (F) qui a un métabolisme anaérobie mais aérobie tolérants.

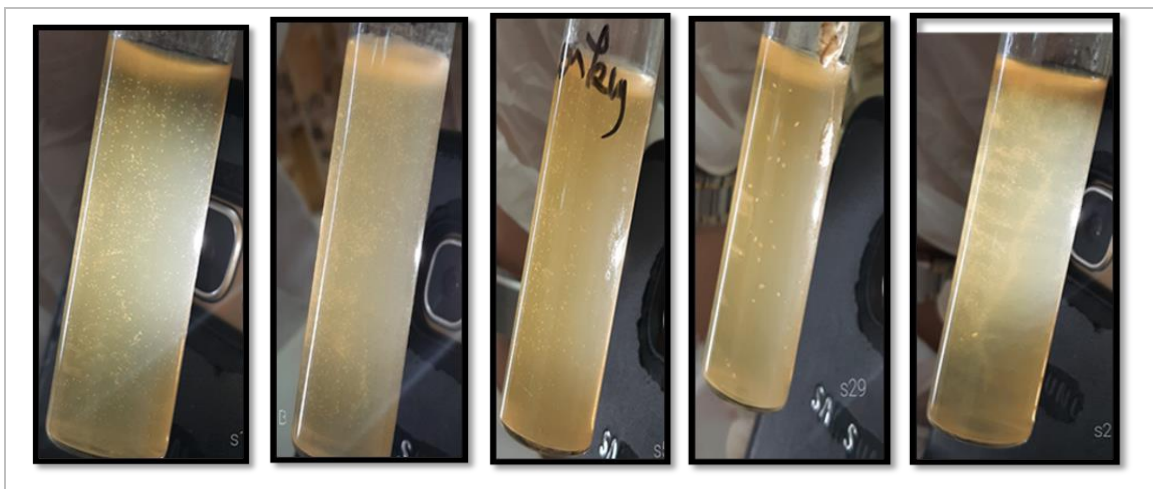


Figure31: Croissance sur milieu VF des souches aéro-anaérobie facultatif (souche 17-S27B-S5R S29 -S21respectivement).

Résultats et discussion

Parmi les souches testées seulement 3 souches sont productrices de CO₂ souche 5J-souche 6-souche 4 (figure 33) ceci se traduit par une fragmentation de la gélose VF donc seulement 13 % des souches sont productrices du CO₂ vis-à-vis 87% des souches qui ne le produisent pas.

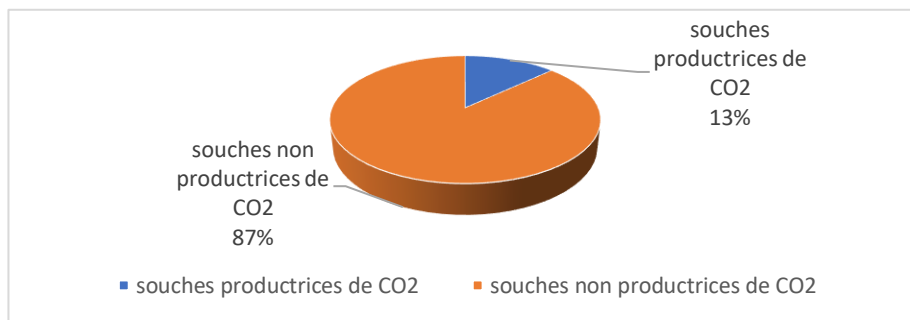


Figure32 : Répartition des souches selon la production du CO₂

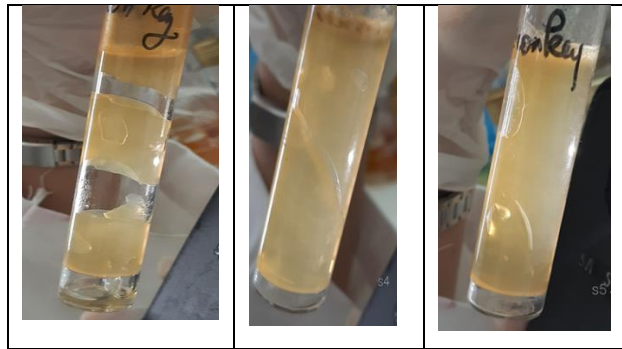


Figure33 : Croissance sur milieu VF avec proction de CO₂

II.6.Test mannitol mobilité

Ce milieu permet l'étude de la dégradation du mannitol qui est un produit de dégradation du mannitol. Pour l'étude de la mobilité, les bactéries mobiles peuvent se déplacer dans la gélose molle exemple pour les souches souche S5 J -S6-S5R-B-G (figure 34), ces dernières appartiennent aux genre Entérobactérie. D'autres bactéries sont également mobiles tels les souches 27B – S4.

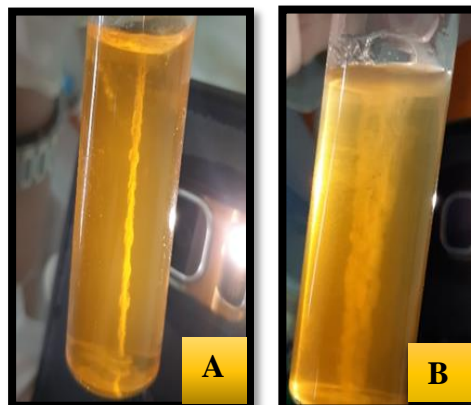


Figure34 : Croissance sur milieu (Mannitol mobilité). A : souche immobile, mannitol négatif (souche 2). B : souche mobile, mannitol positif (souche 6)

Résultats et discussion

Les bactéries du genre staphylocoques (souche A – les SCN : S29-S21-S17-S27A) et *Corynebacterium* sont immobiles, et quelques Bacilles Gram positifs, souche 22 – souche 20 – souche 7

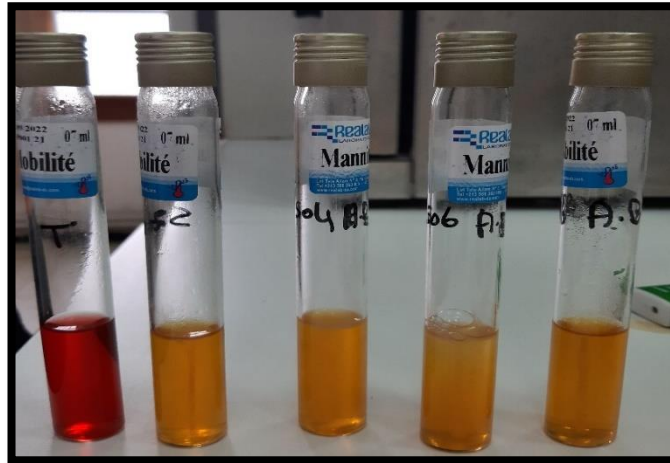


Figure35 : Résultat positif du test Mannitol-mobilité

Pour l'utilisation du mannitol, la totalité des souches sont mannitol positif, ceci est révélé par le virage de la couleur du milieu du rouge vers le jaune (figure 35).

II.7. Mise en évidence de la fermentation du glucose et du saccharose et du lactose

II.7.1. Test sur milieu TSI

Pour ce test, 2 sucres ont été utilisés : le glucose et le saccharose, il est principalement utilisé pour la caractérisation biochimique des entérobactéries et des Salmonelles. La réalisation de ce test nous a permis de mettre en évidence l'attaque du glucose ainsi que l'attaque du saccharose par voie fermentative suite à l'ajout de l'huile de parraine. Lorsque l'un des glucides est fermenté, la baisse du pH fera passer le milieu de l'orange rougeâtre (la couleur originale du à la présence du rouge de phénol) au jaune. Une couleur rouge foncé indique une alcalinisation des peptones. Pour la fermentation du glucose, toutes les souches ont présenté un résultat positif mis à part les souches : 27A et 22. Pour la fermentation du saccharose, toutes les souches ont présenté un résultat positif sauf pour la souche 22.



Figure36: test glucose – (B) à côté du témoin (A).



Figure37 : test glucose + (B) à côté du témoin (A).

II.7.2. Test sur milieu Kligler et Hajna

Ce test été réalisé pour la mise en évidence de l'attaque du lactose par voie fermentative, il a une grande importance dans l'identification des bacilles à Gram négatif. Il permet aussi la réalisation du test ONPG pour les bactéries lactose (-). La dégradation du lactose par les bactéries entraîne une acidification du milieu et un virage de couleur de l'indicateur du milieu (le rouge de phénol) du rouge au jaune. Toutes les souches testées ont révélé être capables de fermenter le lactose sauf les souches 13 et 22 (Figure 38).

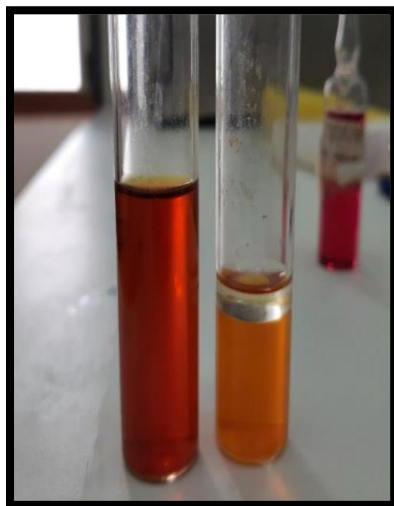


Figure 38 : test lactose + (à droite) à côté du témoin (à gauche).

II.8. Test ONPG

Ce test complémentaire à l'étude de dégradation du lactose est utilisé pour détecter l'enzyme β -galactosidase, présente dans les fermenteurs tardifs (Les fermenteurs de lactose tardifs sont très difficiles à distinguer des non-fermenteurs de lactose car les deux apparaissent sous forme de colonies incolores sur la gélose Mac Conkey). Le test ONPG n'a été réalisé que pour les souches lactose (-) ; les souches 13 et 22 (Figure 38)

Après 30 minutes d'incubation, le tube d'ONPG contenant la souche 13 a viré au jaune : **test ONPG (+)**, tandis que le tube contenant la souche 22 n'a pas viré au jaune : **test ONPG (-)**

II.9. test citrate de Simmons

Ce test a été réalisé pour la mise en évidence de la fermentation du citrate de sodium par les souches étudiées. L'utilisation du citrate de sodium comme source de carbone par les bactéries a entraîné une acidification du milieu le faisant virer du vert au bleu après quelques jours d'incubation. Les souches **citrate (+)** ayant provoqué un bleuissement du milieu sont les souches 12, 22 et 6. Le reste des souches sont **citrate (-)** (Figure 39)

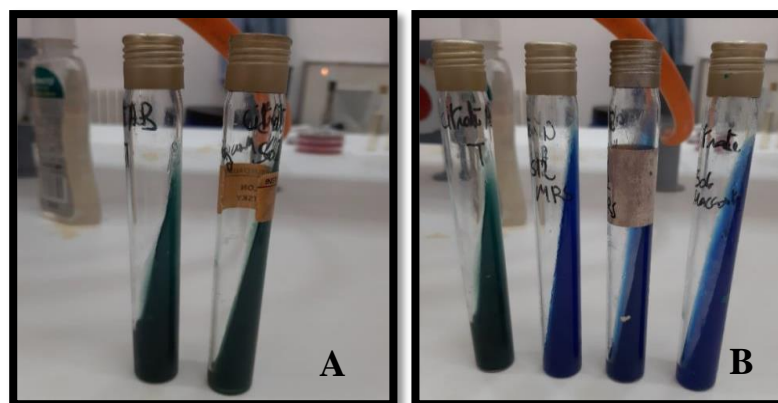


Figure 39 : Résultat du test citrate **A** : un test citrate négatif (à droite) à côté du témoin (à gauche). **B** : test citrate positif (bleu) à côté du témoin (vert).

II.10. Galeries biochimiques

L'identification peut tout d'abord être réalisée à partir du tableau d'identification qui accompagne chaque galerie. Ce dernier présente les résultats de tous les tests biochimiques figurant dans la galerie (avec éventuellement des tests complémentaires, pour toutes les bactéries identifiables sur cette galerie. Les résultats des tests sont toujours exprimés en pourcentage positifs. Les résultats des tests biochimiques, positifs ou négatifs, sont portés sur les chéquiers, selon chaque galerie, et traduits par un code, constitué de sept chiffres. Celui-ci, est introduit dans le logiciel UPBM : logiciel d'identification des bactéries avec les galeries API / ID32 est proposé aux laboratoires sur le site et donne le nom de l'espèce identifiée, suivie du pourcentage d'identification.

III. IDENTIFICATION PAR MICROMETHODE

III.1. LA GALERIE API 20 E

L'inoculation des 4 galeries api 20E avec les souches 06, G, 5R, B et 5J a permis d'identifier les espèces *Enterobacter cloacae*, *Raoultella ornithinolytica*, *E.coli*, *Salmonella choleraesuis* et *Enterococcus faecium*, la plupart de ces espèces sont des commensales du tube digestif de l'homme (Figure 40).



Figure 40 : Identification des souches par la galerie API 20 E. **A** : *Enterobacter cloacae* **B** : *Raoultella ornithinolytica*. **C** : *E. coli*. **D** : *salmonella choleraesuis* **E** : *Enterococcus faecium*.

Résultats et discussion

L'inoculation des 4 galeries api 20E avec les souches 06, G, 5R, B et 5J a permis d'identifier les espèces *Enterobacter cloacae*, *Raoultella ornithinolytica*, *E.coli*, *Salmonella choleraesuis* et *Enterococcus faecium*.

III.2.LA GALERIE API 20NE

L'inoculation des 2 galeries api 20NE avec la souche E et la souche C a permis d'identifier les espèces *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas maltophila*. *P. aeruginosa* pouvant quelques fois être pathogène pour l'homme, *P. maltophila* est le plus souvent pathogène chez les patients immunodéprimés (Figure 41).



Figure 41 : Identification des souches par la galerie API 20 NE. A : Identification de la souche E : *Pseudomonas aeruginosa* . C : *Pseudomonas maltophila*.

III.3.API STREPTO

L'inoculation des 2 galeries avec la souche F et la souche 02 a permis d'identifier les souches *Streptococcus acidomonimus* et *Aerococcus viridans*, les 2 souches sont souvent responsables d'infections chez les humains (Figure 42).



Figure 42: Identification des souches par la galerie API Strepto. A : *Streptococcus acidomonimus*. B : *Aerococcus viridans*

III.4.API CORYNE

L'inoculation des 2 galeries api Coryne avec la souche D et la souche 13 a permis d'identifier les espèces *Corynebacterium ulcerans* et *Corynebacterium pyogens*, la première étant commensale chez les animaux et pouvant infecter les humains tandis que la deuxième est pathogène pour les animaux et les humains (Figure 43)



Figure 43 : Identification des souches par la galerie API CORYNE. A : *Corynebacterium ulcerans* . B : *Corynebacterium pyogens*.

IV. REPARTITION DES SOUCHES ISOLEES

La diversité des bactéries dans les plaies chroniques est considérée comme un facteur important à la chronicité et à la gravité des ulcères du pied diabétique (Sugandhi *et al.*, 2014).

Le nombre de souches isolées est de 23 souches et le nombre de souches identifiées est de 20, réparties selon six familles (Figure 44).

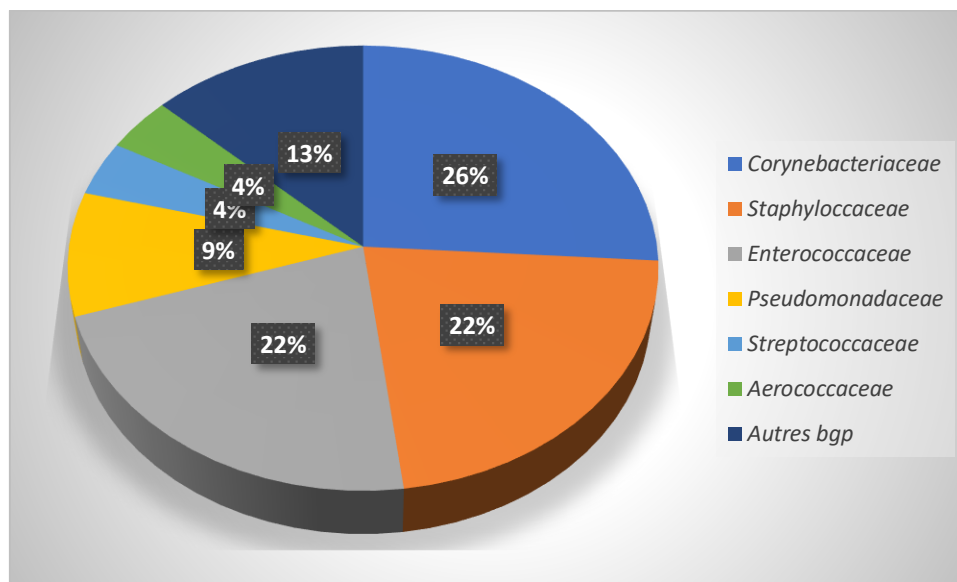


Figure 44 : Répartition des souches isolées

La famille la plus dominante est celle des *Corynebacteriaceae* avec un taux de 26,08 %, représentée par les souches *Corynebacterium pyogenes*, soit un taux de 17,39 % (Souches 12, 27 B, 7 et 13), et les souches *Corynebacterium ulcerans* (Souche D), et *Cellulomonas* spp, avec un taux 4,34 % pour chacune d'elles.

Ces résultats sont en accord avec l'étude menée par Scot E. Dowd *et al.* en (2008) sur la nature polymicrobienne des infections de biofilms d'ulcère du pied diabétique chronique. Cette étude confirme que le genre bactérien le plus répandu associé aux plaies chroniques diabétiques est *Corynebacterium* spp.

Ce genre bactérien est associé à des infections impliquant des articulations et des fractures ouvertes. Une autre étude a associé *Corynebacterium* à l'ostéomyélite du pied diabétique.

D'autres études (Mac Farlane *et al.*, 1986 ; Ceilley *et al.*, 1977) ont abouti à l'importance de *Corynebacterium* dans les ulcères du pied. Ce genre peut être considéré comme non pathogène car faisant partie de la « flore normale » de la peau et des muqueuses humaines. Des bactéries telles que *Staphylococcus epidermidis* avaient été précédemment considérées à tort comme non pathogènes pour la même raison (Cogen *et al.*, 2008)

Bien que *Corynebacterium* ne soit pas une cause fréquente d'infections aiguës, ce genre semble être un acteur commun (mais négligé) dans les infections chroniques de l'ulcère du pied diabétique (Bessman *et al.*, 1992)

Résultats et discussion

Par ailleurs les résultats obtenus par (Ge Y et al., 2002) confirment que le genre *Corynebacterium jeikeium*, est considéré comme un agent pathogène opportuniste chez les patients diabétiques (il pénètre dans les tissus mous ou les os nécrotiques et joue un rôle pathogène).

La seconde famille, est celle des *Staphylococcaceae*, avec un taux de 21,73 %, représentée par *Staphylococcus aureus* avec un taux de 4.34 % (Souche S. aureus), et les Staphylocoques à coagulase négative (SCN), avec les souches S 29, S. 21, S. 17 et S. 27 A, pour un taux global des SCN, de 17,39 %.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Lavery et al., 2014) (travaux sur les facteur de risques des S.aureus résistant à la méticilline), et qui indiquent que le genre Staphylocoque est parmi les organismes infectieux les plus courants dans les infections du pied diabétique

Une étude réalisée par (Lavery et al.,2014) indique que la présence d'un portage de *S. aureus* résistant à la *méthicilline* peut également prédisposer le patient à une réinfection.

Cependant, l'incidence et la prévalence de *Staphylococcus aureus* résistant à la *méticilline* (SARM) ont tous deux augmenté, ce associé à une mauvaise utilisation des antibiotiques et à des réglementations non restrictives contrôlant l'abus d'antibiotiques (Fair et al., 2014).

La plupart des travaux et des expériences réalisés ont montrés que *S. aureus* est l'espèce la plus dominante dans les infections du pied diabétique, par contre peu de travaux ont démontré la prévalence des SCN par rapport au *S.aureus*.

Mais cela peut s'expliquer par le fait que de nombreuses souches de Staphylocoque à coagulase négative (SCN), tels que *Staphylococcus epidermidis* habitent la peau où elles constituent environ 90% du microbiote cutané normal. En général, ces bactéries ne sont pathogènes que lorsque la barrière cutanée est rompue ou perforée lors d'une lésion ou d'une technique médicale effractive, les bactéries ont tendances à former des biofilms qui les protèges contre le dessèchement et les désinfectants. Les SCN sont donc d'importants agents pathogènes (Martin.,2011)

La troisième famille est celle des *Enterobacteriaceae*, avec un taux de 21.73 %, représentée par *Escherichia coli* (souche 5R), *Enterobacter cloacae* (souche 6), *Enterococcus faecium* (souche 5J), *Salmonella choleraesuis* (souche B), et *Raoutella ornithinolytica* (souche G), soit un taux de 4.34 % pour chacune de ces dernières.

Enterobacter est un genre appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* qui est principalement associé aux infections liées aux soins de santé (Darnelle et al., 2020).

Dans une étude réalisée par Sugandhi et al. en (2014), dans 65,21 % des cas ,*P. aeruginosa* a montré une implication mitigée avec d'autres des organismes tels que *E. coli*, *Enterococci spp.*, *S. aureus*, et *Proteus spp.*, ce qui montre la similitude avec nos résultats. Dans une autre étude, Wheat et al. utilisent une approche avancée pour la culture de bactéries, et leurs résultats appuient nos conclusions. Ils ont découvert que *Staphylococcus*, *Enterocobacterium* et *Corynebacterium* étaient les bactéries aérobies (ou facultatives) les plus courantes dans les ulcères du pied.

Résultats et discussion

Les bactéries à Gram négatif qui sont considérées comme la flore normale de la peau, comme *Enterobacter spp*, *Citrobacter spp.* et *P. aeruginosa*, peuvent provoquer de graves lésions tissulaires chez les diabétiques et ne doivent jamais être automatiquement ignorés dans les ulcères du pied diabétique (Mike et al., 2004).

La quatrième famille est celle des *Pseudomonadaceae*, avec un taux de 8.68 %, représentée par les souches, *Pseudomonas aeruginosa* (Souche E), et *Pseudomonas maltophilia*, (Souche C), avec de 4.34 % chacune.

Dans une étude de (Alhubail et al., 2020) qui travaillaient sur Le profil microbiologique des ulcères du pied diabétique au Koweït indique que les bactéries Gram-positives, telles que *Staphylococcus aureus*, et les bactéries Gram-négatives, telles que *Pseudomonas aeruginosa*, sont parmi les agents pathogènes les plus courants.

Dans la même étude, leurs résultats ont montré que la plupart des isolats à Gram positif étaient *Staphylococcus aureus* (19,9%), *Staphylococcus aureus* à coagulase négative (15,7%), *Streptococcus spp.* (5,7 %), SARM (5,0 %) et *Enterococcus faecalis* (4,3 %). Au sein des isolats à Gram négatif, le spectre des souches était plus large et les principaux isolats étaient *Pseudomonas aeruginosa* (12,8%), *Klebsiella* (8,2%), *Enterobacter* (7,8%), *Escherichia coli* (7,1%) et *Proteus spp.* (4,3%), on en déduit que leurs résultats sont analogues avec les nôtres. *Pseudomonas aeruginosa*, un organisme multirésistant aux médicaments, a été signalé comme étant très répandu chez les patients atteints d'infection du pied diabétique (Shankar et al., 2005 ; Saseedharan et al., 2018 ; Tascini et al., 2011).

Ces observations sur la prévalence de *Pseudomonas aeruginosa* suggèrent une variabilité régionale probablement due aux environnements microbiens et aux pratiques de soins de santé telles que la collecte et le traitement des échantillons. (Shankar et al., 2005 ; Saseedharan et al., 2018).

Wheat et al. ont suggéré que *P. aeruginosa* peut causer de graves lésions tissulaires chez les diabétiques et ne doit jamais être considéré comme insignifiant dans les ulcères du pied diabétique. Ils ne doivent jamais être considérés comme des contaminants ou appartenant à une flore normale, à moins qu'ils ne soient clairement discriminés en tant qu'agents pathogènes. La conséquence de considérer ces bactéries comme des contaminants ou des commensaux peut entraîner un sepsis et une amputation (Wheat et al., 1986).

La cinquième famille est celle des *Streptococcaceae*, avec un taux de 4.34 %, représentée par *Streptococcus acidomonimus* (souche F). Les infections sévères du pied diabétique à Streptocoques semblent être en recrudescence. Elles sont particulièrement graves, notamment lorsqu'elles touchent le pied diabétique, du fait d'un retard de diagnostic. Elles sont souvent accompagnées d'une cellulite nécrosante rapidement extensive. En dépit de l'antibiothérapie adaptée, le traitement chirurgical doit souvent être agressif. Le pronostic dépend des comorbidités associées (Altrichter et al., 2005).

La physiopathologie des infections à *Streptococcus* implique, que cette bactérie puisse échapper aux défenses de l'hôte, adhérer et envahir les tissus, et s'adapter à des conditions de culture différente. Par ailleurs, il existe des facteurs de pathogénicité propres à *Streptococcus* comme les sérotypes II, III, V, VI et VII, et la présence d'acide sialique dans leur capsule. Ceci pourrait expliquer pourquoi il existe des dégâts tissulaires

considérables. La présence de la β hémolysine semble jouer un rôle important dans la physio-pathogénie des ostéomyélites à Streptocoque. Dans un modèle expérimental, la prolifération bactérienne de Streptocoque hémolytique était significativement plus importante en comparaison avec le Streptocoque non hémolytique (Altrichter et al., 2005).

La sixième famille est celle des *Aerococcaceae* (Ordre des *Lactobacilles*), avec un taux de 4.34%, représentée par *Aerococcus viridans* (souche 2). Les autres bacilles à Gram positif, avec un taux de 13.02 %, sont représentés par les souches S N, S 20, et S 22, soit un taux de 4.34 %, pour chacune d'elles.

Notre travail est en accord avec celui mené par Kadik et Abed (2019), concernant la présence des Cocci à Gram positif, telle que les Staphylocoques, ainsi que les Bacilles à Gram négatif, tels que les Entérobactéries.

Cependant, notre étude, n'a identifié aucune bactérie du genre *Bacillus*, ou la présence de forme sporulée chez les bacilles à Gram positif, comme celles rencontrées dans les travaux de Kadik et Abed (2019).

Nous avons pu isolés six familles bactériennes différentes avec des physiopathologies différentes ce qui indique que la nature microbienne des plaies du pied diabétique est polymicrobienne, ceci peut être confirmé par de nombreux travaux, et des études récentes indiquent que ces infections sont le plus souvent d'origine polymicrobienne, et que le staphylocoque peut même ne pas être présent. En plus des organismes aérobies, les organismes anaérobies sont fréquemment cultivés et ils peuvent être le principal organisme infectant.

Traditionnellement, les études microbiennes du microbiote de la plaie se sont concentrées sur le rôle d'agents pathogènes facilement cultivés et bien connus tels que *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ces organismes sont cultivés facilement à l'aide d'évaluations microbiologiques traditionnelles et, par conséquent, les méthodes standard surestiment probablement la contribution de ces espèces au microbiote des plaies chroniques. Actuellement, les communautés médicales et de recherche commencent à se rendre compte que la diversité des populations bactériennes dans les plaies chroniques peut être un contributeur important à la chronicité des plaies, telles que les ulcères du pied diabétique (Dowd et al., 2008).

À l'échelle mondiale, le nombre d'isolats trouvés dans les plaies du pied diabétique varie considérablement. Les taux d'infection polymicrobienne se sont avérés plus fréquents dans des études menées dans un certain nombre de pays différents, dont 83,7 % au Portugal, 60 % en Inde du Sud, 55,7 %, et 40 % en Italie, tandis que d'autres ont signalé des taux plus élevés d'infections mono microbiennes. Néanmoins, cette variation de la prévalence pourrait également être liée aux techniques d'échantillonnage et de traitement dans chaque étude (Rahim et al., 2016 ; Tascini et al., 2011 ; Tiwari et al., 2012).

Cependant, les résultats restent variables. Des études ont montré que *Staphylococcus aureus* est le principal agent pathogène causal, mais d'autres ont rapporté une prédominance d'aérobies à Gram négatif. Ces écarts pourraient être liés à divers facteurs, tels que la présence de différents organismes responsables à différents moments, les variations géographiques et les écologies, les conditions socio-économiques, l'hygiène, l'accessibilité à des services de santé efficaces, le type et la gravité des infections, ou profondeur de la plaie et technique de prélèvement. Ces différences dans les agents pathogènes microbiens ont déclenché des efforts

considérables pour déchiffrer leur impact sur les infections du pied diabétique et améliorer les résultats du traitement. Par conséquent, des études ont montré qu'un traitement antibiotique parentéral et oral, guidé par la culture, prévenait avec succès les amputations chez une grande proportion de patients diabétiques admis avec une infection du pied diabétique ou une suspicion d'ostéomyélite. (Lipsky et al., 2004 ; Neves et al., 2019 ; Shankar et al., 2005 ; Ertugrul et al., 2017; Dunyach et al., 2016; Pereira et al., 2017).

V.RESULTATS DE L'ETUDE DE LA FORMATION DE BIOFILM

Les biofilms sont définis comme des communautés sessiles d'origine microbienne caractérisées par des cellules qui sont irréversiblement attachées à un substrat ou les unes aux autres. Ils sont intégrés dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS) qu'ils ont produites et présentent un phénotype altéré en ce qui concerne le taux de croissance et la transcription des gènes (Donlan et al., 2002).

Au sein d'un biofilm, les bactéries communiquent entre elles par la production de particules chimiotactiques ou de phéromones, un phénomène appelé quorum sensing (Thomas et al., 2007).

La disponibilité de nutriments clés, la chimiotaxie vers la surface, la motilité des bactéries, les adhésines de surface et la présence de tensioactifs sont quelques-uns des facteurs qui influencent la formation de biofilm (Thomas et al., 2007).

Les micro-organismes qui poussent dans un biofilm sont intrinsèquement plus résistants aux agents antimicrobiens que les cellules planctoniques. Des concentrations élevées d'antimicrobiens sont nécessaires pour inactiver les organismes qui se développent dans un biofilm, car la résistance aux antibiotiques peut être multipliée par 1 000 (Stewart et al., 2001).

Dans notre étude on va examiner d'une part la capacité des organismes impliqués dans l'infection du pied diabétique à former un biofilm, et d'une autre part, ensuite l'examen microscopique après mise en contact de ces bactéries à un support en verre et en fin le calcul de l'hydrophobicité des souches examinées.

V.1.Culture sur RCA (Rouge-Congo-Agar)

Selon Freeman et al. (2009) qui ont décrit une méthode qualitative simple pour détecter la production de biofilm en utilisant le milieu Congo Red Agar (RCA), des colonies noires avec une consistance cristalline sèche ont indiqué la production de biofilm donc résultats positifs, Les producteurs de biofilm faibles rester rose, bien qu'assombrissant occasionnellement au centre des colonies observées.

La mise en évidence de la production de slime (figure 46) par les 23 souches sur milieu RCA a révélé que 91.30 % des souches testées ont formés des colonies de couleur noire et sont donc productrice de slime.

Des souches qui ont révélée ne pas être productrice de slime suite à la formation de colonies rouge sur le milieu tel que la souche *S. acidominimus* (figure 45).



Figure 45: souche non productrice de slime sur milieu RCA.

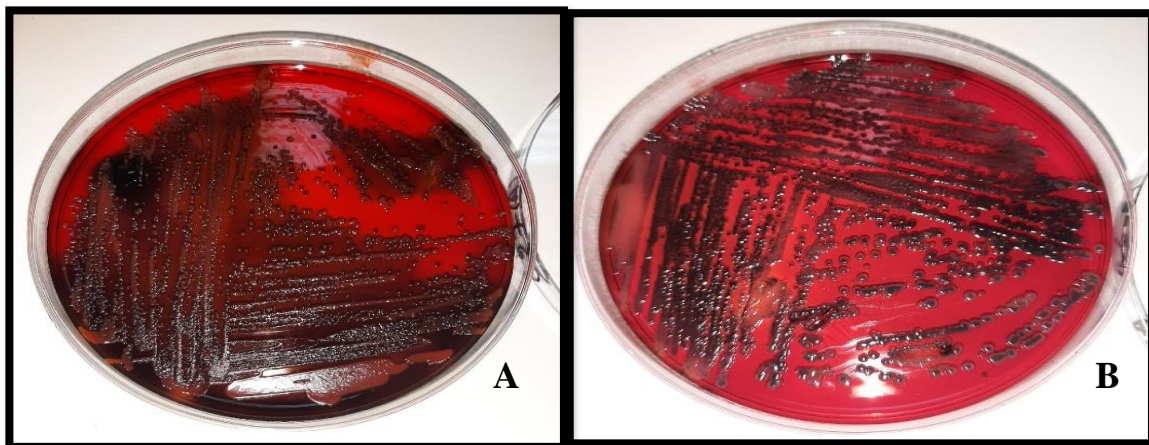


Figure 46 : Souches productrice de slime sur milieu RCA. A : Production de slime par la souche 29. B : Production de slime par la souche 27.

V.2.la méthode TCP

Le test de plaque de culture tissulaire (TCP) tel que décrit par **Christensen *et al.*,1995** est la méthode la plus largement utilisée et est considérée comme la méthode standard pour la détection de la formation de biofilm (**Christensen *et al.*,1995**). Un biofilm est attaché à un substrat et se compose de nombreuses bactéries co-adhérées au moyen d'appendices physiques et de substances polymères extracellulaires. Les exigences essentielles pour la croissance du biofilm sont les microbes eux-mêmes et un substrat. Si l'un de ces ingrédients est omis, un biofilm ne se formera pas (**Dunne.,2002**)

L'ensemble des souches isolées ont été testées pour leur capacité à former des biofilms sur un support en polyester (figure 47) après 24 heures d'incubation.

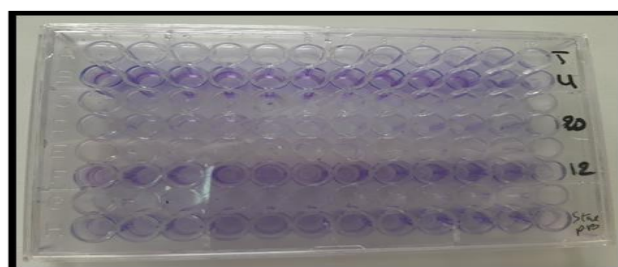


Figure 47: Résultat de la formation de biofilm par technique TCP.

Résultats et discussion

Parmi les isolats bactériens des infections du pied diabétique, la méthode TCP a révélé 65.21 % d'isolats positifs, 34.78% des souches ayant présenté un pouvoir d'adhésion visible et fort sur microplaques dont les souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium pyogenes*, *Staphylococcus aureus* avec une forte adhésion bien visible, 30.43% des souches ont présenté un pouvoir d'adhésion modéré. Pour les reste des souches 26%, l'adhésion sur microplaque été à peine visible donc c'est des bactéries non productrices de biofilm.

Nos résultats sont en accord avec une étude réalisée par (**Kala Harika et al., 2020**). Leurs résultats indiquent que parmi 92 isolats bactériens de plaies chroniques, la méthode standard TCP a détecté 64 (69,5 %) isolats aussi forts et 8 (8,6 %) isolats modérément producteurs de biofilm et les 20 isolats restants (21,7 %) étaient des bactéries qui ne produisent pas de biofilm.

Le test sur microplaque utilisant le cristal violet est une méthode indirecte de quantification des biofilms. Le cristal violet ne colore pas spécifiquement toute la biomasse viable ou morte, ni la matrice du biofilm. Cette coloration évalue la réponse globale du biofilm d'une souche (**Burton et al., 2007 ; Aliane, 2018**).

Comme décrite dans le chapitre matériel et méthode cette technique est semi-quantitative, et afin de pouvoir quantifier le biofilm formé en l'absence de lecteur ELISA, le contenu des puits de chaque souches (1 à 2 puits par souche) a été ensemencé sur milieu PCA et incubé à 37°C pendant 24 heures.

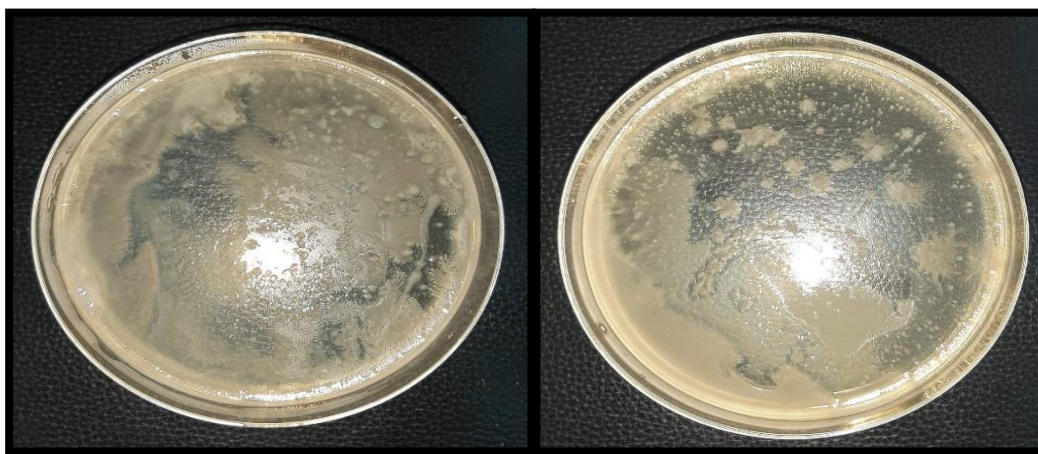


Figure 48: Résultats de l'ensemencement sur milieu PCA.

Les résultats du dénombrement des colonies formées après 24 heures d'incubation et la répartition des souches selon le nombre de colonies formées sont regroupés dans le tableau 10.

Tableau 10: Répartition des souches selon le dénombrement des colonies sur milieu PCA

| faible production | modérée | forte production |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| | S27A(SCN) | <i>C.ulcerans</i> |
| S17(SCN) | <i>S.choleraesuis</i> | <i>S. aureus</i> |
| S21(SCN) | <i>R.ornithinolytica</i> | S20 (BGP) |
| <i>E.coli</i> | <i>E.cloacae</i> | <i>S.acidominimus</i> |
| <i>E.faecium</i>) | S29 | S27B(SCN) |
| | | S12 (<i>C.pyogens</i>) |
| | | <i>P.maltophilia</i> |
| | | <i>A.viridans</i> |
| | | <i>P.aeruginosa</i> |
| | | S22(BGP) |
| | | S7(<i>C.pyogens</i>) |
| | | S13(<i>C.pyogens</i>) |
| | | <i>Cellulomonas spp</i> |

V.3.la méthode en tubes (TM)

Cette technique classique de la mise en évidence de la formation de biofilm repose sur l'appréciation visuelle du pouvoir d'adhésion des cellules sur un support en verre. L'apparition d'un film bien visible sur les murs de tubes à la suite d'une coloration au cristal violet est indicatrice d'adhésion cellulaire et donc d'un résultat positif. Les résultats après mesure de la densité optique des tubes sont dans la figure 49 :

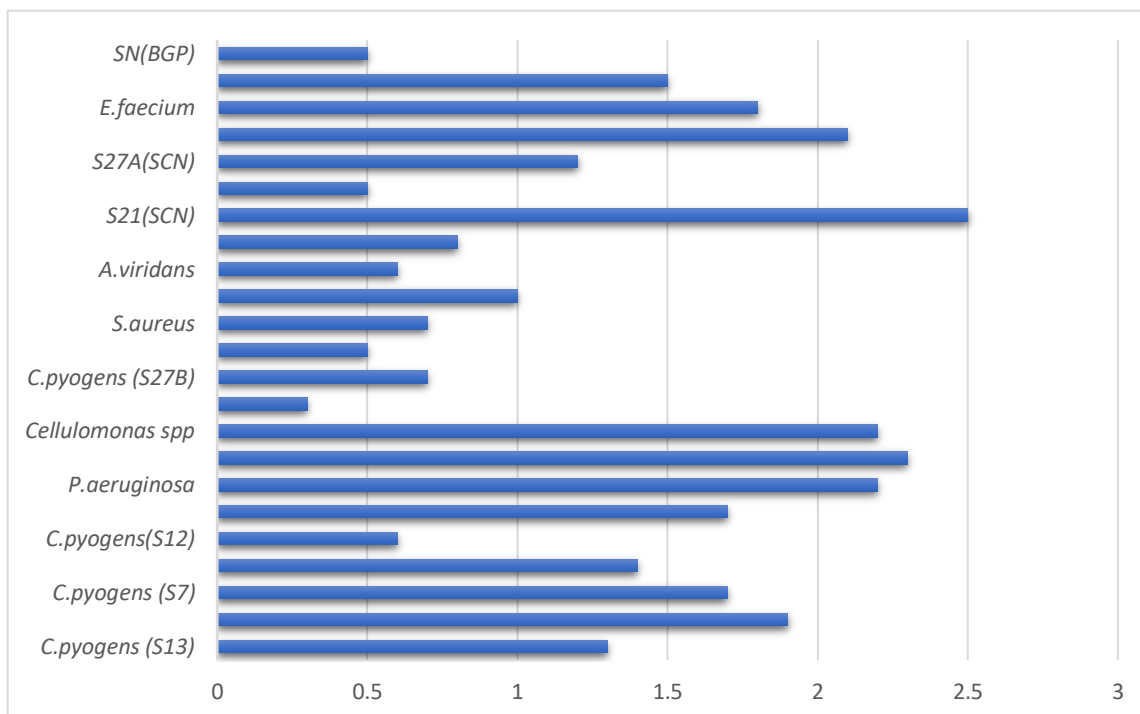


Figure49 : Les résultats après mesure de la densité optique des tubes

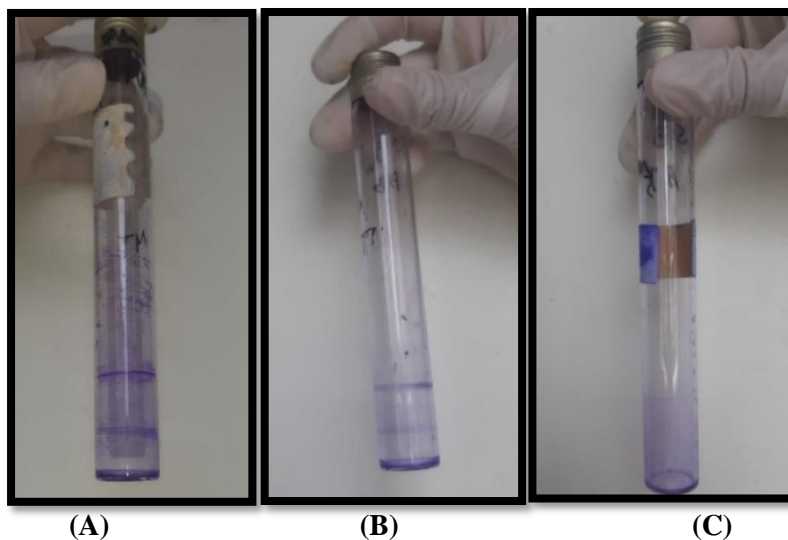


Figure 50 : Résultats de la formation de biofilm par technique TM.

(A) souche fortement formatrice, (B) souche formatrice modérée, (C) souche faiblement formatrice.

Cette technique étant à l'origine qualitative et ne permettant pas vraiment de quantifier le taux d'adhésion cellulaire, la densité optique de chaque tube a été mesurée dans le but de rendre cette méthode plus précise.

Les résultats de la technique TM sont différents à ceux obtenus par la méthode TCP, il est possible de constater que les souches ayant une $DO > 1.5$ sont de 39.13 % et ont un fort potentiel d'adhésion cellulaire sur un support en verre.

Tandis que les souches ayant une DO comprise entre 0.5 et 1.5 sont de 39.13 % et possèdent un potentiel d'adhésion modéré. Le reste des souches testées présentent un faible pouvoir d'adhésion modéré soit 17.39 % et leur DO ne dépassent pas 0.5 .

Nos résultats sont semblables à ceux obtenus par (Kala *et al.*, 2020) par Tube Method (TM), le nombre d'organismes qui ont montré une forte formation de biofilm était de 13 (14 %) et 21 (23 %) organismes ont montré une formation modérée et environ 58 (63 %) isolats ont montré une formation de biofilm faible ou nulle.

V.4. Méthodes de visualisation du biofilm sur lames de microscope : méthode de goutte

Dans notre étude sur l'adhésion, nous avons utilisé des lames en verre pour la microscopie comme substrats pour la fixation du biofilm. Dans cette étude, nous avons tenté de répondre à deux questions spécifiques : le taux de bactéries capable à adhérer sur une surface en verre donc, par conséquent à former un biofilm, et la relation conséquente existante entre le temps et le taux d'adhésion (l'observation microscopique des lames, a été réalisée après 3h d'incubation et après 24h d'incubation).

La recherche de l'adhésion après 3h a révélé que sur 23 souches isolées, soit 73.91 % des bactéries ont pu être observé sous microscope par rapport à 26.08 % des souches avec une adhésion faible ou absente.

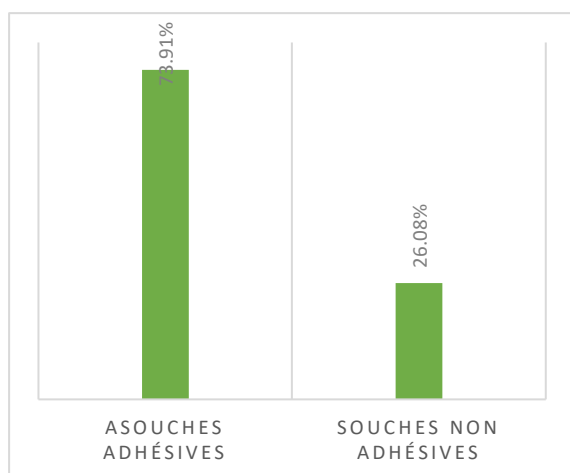


Tableau11 : Les souches adhésives sur lame en 3h de 3h d'incubation

Les souches adhésives au bout de 3h d'incubation

| | |
|-----------------------|----------------------------|
| <i>S. aureus</i> | <i>Cellulomonas.spp</i> |
| <i>Les SCN</i> | <i>P.maltophila</i> |
| <i>E. faecium</i> | <i>S.acidomonimus</i> |
| <i>S. cholerasuis</i> | <i>Aerococcus viridans</i> |
| <i>E. cloacae</i> | <i>Les BGP</i> |
| <i>E. coli</i> | <i>C.ulcerans</i> |
| <i>P. aeruginosa</i> | <i>C.pyogenes</i> |

Figure51 : pourcentage d'adhésion après 3h

En revanche, après incubation pendant 24h seulement 8.69% des souches ont montrés une adhésion sur lames, très faible et inobservable. Cependant, 91.30% des souches ont pu être observées sous microscope, et parfois, avec une production de slime microbiens. Les souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium pyogens*, *Staphylococcus à coagulase négative* (S17-S21S-27A) ont une forte adhésion et avec une charge microbienne élevée à 3h et à 24 par rapport aux autres souches qui présentaient une adhésion modérée.

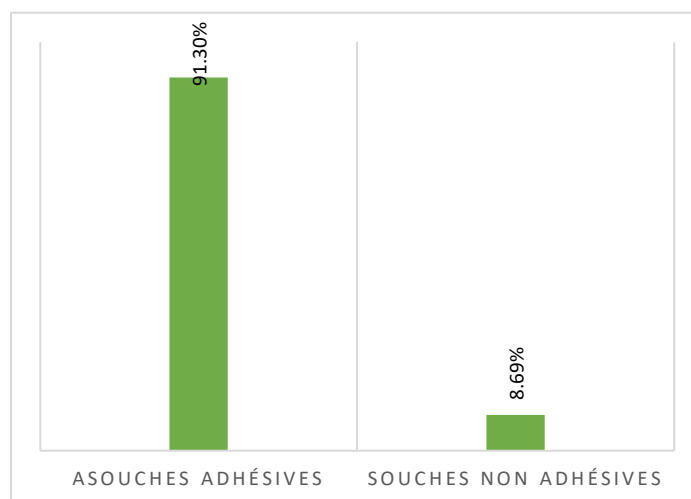


Figure 52 : Pourcentage des souches adhésives et non adhésives après 24h d'incubation

Pour la relation temps /adhésion, nos résultats indique que la charge et la densité microbienne sur les lames après une incubation 24h sont plus fortes et plus élevées qu'une adhésion de 3h, ce qui peut expliquer que, plus le temps de mise en contact des microorganismes avec la surface est long, plus le taux d'adhésion des micro-organismes est élevé, on en déduit que cette relation est « temps dépendante ».

Résultats et discussion

Les observations microscopiques ci-dessous, ayant révélés des résultats après 3h d'incubation et après 24h concluent en une cinétique croissante (Figure 53-55).

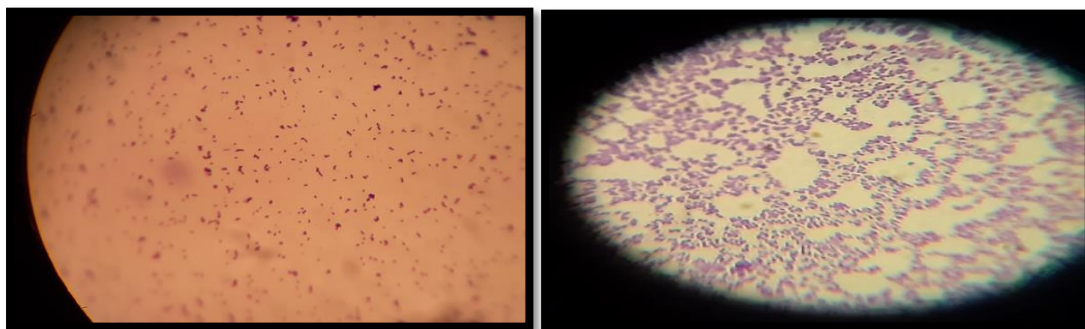


Figure 53 : *P.aeruginosa* après incubation de 3h et après 24h

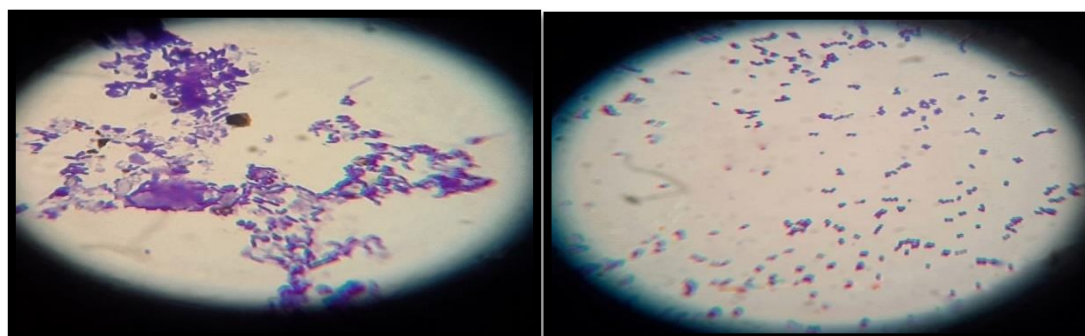


Figure 54 : L'adhésion de *Corynebacterium ulcerans* après 3h et après 24h

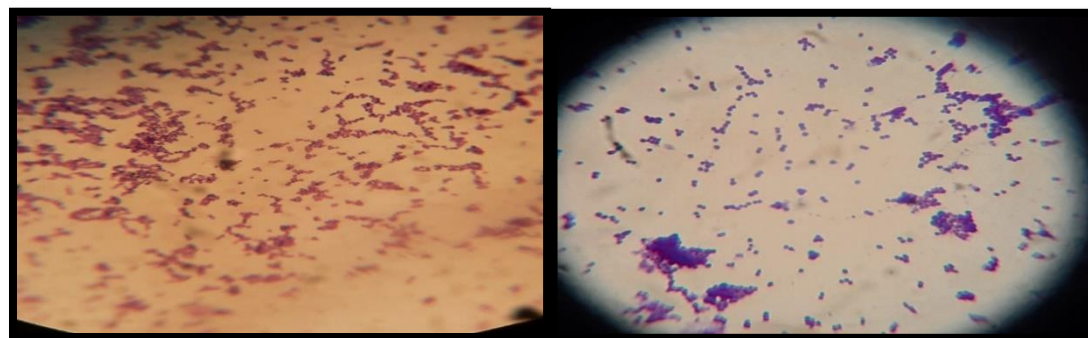


Figure 55: L'adhésion de *S.aureus* après 3h et après 24h

V.5. Evaluation de l'hydrophobicité

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence, la capacité de toutes les souches isolées, à adhérer au solvant, l'hexane. Après traitement des souches, par centrifugation, lavage..., la densité optique de chaque souche a été réglée dans un intervalle de $DO = 0.7-0.8$ (soit A_0).

Après mise en contact des souches, sous forme de suspension bactérienne de 2 ml, avec l'hexadécane, une deuxième densité optique a été mesurée, soit A_1 , pour toutes les souches.

Résultats et discussion

Les résultats obtenus, relatifs aux Staphylocoques, montrent que les valeurs de leurs absorbances A_0 sont nettement supérieures à celles de leurs absorbances A_1 , et ce, pour toutes leurs souches.

Les souches S21 ($D_0 = 0.2$), et S17 ($D_0 = 0.2$), ayant une densité optique A_1 , la plus faible, sont les souches ayant présenté une adhésion la plus élevée, au solvant utilisé.

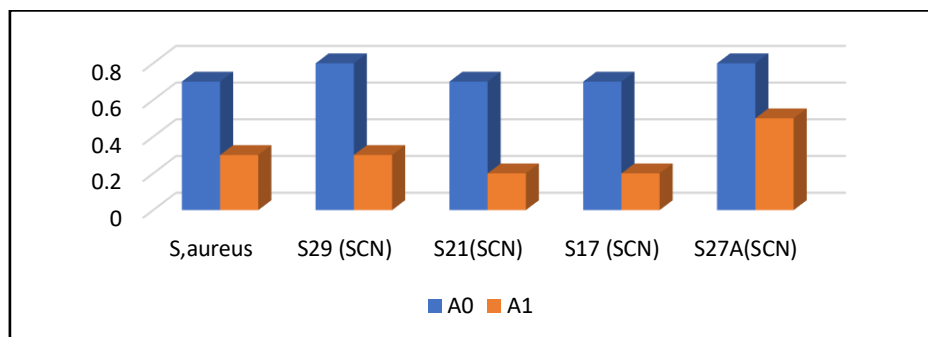


Figure 56 : La densité optique des Staphylocoque

Pour le genre *Corynebacterium*, les souches ayant la densité optique A_1 la plus faibles sont les souches avec une adhésion la plus élevée, les souches concernées sont (souche 7, souche D, souche 13) avec une $A_1 = (0.2, 0.3, 0.3)$ respectivement. En revanche la souche avec une DO (A_1) moyenne, a une adhésion modérée, la souche concernée est souche 4 avec $A_1 = 0.4$. En dernière position les souches qui ont présenté un petit écart entre A_0 et A_1 sont (souche 27 B et souche 12) avec DO ($0.7, 0.8$).

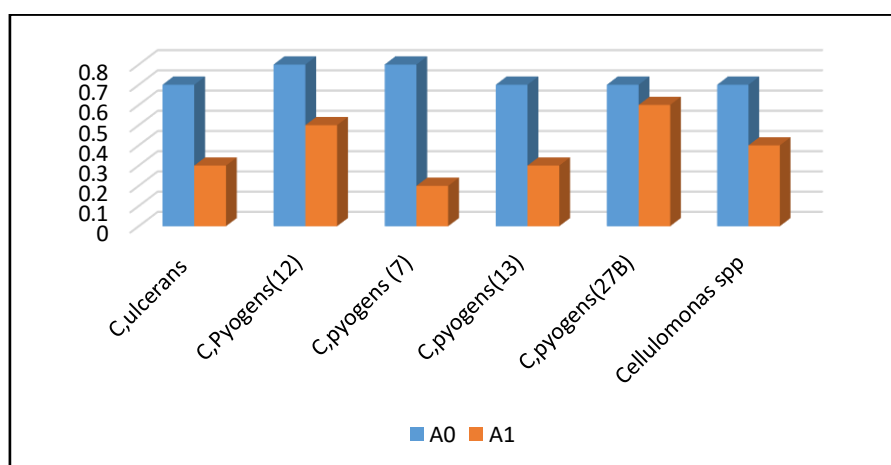


Figure 57 : La densité optique des Corynébacteries.

Pour les Enterobactéries, la souche *Escherichia coli*, ayant une densité optique A_1 la plus faible, soit de 0.3, possède une adhésion la plus élevée.

Contrairement à cela, les souches *Salmonella choleraesuis* ($D_0 = 0.5$), *Enterococcus faecium* ($D_0 = 0.6$) et *Enterobacter cloacae* ($D_0 = 0.6$), ayant une valeur de densité optique A_1 élevée, ont une adhésion plus faible.

La souche *Raoutella ornithinolitica*, de densité optique $A_0 = A_1 = 0.7$, ne présente aucune adhésion au solvant.

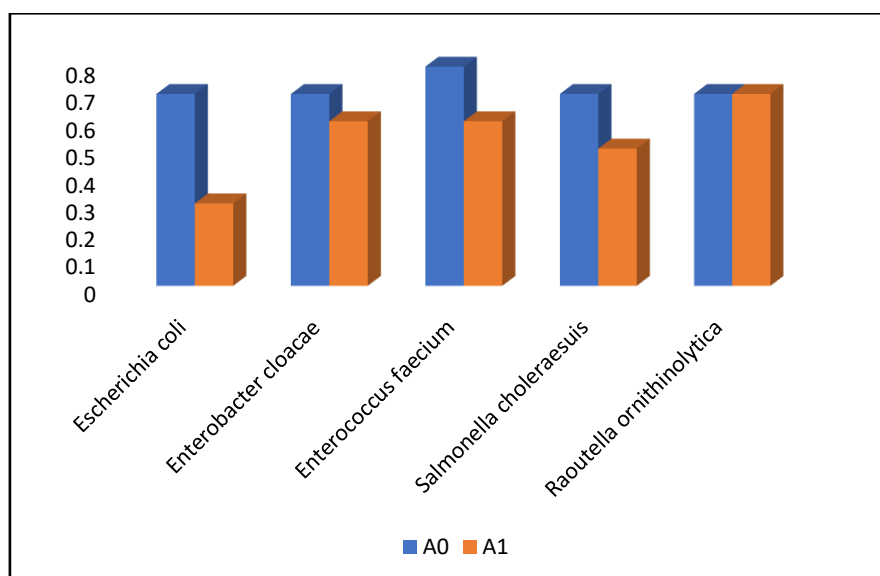


Figure 58 : Densité optique des Entérobactéries.

Les souches *Pseudomonas maltophilia*, les BGP S17 et S20, de même densité optique $A_1=0.2$, la plus faible, présentent l'adhésion au solvant, la plus élevée.

Les souches *Streptococcus acidominimus*, *Aerococcus viridans*, *Pseudomonas aeruginosa* et les autres BGP, de densité optique moyenne $A_1=0.5$, présentent une adhésion au solvant plus modérée.

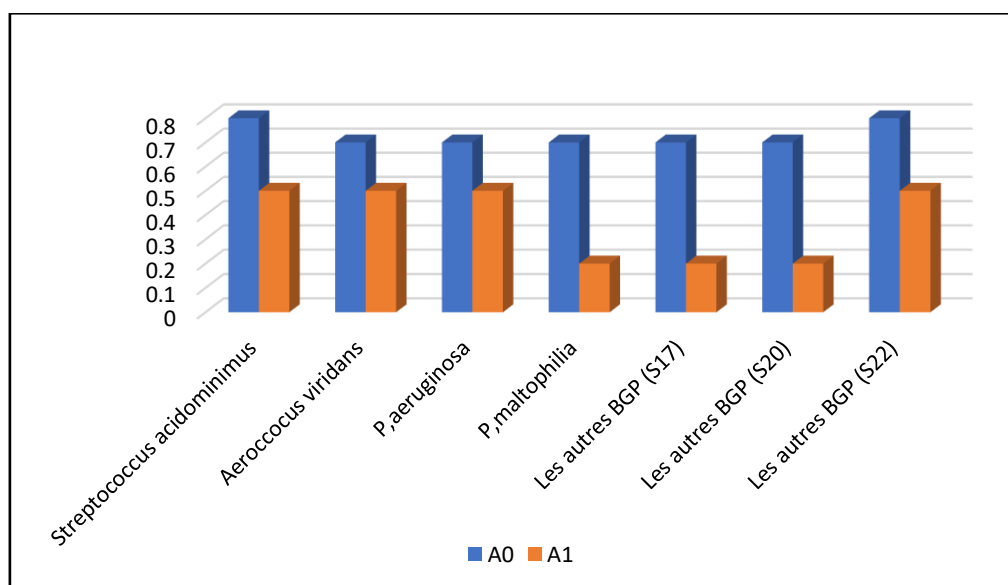


Figure 59 : la densité optique des Streptocoques -Aerococcus-Pseudomonas-Les autres BGP

Afin de présenter des résultats plus significatifs, nous avons pu déterminer le pourcentage d'adhésion de chacune des souches au solvant, l'hexane, c'est-à-dire leur hydrophobicité. Le graphe suivant explique les résultats obtenus (Figure 60).

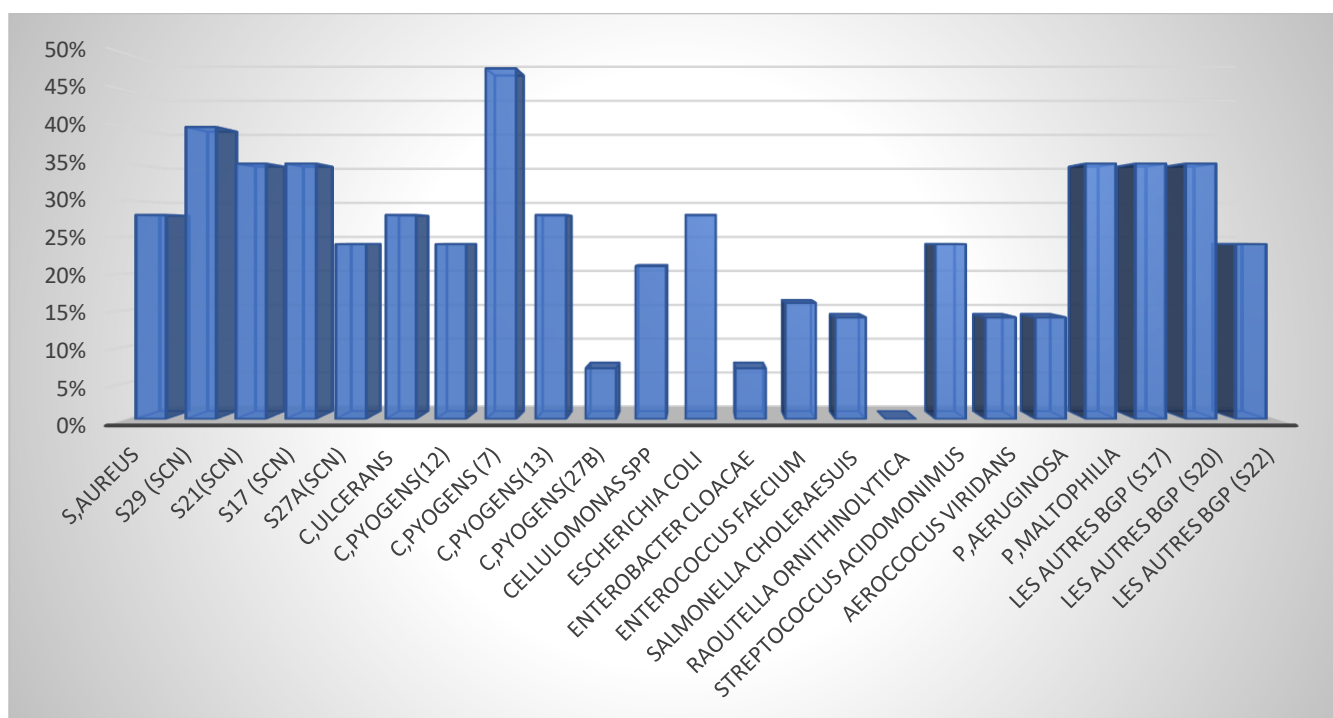


Figure 60 : Pourcentage de l'hydrophobicité de la totalité des souches

La souche *Corynebacterium pyogènes* (7), qui présente un taux des cellules adhérentes au solvant le plus élevé, soit de 48 %, est la souche la plus hydrophobe.

Les souches SCN (S29, S21, S17), *Pseudomonas maltophilia* et les autres BGP (S17 et S20), dont le pourcentage des cellules adhérentes au solvant, est compris dans l'intervalle 35-40%, possèdent une hydrophobicité assez élevée.

Les souches *S. aureus*, SCN (S27A), *C. ulcerans*, *C. pyogènes* 12, *C. pyogènes* 13, *Cellulomonas spp*, *E. coli*, *Streptococcus acidominimus* et les autres BGP (S22), dont le pourcentage d'adhésion des cellules au solvant, varie entre 21 et 28%, présentent une hydrophobicité moyenne.

Les souches *C.pyogènes* (27B), *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella choleraesuis* et *Aerococcus viridans*, ayant un pourcentage d'adhésion au solvant compris entre 7-16 %, présentent une hydrophobicité faible.

La souche *Raoutella ornithinolytica*, dont le pourcentage d'adhésion est de 0%, ne présente aucune hydrophobicité.

La totalité des souches, à l'exception de *Raoutella ornithinolytica*, ont présenté un pourcentage plus ou moins élevé, d'hydrophobicité, donc d'adhésion au solvant, et plus à même de former des biofilms.

Résultats et discussion

Etant donné que les résultats ont montré une certaine adhérence de ces bactéries, on en conclue, que les isolats testés, sont hydrophobes. Les cinq méthodes utilisées pour la détermination de biofilms, ont présenté des résultats différents :

La méthode RCA, est une méthode qualitative, et les résultats ont montré que la totalité des souches sont formatrices de biofilms, à l'exception de quelques souches tel que *Streptococcus acidomonimus*.

La méthode TCP, est une méthode semi-quantitative, et les résultats, après dénombrement sur milieu PCA, présentent une certaine concordance, avec la méthode TM : Par exemple S17 à coagulase négative, *Enterobacter cloacae*, *S. choleraesuis* et la souche S22 (BGP), ont été révélées comme négatives, dans les deux méthodes TCP et TM. Pour certaines souches (S21, S7 et S27 B), ces deux méthodes ont présenté des résultats différents. Cela peut être expliqué par la nature du support, sur lequel ont adhéré, les souches (Pour la méthode TCP, l'adhésion est effectuée sur des microplaques en polyester, et pour la méthode TM, l'adhésion est effectuée sur des tubes en verre).

La méthode en lame, nous a permis de visualiser l'adhésion des souches, sur un support en verre (observation microscopique), et a permis d'aboutir à de bons résultats, étant donné que 91.30 % des souches ont été révélées.

La méthode de détermination de l'hydrophobicité, à partir des isolats testés, est une méthode quantitative, nous a permis de révéler le taux d'adhésion au solvant des souches testées, donc la capacité de former un biofilm, demeure la méthode ayant donné de meilleurs résultats.

Etant donné que les souches identifiées proviennent de l'infection du pied diabétique, par les différentes méthodes citées, on en déduit que la nature du biofilm est polymicrobienne.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Mottola et al. en (2015)** qui ont évalué l'influence des communautés polymicrobiennes sur la capacité des isolats des plaies du pied diabétique à produire un biofilm, après avoir évalué la formation de biofilm par 95 Isolats appartenant à plusieurs genres bactériens (*Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* et *Acinetobacter*). Tous les isolats étaient positifs pour le biofilm en 24 h, et la quantité de biofilm produit augmentait avec le temps d'incubation. *Pseudomonas* a présenté la production de biofilm la plus élevée, suivi de *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus* et *Enterococcus*.

Les communautés polymicrobiennes ont produit des valeurs de biofilm plus élevées que les espèces individuelles. *Pseudomonas* + *Enterococcus*, *Acinetobacter* + *Staphylococcus* et *Corynebacterium* + *Staphylococcus* ont produit un biofilm plus élevé que ceux formés par *E. faecalis* + *Staphylococcus* et *E. faecalis* + *Corynebacterium* (**Mottola et al.,2015**).

Des recherches récentes ont montré qu'au cours de l'infection, en particulier au niveau de la plaie, une seule espèce bactérienne n'est pas responsable de la formation de biofilm (**Zhao et al., 2013**). Au lieu de cela, les microbes représentent une communauté complexe de biofilms polymicrobiens communiquant entre eux (**Peters et al.,2012**). La proximité et le contact entre les bactéries du biofilm favorisent la communication et les échanges. Pour adapter leur comportement, les bactéries communiquent par l'intermédiaire de molécules

Résultats et discussion

diffusibles comme les homosérines lactones ou quinolones pour les bactéries Gram-négatives, tandis que les cocci Gram-positifs utilisent des peptides courts (**Rutherford et al., 2012**).

Selon **Oates A et al** Les infections du pied diabétique sont généralement colonisées par des bactéries similaires à la peau environnante et deviennent plus complexes en diversité microbienne au fil du temps et avec la progression de l'infection (**Oates et al., 2012 ; Gardiner et al., 2017**). *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. et *P. aeruginosa* sont des organismes infectieux courants (**Gardiner et al., 2017**) mais les organismes associés à ces infections sont divers (**Gardner et al., 2013**).

Plusieurs études ont montré la présence et l'impact des biofilms dans les infections du pied diabétiques cliniques. Malik et al. ont montré que sur 162 infections du pied diabétique, des biofilms étaient présents dans 67,9 % des cas (**Malik et al., 2013**). D'autres études ont soutenu cela et, en particulier, l'implication de *S. aureus* au sein des biofilms (**Murail et al., 2014 ; Banu et al., 2015**).

Une étude précédente menée par notre équipe de recherche a montré que 83,7% des patients atteints d'UFD présentaient des infections polymicrobiennes, avec un taux d'isolement de $3,0 \pm 1,4$ bactéries par patient (**Mendes et al., 2012**). La plupart des isolats provenant d'infections aiguës étaient des Cocci aérobies à Gram positif, tandis que des communautés bactériennes plus complexes ont été isolées à partir de plaies chroniques, y compris des bactéries à Gram négatif et anaérobies (**Mendes et al., 2012**).

La nature polymicrobienne des biofilms est la cause principale de la chronicité des plaies, d'où la difficulté de traitement, par conséquent la cicatrisation de la plaie est plus longue. En fait, **Xu et al.** en **2007** ont montré qu'une charge bactérienne élevée était associée à un taux de cicatrisation inférieur. Ces bactéries peuvent exprimer plusieurs facteurs de virulence, tels que la formation de biofilm, caractérisée par des populations bactériennes polymicrobiennes organisées qui peuvent être responsables de la chronicité des infections du pied diabétique (**Dowd et al., 2008 ; Costerton., 2002**).

La nature chronique de la plaie dans les infections du pied diabétique est principalement due à la capacité de formation de biofilm de l'organisme infectieux. Par conséquent, cette caractéristique de formation de biofilm a été considérée comme le facteur de virulence important dans la pathogenèse des infections (**Lipsky et al., 2016 ; Jacobs., 2001**).

Les biofilms ne comprennent pas une bactérie isolée mais plutôt des groupes de bactéries. Ces biofilms sont très difficiles en raison des caractéristiques uniques qu'ils possèdent. (**Phillips et al., 2010**).

D'autres études dans ce domaine ont montré que chez les souris (un modèle de dyslipidémie diabétique), les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* ou *S. aureus* retardaient la cicatrisation des plaies, et que la condition diabétique ralentissait la cicatrisation et augmentait l'épaisseur du biofilm (**Zhao et al., 2012 ; Nguyen et al., 2007**).

Toutes ces études mettent en évidence la grande complexité bactérienne des plaies. Cette complexité est l'une des caractéristiques majeures des infections de la peau lésée du pied diabétique, et le manque de connaissances sur les interactions de ces micro-organismes dans la plaie rend ces infections compliquées à gérer (**Bowler et**

al., 2001) Les micro-organismes semblent être organisés en communautés multicouches entourées d'une matrice extracellulaire protectrice auto-produite, et sont organisés en différents (**Dowd et al., 2008**).

Les biofilms détectés chez les patients atteints d'ulcères du pied peuvent être responsables du retard de cicatrisation de ces plaies chroniques. De plus, la présence de certaines communautés bactériennes aux stades initiaux des plaies a été associée à un retard de cicatrisation (**Loesche et al., 2017**).

Plusieurs facteurs microbiens et hôtes spécifiques aux infections du pied diabétique peuvent interférer dans le développement et la caractéristique des biofilms :

- 1- Grande diversité bactérienne y compris des agents pathogènes opportunistes et des bactéries anaérobies. (**Dowd et al., 2008 ; Redel et al., 2013 ; Percival et al., 2018**).
- 2- Augmentation de la population de *S. aureus*, en particulier dans les infections neuropathiques. Cependant, leur microbiote présente un niveau de richesse (nombre d'espèces différentes dans la communauté de la plaie), d'abondance et de diversité similaire à celui d'autres plaies chroniques, suggérant que le microbiote n'est pas influencé par le type de plaie. (**Gardner et al., 2013**).
- 3- La profondeur de la plaie avec un microbiote plus diversifié et complexe dans la partie profonde de la plaie où s'abritent des bactéries pathogènes, notamment anaérobies. (**Lipsky et al., 2013**).
- 4- Facteurs environnementaux (p. ex., caractéristiques démographiques, hygiène personnelle, situation géographique du patient, taux glycémique élevé et exposition antérieure à un traitement antimicrobien) (**Percival et al., 2010**).
- 5- État de l'immunité des patients qui modifie le rôle des bactéries à faible virulence (par exemple, *Staphylococcus* sp. Et corynébactéries) vers une pathogénicité supérieure, et où une sécrétion excessive de cytokines pro-inflammatoires, le pH, la température ou le traitement antimicrobien (sujet ou systémique l'administration) peut augmenter la destruction des tissus (**Smith et al., 2016 ; Rahim et al., 2017**).
- 6- La durée de l'infection est positivement corrélée avec la diversité écologique des bactéries présentes dans les plaies, la richesse en espèces et l'abondance relative des *protéobactéries*. Elle est également corrélée négativement avec l'abondance relative des *staphylocoques*. (**Cogen et al., 2008**)
- 7- Une hypoxémie tissulaire locale est souvent observée à la suite d'une artériopathie obstructive. Cet environnement hypoxique influence la diversité bactérienne, avec une prévalence plus élevée de protéobactéries et de bactéries anaérobies strictes dans les ulcères plus profonds (**Patel et al., 2019**).

La diversité du biofilm favorise sa survie en créant un biofilm plus épais, ce qui entraîne des infections plus graves. Dans ce contexte, **Mottola et al.** ont rapporté que les biofilms formés par *P. aeruginosa* et *Enterococcus faecalis* et *Acinetobacter baumannii*, et *S. aureus* entraînaient un biofilm plus épais que les bactéries seules, qui étaient difficiles à éradiquer (**Mottola et al., 2016**).

Conclusion

Les patients diabétiques, en particulier ceux dont le diabète est mal contrôlé, posent des défis uniques, dans le traitement des infections. Cette population est à haut risque de développer des plaies chroniques, ce qui les expose à un risque encore plus élevé de développement de biofilms.

Notre étude a porté sur la contribution de la formation de biofilms des souches bactériennes isolées de la peau lésée chez les diabétiques. Dans une première partie, nous avons isolé les souches issues de prélèvements au niveau du pied diabétique et d'autres fournis par notre professeur encadreur

Dans un second temps, nous avons pu identifier ces souches, à l'aide de la galerie biochimique classique, et à l'aide de galeries miniaturisées. Dans un troisième temps, nous avons étudié la formation de biofilms, par ces souches, en utilisant différentes méthodes, TCP, TM, RCA, visualisation microscopique, ainsi que la détermination de l'hydrophobicité des souches étudiées, et les résultats obtenus sont consignés dans la partie « Résultats et Discussion ».

Notre étude statistique sur 10 patients, dont 7 hommes et 3 femmes, pour un total de 10 plaies. La population concernée par le pied diabétique, concerne la tranche d'âge [60-70] ans. La majorité de nos patients, sont de sexe masculin, soit 70% hommes, contre 30 % de femmes, et les patients ayant un diabète de type 2 représentaient 6 hommes soit 60% contre 3 femmes, soit 30%.

À l'aide d'une galerie classique biochimique et les galeries miniaturisées nous avons pu réaliser l'identification des souches isolées. La famille la plus dominante est celle des *Corynebacteriaceae* avec un taux de 26,08 %, dont *Corynebacterium pyogenes*, *Corynebacterium ulcerans*, et *Cellulomonas spp.* La seconde famille, est celle des *Staphylococcaceae*, avec un taux de 21,73 %, représentée par *Staphylococcus aureus* et les *Staphylocoques* à coagulase négative (SCN). La troisième famille est celle des *Enterobacteriaceae*, avec un taux de 21,73 %, représentée par *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella choleraesuis*, et *Raoultella ornithinolytica*. La quatrième famille est celle des *Pseudomonadaceae*, avec un taux de 8,68 %, représentée par les souches, *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas maltophilia*. La cinquième famille est celle des *Streptococcaceae*, avec un taux de 4,34 %, représentée par *Streptococcus acidominimus*. La sixième famille est celle des *Aerococcaceae* (Ordre des Lactobacilles), avec un taux de 4,34%, représentée par *Aerococcus viridans*. Et les autres bacilles à Gram positif, avec un taux de 13,02 %, nous avons pu isoler six familles bactériennes différentes avec des physiopathologies différentes, ce qui indique que la nature microbienne des plaies du pied diabétique est polymicrobienne.

Pour connaître l'implication de ces souches dans la formation du biofilm on a utilisé les méthodes RCA, TCP, TM, visualisation sous microscope, détermination de l'hydrophobicité des souches. La mise en évidence de la production de slime par les 23 souches sur milieu RCA a révélé que 91,30 % des souches testées sont productrices de slime. La méthode TCP a révélé 65,21 % d'isolats positifs, 34,78% des souches ayant présenté un pouvoir d'adhésion visible et fort sur microplaques, 30,43% des souches ont présenté un pouvoir d'adhésion modéré. Pour le reste des souches (26%), l'adhésion sur microplaque a été à peine visible donc c'est des bactéries non productrices de biofilm. Les résultats de la technique TM sont différents à ceux obtenus par la méthode TCP, il est possible de constater que les souches ayant une densité optique $DO > 1.5$ sont de 39,13 % et ont un fort potentiel d'adhésion cellulaire sur un support en verre. La recherche de l'adhésion après 3h a révélé que sur 23 souches isolées, soit 73,91 % des bactéries ont pu être observées sous microscope par rapport à 26,08% des souches avec une adhésion faible ou absente. 91,30% des souches ont pu être observées sous microscope après 24h d'incubation, et parfois, avec une production de slime microbiens.

Pour la détermination de l'hydrophobicité des souches. La totalité des souches, à l'exception de *Raoultella ornithinolytica*, ont présenté un pourcentage plus ou moins élevé, d'hydrophobicité, donc d'adhésion au solvant, et plus à même de former des biofilms.

L'analyse des résultats obtenus, a montré que la formation de biofilms, est prédominée par des biofilms poly bactériens

Conclusion

Les biofilms semblent faciliter la survie des bactéries pathogènes, dans l'environnement et chez leurs hôtes, car les bactéries formatrices de biofilms, ont des caractéristiques différentes des bactéries planctoniques.

Les biofilms rencontrés dans les plaies chroniques, tel que les infections du pied diabétique, sont hautement polymicrobiennes, ce qui améliore donc leurs interactions bactériennes.

De nombreux travaux sont effectués sur l'identification de la population bactérienne impliquée dans l'infection du pied diabétique, mais les approches disponibles reliant les biofilms aux infections du pied diabétique, sont assez limitées, et de nouvelles méthodes de prévention, de diagnostic et de traitement, sont indispensables, notamment, en raison de l'étendue des bactéries dans cette pathologie.

Devant une écologie bactérienne polymicrobienne, et devant la nature de ces bactéries à former un biofilm, , la collaboration entre biologistes, médecins et chirurgiens, est primordiale, pour améliorer l'évaluation du risque « podologique », et pour une meilleure prise en charge des infections du pied chez les diabétiques, étant donné que ces infections restent une complication silencieuse du diabète, et constitue la cause la plus fréquente des amputations chez les patients diabétiques.

Les méthodes utilisées dans notre travail, afin de déterminer la capacité des isolats étudiés, à former un biofilm, ont permis d'avoir des résultats qualitatifs et quantitatifs satisfaisants. Ces approches ont un potentiel intéressant, mais des études complémentaires perfectionnées, sont nécessaires pour comprendre le mécanisme d'action de chacune des souches formatrices de biofilms, et dans les solutions de la gestion des infections du pied diabétique.

1. **Costerton, J. W.** Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. (1999).
2. **Anne Doléans-Jordheïim ; Jean Freney** : Flore microbienne de la peau saine. (2007).
3. **Catherine Campanac ; Jean-Claude Block ; Mathieu Bergé ; Christine Roque** : Biofilm bactérien. (2006).
4. **Yvonne Brun ; Michèle Bes ; François Vandenesch** : Staphylococcus .(2007).
5. **David Lebeaux ; Jean-Marc Ghigo** : Infections associées aux biofilms Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale , Institut Pasteur, Unité de Génétique des Biofilms, Département de Microbiologie, m/s n° 8-9, vol. 28. (2012)
6. **Sharad P. Pendsey**: Understanding diabetic foot. Int J Diabetes Dev Ctries. 30(2): 75–79. Diabetes Clinic & Research Center. (2010).
7. **J.-L. Besse ; T. Leemrijse ; P. Deleu** : Diabetic foot : The orthopedic surgery angle. 10.1016. Université de Lyon, Lyon, France ; service de chirurgie orthopédique, centre hospitalier Lyon-Sud.(2011).
8. **Francolini, I ; Donelli G** : Prevention and control of biofilm-based medical device related infections. FEMS Immunol Med Microbiol 59, 227-238 .(2010).
9. **Heather M. Murphy-Lavoie; Adam Ramsey; Minhthao Nguyen; Shikha Singh** : Diabetic Foot Infections. StatPearls Publishing LLC. PMID: 28722943. (2021).
10. **Ilker Uçkay ; Javier Aragón-Sánchez ; Daniel Lew ; Benjamin A. Lipsky** : Diabetic foot infections: what have we learned in the last 30 years?. International Journal of Infectious Diseases. Volume 40, Pages 81-91. (November 2015)
11. **John P. Mills ; Payal Patel** : Diabetic Foot Infections. Michigan medicine, university of Michigan. (2019)
12. **KARA TERKI Ibtissem** : Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat. (2014).
13. **KADIK Razika ; ABED Meriam 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 .(2019).
14. **ELAOUEDJ Asma** : Evaluation de la diversité microbienne de la peau lésée chez les diabétiques .(2017)
15. **O'Toole G ; Kaplan HB ; Kolter R** : Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol, 54: 49- 79. (2000).
16. **Yannick D.N ; Tremblay ; Skander Hathroubi ; et Mario Jacques** : Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. PMC journals. (2016).
17. **Rania M; Abdel Halim; Nevine N; Kassem; Basma S. Mahmoud**: Detection of Biofilm Producing Staphylococci among Different Clinical Isolates and Its Relation to Methicillin Susceptibility. PMC journals. (2018).

Références bibliographiques

18. **T Mathur; S Singhal ; S Khan; DJ Upadhyay; T Fatma; A Rattan** : Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*. (2006).
19. **Agnès ROUX ; Jean-Marc GHIGO** : Les biofilms bactériens. Groupe de Génétique des Biofilms, Institut Pasteur. (2006).
20. **Ann Zmuda**: Understanding The Impact Of Biofilm In The Diabetic Foot. (2019).
21. **Cassandra Pouget; Catherine Dunyach-Remy; Alix Pantel; Sophie Schuldiner; Albert Sotto;and Jean-Philippe Lavigne**: Biofilms in Diabetic Foot Ulcers: Significance and Clinical Relevance. *PMC journals*. (2020)
22. **Ruke MG; Savai J**. Diabetic Foot Infection, Biofilm & New Management Strategy. *Asploro Journal of Biomedical and Clinical Case Reports*. (2019).
23. **Camille Delarras** :Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition Lavoisier. (2007).
24. **Mendes JJ; Neves J**:Diabetic Foot Infections: Current Diagnosis and Treatment. *The Journal of Diabetic Foot Complications*. (2012).
25. **Gibbons GW; Marcaccio EJ; Habershaw GM**:Management of diabetic foot. In: Callow AD, Ernst CB, eds. *Vascular surgery: theory and practice*. Connecticut: Appleton and Lange. (1995).
26. **Terashi H ; Kitano I ; Tsuji Y**: Total management of diabetic foot ulcerations–Kobe classification as a new classification of diabetic foot wounds. *Keio J Med*. (2011)
27. **Boulton AJM ; Armstrong DG ; Kirsner RS ; Attinger CE ; Lavery LA ; Lipsky BA ; Mills JL Sr ; Steinberg JS** .Diagnosis and Management of Diabetic Foot Complications. Arlington (VA): American Diabetes Association. (2018).
28. **Lavery L A ; Fontaine JL ; Bhavan K ; Kim P J ; Williams** : Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in diabetic foot infections. *Diabetic Foot & Ankle*, 5(1), 23575. (2014).
29. **Bandyk D F** ; The Diabetic Foot. *Seminars in Vascular Surgery*. (2019).
30. **Shakil S ; Khan A U** ; Infected foot ulcers in male and female diabetic patients : a clinico-bioinformative study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9(1), 2. (2010).
31. **Patil S ; Mane R** : Profil bactérien et clinique de l'ulcère du pied diabétique à l'aide de techniques de culture optimales. *Journal international de recherche en sciences médicales*.(2017)
32. **Pugazhendhi S ; Dorairaj A P** : Appraisal of Biofilm Formation in Diabetic Foot Infections by Comparing Phenotypic Methods With the Ultrastructural Analysis. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*. (2018).
33. **Sugandhi, P ; Arvind Prasanth** : D. Microbiological profile of bacterial pathogens from diabetic foot infections in tertiary care hospitals, Salem. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 8(3), 129–132. (2014).

34. **Asma Alhubail ;May Sewify ;Grace Messenger ; Richard Masoetsa ; Imtiaz Hussain ; Shinu Nair ; Ali Tiss** : Microbiological profile of diabetic foot ulcers in Kuwait(2020)
35. **Mottola C ; Mendes J ; Cristino J M ; Cavaco-Silva P ; Tavares L ; Oliveira** : Polymicrobial biofilms by diabetic foot clinical isolates. *Folia Microbiologica*. (2015).
36. **Hunt I A**. Foot Infections in Diabetes are Rarely Due to a Single Microorganism. *Diabetic Medicine*, 9(8), 749–752. (1992).
37. **Abdulrazak A ; Bitar ZI ; Al-Shamali AA ; Mobasher LA**: Bacteriological study of diabetic foot infections. *J Diabetes Complications* (2005)
38. **Citron DM ; Goldstein EJ ; Merriam CV ; Lipsky BA ; Abramson MA**: Bacteriology of moderate-to-severe diabetic foot infections and in vitro activity of antimicrobial agents. *J Clin Microbiol* .(2007).
39. **Al Benwan K ; Al Mulla A ; Rotimi V**: A study of the microbiology of diabetic foot infections in a teaching hospital in Kuwait. *J Infect Public Health*. (2012).
40. **Lipsky BA ; Itani K ; Norden C** :Linezolid Diabetic Foot Infections Study G.Treating foot infections in diabetic patients: a randomized, multicenter, open-label trial of linezolid versus ampicillin sulbactam/amoxicillin-clavulanate. *Clin Infect Dis* 2004, 38:17–24.(2004)
41. **Shankar EM ; Mohan V ; Premalatha G ; Srinivasan RS ; Usha AR**: Bacterial etiology of diabetic foot infections in South India. *Eur J Intern Med*, 16:567–570. (2005).
42. **Heather M ; Adam Ramsey ; Minhthao Nguyen ; Shikha Singh** : Diabetic Foot Infections. (2021).
43. **Boulton A ; Vileikyte L ; Ragnarson-Tennvall G ; Apelqvist J** : The global burden of diabetic foot disease. *Lancet* 366, 1719–1724. (2005).
44. **Singh N., Armstrong D. G. & Lipsky B. A**. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA* 293, 217–228. (2005).
45. **Ertugrul BM ; Lipsky BA ; Ture M ; Sakarya S**: Risk Factors for Infection with *Pseudomonas aeruginosa* in Diabetic Foot Infections. *J Am Podiatr Med Assoc* .(2017).
46. **Altrichter Loan C ; Legout L ; Assal M ; Rohner P ; Hoffmeyer P ; Bernard L** : Infections sévères à *Streptococcus agalactiae* du pied diabétique. *La Presse Médicale*, 34(7), 491–494. (2005).
47. **Lavery LA ; Armstrong DG ; Murdoch DP ; Peters EJ ; Lipsky BA** : Validation du système de classification des infections du pied diabétique de l'Infectious Diseases Society of America . *Clin Infect Dis* ; 44: 562 - 5 . (2007).
48. **Lipsky BA ; Berendt AR ; Deery HG ; Embil JM ; Joseph WS ; Karchmer AW ;** : Diagnostic et traitement des infections du pied diabétique . *Clin Infect Dis*. 39 : 885 – 910. (2004).
49. **Palumbo PJ** : Maladie vasculaire périphérique et diabète. *Diabète en Amérique*. (1985)
50. **Adler AI ; Boyko EJ ; Ahroni JH ; Smith DG** : Amputation des membres inférieurs dans le diabète. Les effets indépendants de la maladie vasculaire périphérique, de la neuropathie sensorielle et des ulcères du pied. *Soins du diabète* 22 : 1029-1035. (1999).
51. **Pecoraro RE ; Ahroni JH ; Boyko EJ ; Stensel VL** : Chronologie et déterminants de la réparation tissulaire dans les ulcères diabétiques des membres inférieurs. *Diabète* 40 : 1305-1133. (1991).

Références bibliographiques

52. **Margaret chan** : rapport mondial sur le diabète. Centre national d'information sur le diabète. Statistiques nationales sur le diabète. (Janvier 2005).
53. **MMWR** : Histoire de l'ulcère du pied chez les personnes atteintes de diabète-États-Unis, 2000-2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 52 : 1098–1102. (2003)
54. **Bowling F ; Dissanayake ; Jude E** : Opportunistic pathogens in diabetic foot lesions. Curr Diabetes Rev 8, 195–199.(2012).
55. **Garrett T ; Bhakoo M ; Zhang Z** : Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. Progress in Natural Science 18, 1049–1056 .(2008).
56. **Ismail K ; Winkley K ; Stahl D ; Chalder T ; Edmonds M** :Une étude de cohorte de personnes atteintes de diabète et de leur premier ulcère du pied : le rôle de la dépression sur la mortalité. Soins du diabète 30 : 1473-1479. (2007).
57. **Citron DM ;Goldstein EJ ; Merriam CV ; Lipsky BA ; Abramson MA**: Bacteriology of moderate-to-severe diabetic foot infections and in vitro activity of antimicrobial agents. J Clin Microbiol .(2007).
58. **Al Benwan K ; Al Mulla A ; Rotimi VO**: A study of the microbiology of diabetic foot infections in a teaching hospital in Kuwait. J Infect Public Health .(2012).
59. **Huang Y. et al** : A Comparison of Tissue versus Swab Culturing of Infected Diabetic Foot Wounds. International Journal of Endocrinology 2016, 1–6. (2016).
60. **Gardiner M et al** :A longitudinal study of the diabetic skin and wound microbiome. PeerJ 5, e3543. (2017).
61. **Banu A ; Noorul Hassan M ; Rajkumar J ; Srinivasa S** :Spectrum of bacteria associated with diabetic foot ulcer and biofilm formation: A prospective study. Australas Med J 8, 280–285. (2015).
62. **Gardner S ; Hillis S ; Heilmann K ;Segre J ; Grice E** : The neuropathic diabetic foot ulcer microbiome is associated with clinical factors. Diabetes 62, 923–930. (2013).
63. Internal Clinical Guidelines team : Diabetic Foot Problems: Prevention and Management. (2015).
64. Centre for Clinical Practice at NICE (UK). Diabetic Foot Problems: Inpatient Management of Diabetic Foot Problems. (2011).
65. **Anne Doléans Jordheim ; Jean FRENEY** : Flore microbienne de la peau saine ,Bactériologie clinique 2ème édition . P 431, 438
66. **Christian Campanac ;Jean Claude Block ; Mathieu Berge ; Christian Roques ; ESKA** : Précis de Bactériologie Clinique. (2006)
67. **David Lebeaux ;Jean Marc GHIGO** :Infections associées aux biofilms. (2012).
68. **François Dim ; Marie cécile Ploy ; Christian Martin ; Vincent Cattoir** : Infections cutanées »/ liste des germes identifiés dans les plaies du pied diabétique/Classification PEDIS.
69. **Michèle Bis ; François Vandenesch ; Yvonne Brun** :Précis de Bactériologie Clinique. 795- 827.
70. **Sonia Mion ; Benjamin Remy ; Laure Plener ; Eric Chabrière ; David Daudé** : Médecine Sciences (2019) .

Références bibliographiques

71. **Roux A ; Ghigo J M** : Les biofilms bactériens présentés par communication. Bull. Acad. Vét. France . 261-268. (2006).
72. **Costerton JW** : short history of the development of the biofilm concept. Methods of studying biofilms. Ghannoum M & O'Toole GA Editors. Microbial biofilms, ASM Press, Washington, p 4-19. (2004)
73. **Oskar Wanner O ; Martina Bauchrowitz** :Les biofilms sont omniprésents .(2006).
74. **Donlan RODNEY M** :Biofilm elimination on intravascular catheters: important considerations for the infectious disease practitioner. Clin Infect Dis 52, 1038-1045. (2011).
75. **Daddi Oubekka S** :Dynamique réactionnelle d'antibiotique au sein des biofilms de staphylococcus aureus Apport de la microscopie multimodale. Thèse pour obtenir le grade docteur délivré par L'université Paris Sud XI Spécialité : Microbiologie .p 46. (2012).
76. **Donlan RM** : Biofilms: Microbial life on surface. Emerg. Infect. Dis. 8 (9), 881- 890. (2002)
77. **Amsey SD ; Newton K ;Blough D ;McCulloch DK ;Sandhu N** : Estimations au niveau des patients du coût des complications du diabète dans une population de soins gérés. Pharmacoeconomie 16 : 285-295. (1999).
78. **Christophe Cartier** :Comment prévenir la colonisation d'implants par des pathogène .Centre national de la recherche scientifique CNRS. (2013).
79. **Bjarnsholt T ; Kirketerp-Moller K ; Jensen PO ; Madsen KG ; Phipps R** : Pourquoi les plaies chroniques ne guérissent pas : une nouvelle hypothèse. Régénération de réparation des plaies 16 : 2-10. (2008).
80. **Omar A ; Wright J ; Schultz G ; Burrell R ; Nadworny P** : Microbial Biofilms and Chronic Wounds. Microorganisms 2017, Vol. 5, Page 9 5, 9 .(2017).
81. **James GA ; Swogger E ; Wolcott R ; Pulcini ED ;Secor P** : Biofilms dans les plaies chroniques. Régénération de la réparation des plaies 16 : 37-44. (2008).
82. **Characklis WG** : Biofilm process. In Biofilms Edited by Characklis W G & Marshall K C. New York: Wiley pp. 195–231. (1990).
83. **Ghigo J M** : Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? Research in Microbiology 154(1), 1-8. (2003).
84. **Dalton T et al** : An in vivo polymicrobial biofilm wound infection model to study interspecies interactions. (2011).
85. **Mendes JJ ; Marques Costa A ; Vilela C ; Neves J ; Candeias N ; Cavaco-Silva ;** : Clinical and bacteriological survey of diabetic foot infections in Lisbon. Diabetes Res Clin Pract .(2012).
86. **Wolcott RD ; Rhoads DD** :Une étude de la gestion des plaies basée sur le biofilm chez des sujets atteints d'ischémie critique des membres. J Soins des plaies 17 : 145-2, 154. (2008).
87. **Wolcott RD ; Ehrlich GD** : Biofilms et infections chroniques. JAMA 299 : 2682-2684.(2008).
88. **Dowd SE ; Sun Y ; Secor PR ; Rhoads DD ; Wolcott BM** :Enquête sur la diversité bactérienne dans les plaies chroniques à l'aide du pyroséquençage, de la DGGE et du séquençage complet des ribosomes. BMC Microbiol 8 : 43. (2008).

Références bibliographiques

89. **Saseedharan S ;Sahu M ;Chaddha R ;Pathrose E** : Epidemiology of diabetic foot infections in a reference tertiary hospital in India. *Braz J Microbiol*, 49:401–406. pmid:29157899.(2018).
90. **Davis SC ; Martinez L ; Kirsner R** : Le pied diabétique : l'importance des biofilms et de la préparation du lit de la plaie. *Curr Diab Rep* 6 : 439-445. (2006).
91. **Hartemann Heurtier A ; Senneville E** : Ostéomyélite du pied diabétique. *Diabète Métab.* (2008).
92. **Tiwari S ; Pratyush DD ; Dwivedi A ; Gupta SK ; Rai M ; Singh SK**: Microbiological and clinical characteristics of diabetic foot infections in northern India. *J Infect Dev Ctries*, 6:329–332.(2012).
93. **Wheat LJ ; Allen SD ; Henry M ; Kernek CB ; Siders JA** : Infections du pied diabétique. Analyse bactériologique. *Arch Intern Med* 146 : 1935-1940.(1986).
94. **Ceilley RI** : Ulcération du pied et ostéomyélite vertébrale à *Corynebacterium haemolyticum*. *Arch Dermatol* 113 : 646-647. : (1977).
95. **Huang Y ;Cao Y ;Zou M ; Luo X ; Jiang Y ; Xue Y ; et al**: A Comparison of Tissue versus Swab Culturing of Infected Diabetic Foot Wounds. *Int J Endocrinol* .(2016).
96. **Gardiner M ; Vicaretti M ;Sparks J ;Bansal S ; Bush S ; Liu M** : A longitudinal study of the diabetic skin and wound microbiome. *PeerJ*. (2017).
97. **Barwell N** : Diabetic foot infection: Antibiotic therapy and good practice recommendations.
98. **Bessman AN ; Geiger PJ ;Canawati H** : Prévalence des corynebactéries dans les infections du pied diabétique. *Soins du diabète* 15 : 1531-1533. (1992)
99. **Gauland C** : Managing lower-extremity osteomyelitis locally with surgical debridement and synthetic calcium sulfate antibiotic tablets. *Adv Skin Wound Care* 24, 515–523 (2011).
100. **Urbancic-Rovan V ; Gubina M** : Bactéries dans les ulcères superficiels du pied diabétique. *Diabet Med* 17 : 814-815. (2000)
101. **Bowler PG ; Davies BJ ; Jones S** : Implication microbienne dans la mauvaise odeur des plaies chroniques. *J Soins des plaies* 8 : 216-218. (1999)
102. **Howell-Jones RS; Wilson MJ; Hill KE Howard AJ;Price PE**: Une revue de la microbiologie, de l'utilisation des antibiotiques et de la résistance dans les plaies cutanées chroniques. *J Antimicrob Chemother* 55 : 143-149. (2005).
103. **Morley R ; Lopez F ; Webb F** :Calcium sulphate as a drug delivery system in a deep diabetic foot infection. *Foot* . (2015).
104. **Bowler PG ; Duerden BI ;Armstrong DG** : Microbiologie des plaies et approches associées à la gestion des plaies. *Clin Microbiol Rev* 14 : 244-269. (2001).
105. **Bianca L ; Robert Morley ; Frank L ; Bowling Andrew M ; Lovering,Curtis B ; Dobson** : Susceptibility of monomicrobial or polymicrobial biofilms derived from infected diabetic foot ulcers to topical or systemic antibiotics in vitro.(2021).

ANNEXES

Annexe n°1 : milieu BHIB.

| | |
|-----------------------------------|------------|
| Protéose-peptone..... | 10,0 (g/L) |
| Infusion de cervelle de veau..... | 12,5 (g/L) |
| Infusion de cœur de bœuf..... | 5,0 (g/L) |
| Glucose..... | 2,0 (g/L) |
| Chlorure de sodium..... | 5,0 (g/L) |
| Hydrogénophosphate de sodium..... | 2,5 (g/L) |
| pH = 7,4 | |

Annexe n°2 : milieu MRS.

| | |
|---|------------|
| Peptone..... | 10,0 (g/L) |
| Extrait de viande..... | 8,0 (g/L) |
| Extrait de levure..... | 4,0 (g/L) |
| Glucose..... | 20,0 (g/L) |
| Acétate de sodium trihydraté..... | 5,0 (g/L) |
| Citrate d'ammonium..... | 2,0 (g/L) |
| Tween 80..... | 1,0 ml |
| Hydrogénophosphate de potassium..... | 2,0 (g/L) |
| Sulfate de magnésium heptahydraté | 0,2 (g/L) |
| Sulfate de manganèse tétrahydraté | 0,05 (g/L) |
| Agar..... | 10,0 (g/L) |
| pH = 6,2 | |

Annexe n°3 : milieu M17.

| | |
|--------------------------------------|------------|
| Tryptone..... | 2,5 (g/L) |
| Peptone papaïnique de soja..... | 5,0 (g/L) |
| Peptone pepsique de viande..... | 2,5 (g/L) |
| Extrait de viande..... | 5,0 (g/L) |
| Extrait autolytique de levure..... | 2,5 (g/L) |
| Béta-Glycérophosphate de sodium..... | 19,0 (g/L) |
| Sulfate de magnésium..... | 0,25 (g/L) |

Annexes

| | |
|--------------------------------|------------|
| Lactose..... | 5,0 (g/L) |
| Acide ascorbique | 0,5 (g/L) |
| Agar-agar bactériologique..... | 15,0 (g/L) |
| pH à 25 °C : 7,1 ± 0,2 | |

Annexe n°4 : milieu Chapman.

| | |
|---|-----------|
| Peptone..... | 10 (g/L) |
| Extrait de bœuf..... | 1 (g/L) |
| Chlorure de sodium..... | 75 (g/L) |
| D-mannitol..... | 10 (g/L) |
| Rouge de phénol..... | 25 (mg/L) |
| Agar..... | 15 (g/L) |
| Ajuster le pH à 7,4 ± 0,2 à 25°C (après autoclavage). | |

Annexe n°5 : milieu Mac Conkey.

| | |
|---|------------|
| Peptone pancréatique de gélatine..... | 17 (g/L) |
| Peptone pancréatique de caséine..... | 1,5 (g/L) |
| Peptone peptique de viande..... | 1,5 (g/L) |
| Lactose..... | 10 (g/L) |
| Chlorure de sodium..... | 5 (g/L) |
| Sels biliaires..... | 1,5 (g/L) |
| Rouge neutre..... | 30 (mg/L) |
| Violet de gentiane..... | 1 (mg/L) |
| Agar..... | 13,5 (g/L) |
| Ajuster le pH à 7,1 ± 0,2 à 25°C (après autoclavage). | |

Annexe n°6 : milieu gélose au sang frais.

Gélose Columbia + 5% de sang frais.

Composition de la gélose Columbia :

| | |
|--------------------------|------------|
| Mélange de peptones..... | 18,0 (g/L) |
| Extrait de levure..... | 5,0 (g/L) |
| Amidon de maïs..... | 1,0 (g/L) |
| Chlorure de sodium..... | 5,0 (g/L) |
| Agar..... | 10,0 (g/L) |
| pH = 7,3 | |

Annexes

Annexe n°7 : milieu RCA.

BHIB37 (g/L)

Saccharose.....50 (g/L)

Agar agar.....10 (g/L)

Rouge Congo.....0,8 (g/L)

pH= 7,4

Annexe n°8 : tampon PBS.

NaCl.....8,0 (g/L)

KCl.....0,2 (g/L)

Na₂HPO₄.....1,42 (g/L)

KH₂PO₄.....0,24 (g/L)

Annexe n°9 : cristal violet (1%).

Cristal violet.....1 g

Eau distillée.....100 mL

Annexe n°10 : milieu Mannitol Mobilité.

Peptone de caséine.....10 (g/L)

Mannitol.....7,50 (g/L)

Nitrate de potassium.....1 (g/L)

Rouge de phénol0,04 (g/L)

Agar.....3,50 (g/L)

pH final à 25°C : 7,6 ± 0,2

Annexe n°11 : milieu VF.

Base viande foie.....30,0 (g/L)

Glucose.....2,0 (g/L)

Agar.....6,0 (g/L)

pH = 7,4

Annexe n°12 : milieu TSI.

| | |
|-------------------------------------|-------------|
| Extrait autolytique de levure | 3,0 (g/L) |
| Extrait de viande | 3,0 (g/L) |
| Peptone | 20,0 (g/L) |
| Chlorure de sodium | 5,0 (g/L) |
| Lactose | 10,0 (g/L) |
| Saccharose | 10,0 (g/L) |
| Glucose | 1,0 (g/L) |
| Thiosulfate de sodium | 0,3 (g/L) |
| Citrate de fer (III) | 0,3 (g/L) |
| Rouge de phénol | 24,0 (mg/L) |
| Agar agar bactériologique | 9,0 (g/L) |

Annexe n°13 : milieu Kligler et Hajna.

| | |
|----------------------------------|-----------|
| Peptone | 15 (g/L) |
| Extrait de viande | 3 (g/L) |
| Extrait de levure | 3 (g/L) |
| Peptone pepsique de viande | 5 (g/L) |
| Glucose | 1 (g/L) |
| Lactose | 10 (g/L) |
| Rouge de phénol | 25 (mg/L) |
| Chlorure de sodium | 5 (g/L) |
| Sulfate ferreux | 0,2 (g/L) |
| Thiosulfate de sodium | 0,3 (g/L) |
| Agar-agar | 11 (g/L) |

Annexe n°14 : milieu citrate de Simmons.

Citrate de sodium.....1,0 (g/L)

Bleu de bromothymol0,08 (g/L)

Chlorure de sodium.....5,0 (g/L)

Sulfate de magnésium.....0,2 (g/L)

Hydrogénophosphate de potassium.....1,0 (g/L)

Dihydrogénophosphate d'ammonium.....1,0 (g/L)

Agar-agar.....15,0 (g/L)

pH : 6,9

Annexe n°15 : vert de malachite.

Vert de malachite.....0,5 g

Eau distillée.....100ml