

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Moléculaire Des Microorganismes

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

**Identification de *Clostridioides difficile* au laboratoire ;
étude rétrospective**

Présenté par : BENABID Fehd
BENNINI Ikram

Le 24/06/2023

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : **SAKHRI ARAFA Nedjoua** (MCA - UFM, Constantine 1).

Encadreur : **BOUCHERIH Djahida** (Pharmacienne Microbiologiste - IPA, Alger).

Co-encadreur : **RIAH Nassira** (MCA - UFM, Constantine 1).

Examinatrice : **BOUCHELOUKH Warda** (MCB - UFM, Constantine 1).

**Année universitaire
2022 - 2023**

Remerciements

Aujourd'hui, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de notre mémoire de fin d'étude. C'est avec une immense joie que nous prenons la plume pour vous adresser nos sincères remerciements.

Tout d'abord, nous souhaitons remercier ALLAH le tout puissant, qui nous a donné la force et le courage nécessaires pour surmonter les obstacles et atteindre nos objectifs. Sa guidance constante a été notre lumière dans les moments de doute et d'incertitude.

À nos chers parents, nous vous devons une dette d'amour et de reconnaissance éternelle. Votre soutien indéfectible, votre encouragement précieux et vos sacrifices sans fin nous ont permis d'atteindre cette étape importante de notre vie. Votre amour incommensurable a été notre source de motivation et de détermination. Merci du fond du cœur pour votre confiance et votre soutien inébranlable.

Nous aimerions également exprimer notre profonde gratitude au professeur Tali-Maamar Hassiba, chef du laboratoire de Bactériologie Médicale et de Surveillance de la Résistance aux Antibiotiques de l'Institut Pasteur d'Alger. Merci de nous avoir accordé votre confiance pour la réalisation de ce modeste travail.

Nous voulons également adresser nos remerciements les plus chaleureux à notre encadrante, le docteur Boucherih Djahida, Pharmacienne Micorbiologiste, Chargée de recherche au laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme de l'Institut Pasteur d'Alger. Votre patience, votre écoute attentive et vos conseils éclairés ont été d'une valeur inestimable pour notre travail. Votre expertise scientifique et votre engagement envers notre réussite nous ont grandement inspirés. Un grand merci à monsieur Laichouchi et madame Betatache, pour votre patience votre soutien constant et votre dévouement nous vous sommes infiniment reconnaissants.

Nous saisissons également cette occasion pour exprimer notre profonde gratitude à nos membres du jury : le docteur Sakhri Arafa Nedjoua, le docteur Boucheloukh Warda et le docteur Riah Nassira. Votre évaluation minutieuse de notre travail et votre expertise académique nous ont permis de progresser. Nous vous remercions sincèrement pour le temps que vous nous avez accordé, votre engagement et votre contribution à notre réussite.

Enfin, nous souhaitons remercier tous nos enseignants, nos camarades de classe et toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire de fin d'étude. Votre appui, vos connaissances partagées, vos discussions fructueuses et votre encouragement ont été des éléments cruciaux dans notre parcours académique. Votre soutien valeureux et vos précieux conseils ont façonné notre apprentissage et ont contribué à faire de nous les personnes que nous sommes aujourd'hui.

Dédicace

À mes chers parents, mon frère Fares et ma sœur Kawthar, Le moment est venu de tourner une page importante de ma vie, celle de la fin de mes études. Et aujourd'hui, je souhaite vous dédier ce mémoire en signe de gratitude et d'amour infini. Vous avez été mes piliers, ma source d'inspiration et de soutien précieux tout au long de ce parcours académique.

Cher grand-père Babi, Bien que tu ne sois plus physiquement parmi nous, ton esprit et ton amour continuent d'illuminer nos vies. Tu as été un modèle paternel exceptionnel, un guide précieux et une source infinie de sagesse. Je dédie ce mémoire à ta mémoire, car c'est grâce à toi que j'ai appris l'importance du travail acharné, de la persévérance et de l'intégrité. Tu as été un exemple inspirant de détermination et de bienveillance, et ton héritage perdure à travers toutes mes réalisations. Bien que ton absence soit profondément ressentie, je sais que tu es là, veillant sur nous avec un amour inconditionnel. Ta présence continue de guider mes pas, et je suis fier de porter en moi tes valeurs profondes.

Chère Mami, tes mots bienveillants et tes encouragements ont été une source de motivation inépuisable. Tu as toujours cru en moi et en mes capacités, et c'est grâce à toi que j'ai puisé la force nécessaire pour avancer.

À mes tantes Katy et Khwila, vous avez été des figures maternelles qui m'ont entouré de votre affection et de votre soutien précieux. Vos conseils éclairés et votre présence réconfortante ont été d'une importance capitale dans mon cheminement.

À mes chers cousins Ghoulam et Djaouad, notre complicité indéfectible a été un soutien indéniable. Vos encouragements constants et votre présence à mes côtés m'ont donné la force de persévérer dans les moments les plus difficiles.

À mon ami Abderrahim, je ne saurais exprimer ma gratitude pour ton aide précieuse tout au long de ce projet. Tes connaissances, ton expertise et ta générosité ont été des atouts majeurs dans la réalisation de ce mémoire. Tu as été un pilier sur lequel je me suis appuyé, et je t'en suis éternellement reconnaissant.

Je souhaite dédier cette réussite au Dr. Mokrani, ce médecin chirurgien en France qui a apporté son aide précieuse. Votre expertise et votre dévouement ont joué un rôle déterminant dans ma recherche. Votre engagement envers l'avancement médical est une inspiration et je suis honoré d'avoir pu bénéficier de votre soutien.

Féha

Dédicace

Ce modeste travail ne reflètera jamais votre valeur ni les paroles que je vais prononcer.

À mes chers parents aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont il ne cesse de me donner, leur présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les grands obstacles, leur éducation digne et leur profond amour ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

À mon cher frère le seul le tout le support le supporteur le sauveur.

À mon conjoint pour son grand soutien et son précieux accompagnement tout au long de la préparation de ce mémoire.

À mes beaux-parents belle-sœur et beau-frère qui m'ont chaleureusement encouragé.

À mes grands-parents et ma très chère famille précisément mon aimable cousine, ma tante et mon oncle qui n'ont pas cessé de me conseiller et de me motiver.

À tous mes amis qui ont partagé avec moi tous les moments de joie et d'émotions tout le long de ce cycle, sans oublier mon binôme pour son entraide, sa coordination, sa patience et sa compréhension tout au long de notre parcours.

Skram

Résumé

Ce travail a pour objectif d'explorer les méthodes et les techniques d'isolement et d'identification de la bactérie *Clostridioides difficile* à partir d'échantillons suspects de selles diarrhéiques, caractériser la sensibilité de cette bactérie aux antibiotiques en utilisant l'antibiogramme par diffusion et la CMI par E-test, ainsi qu'à détecter les toxines A et B par PCR classique et duplex pour confirmer sa pathogénicité.

C. difficile se manifeste par des colonies non hémolytiques de couleur grise, présentant une forme ronde et plate avec un bord irrégulier, une apparence granuleuse, une légère dépression au centre, une surface lisse et une odeur caractéristique de crottin de cheval. L'observation des frottis après coloration au bleu de méthylène et coloration de Gram a révélé la présence de bactéries à Gram positif prenant la forme de bâtonnets avec des extrémités légèrement pointues. Des spores subterminales peu déformantes étaient également présentes.

Les tests d'identification biochimique, réalisés à l'aide du logiciel d'identification microbienne en ligne pour la galerie Rapid® ID 32 A et du répertoire analytique pour la galerie API® 20 A, ont confirmé de manière incontestable la présence de *C. difficile*, avec des pourcentages d'identification de 90,5 % et 99,9 % respectivement.

Les tests d'identification par PCR classique et duplex ont montré l'apparition de deux bandes correspondant aux gènes *tcdA* et *tcdB*, avec des tailles de 358 pb et 440 pb respectivement. Ces résultats ont confirmé le caractère toxigène de *C. difficile* et son implication dans l'infection.

L'étude de sensibilité aux antibiotiques, réalisée par l'antibiogramme standard et E-test, a révélé une résistance naturelle de *C. difficile* vis-à-vis à l'ampicilline/amoxicilline, à l'imipénème et à la *kanamycine*, confirmant ainsi le diagnostic. Une résistance acquise vis-à-vis au sulfaméthoxazole a également été observée, tandis que le reste des antibiotiques testés s'est révélé efficace (sensible).

Enfin, une étude rétrospective multicentrique sur une période de cinq ans (2018-2023) a été menée pour analyser les infections à *C. difficile* dans la région nord de l'Algérie au laboratoire des "Bactéries Anaérobies et du Botulisme" de l'Institut Pasteur d'Alger. Cette étude a permis de recueillir des données précieuses sur cette pathologie bactérienne difficile à traiter. L'analyse des données a identifié les facteurs de risque associés à l'infection à *Clostridioides difficile*, tels que l'âge, le lieu et la durée d'hospitalisation, ainsi que l'antibiothérapie. L'étude a également examiné les méthodes de traitement utilisées, leur efficacité, et a permis d'observer les tendances et les schémas d'infection dans la région.

Mot clés : *Clostridioides difficile*, toxine A et B, toxine binaire, entéropathogènes, colite pseudomembraneuse

Abstract

This work aims to explore the methods and techniques for isolating and identifying the bacterium *Clostridioides difficile* from suspected samples of diarrheal stools, characterize the susceptibility of this bacterium to antibiotics using the diffusion antimicrobial susceptibility test and the E-test for determining minimum inhibitory concentration (MIC), as well as detect toxins A and B through classical and duplex PCR to confirm its pathogenicity.

C. difficile is characterized by non-hemolytic colonies of gray color, exhibiting a round and flat shape with an irregular edge, a granular appearance, a slight depression in the center, a smooth surface, and a characteristic odor resembling horse manure. Examination of smears stained with methylene blue and Gram staining revealed the presence of Gram-positive rod-shaped bacteria with slightly pointed ends. Subterminal non-deforming spores were also observed.

Biochemical identification tests, performed using online microbial identification software for Rapid® ID 32 A gallery and analytical directory for API® 20 A gallery, unequivocally confirmed the presence of *C. difficile* with identification percentages of 90.5% and 99.9% respectively.

Classical and duplex PCR identification tests showed the appearance of two bands corresponding to the *tcdA* and *tcdB* genes, with sizes of 358 bp and 440 bp respectively. These results confirmed the toxin-producing nature of *C. difficile* and its implication in the infection.

The antibiotic susceptibility study, conducted using standard antimicrobial susceptibility testing and E-test, revealed inherent resistance of *C. difficile* to ampicillin/amoxicillin, imipenem, and kanamycin, thus confirming the diagnosis. Acquired resistance to sulfamethoxazole was also observed, while the remaining tested antibiotics were found to be effective (sensitive).

Lastly, a multicenter retrospective study spanning five years (2018-2023) was conducted to analyze *C. difficile* infections in the northern region of Algeria at the "Anaerobic Bacteria and Botulism" laboratory of the Pasteur Institute of Algiers. This study yielded valuable data on this challenging bacterial pathology. Data analysis identified risk factors associated with *Clostridioides difficile* infection, such as age, location, duration of hospitalization, and antibiotic therapy. The study also examined the treatment methods used, their effectiveness, and allowed for the observation of infection trends and patterns in the region.

Keywords: *Clostridioides difficile*, toxin A and B, binary toxin, enteropathogenic, pseudomembranous colitis.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى استكشاف الأساليب والتقنيات المستخدمة لعزل وتحديد بكتيريا كلوستريديويداس ديفيسيل من خلال عينات براز إسهالي لشخص مشتبته فيه لحملة هذه البكتيريا، وكذا تحديد حساسية هذه البكتيريا للمضادات الحيوية باستخدام اختبار الحساسية واختبار الإيتاست لتحديد التركيز الأدنى للتثبيط (أم أي سي) بالإضافة إلى تحديد السموم "أ" و "ب" من خلال اختبار الـ "بي سي آر" التقليدي والمزدوج لتأكيد فتكية البكتيريا.

تتميز سي.ديفيسيل بتشكيلها لمستعمرات غير محللة للدم ذات لون رمادي، تظهر بشكل دائري مسطح بحواف غير منتظمة، وتتميز بالمظهر الحبيبي والانخفاض الطفيف في الوسط، مع سطح أملس، والرائحة المميزة التي تشبه رائحة فضلات الخيل. كشف فحص المسحات الملونة بالأزرق المثيلين وصبغة غرام عن وجود بكتيريا عصوية ذات شكل قضبي موجب الغرام وتنتهي بأطراف مدببة قليلاً. وتم أيضاً ملاحظة وجود أبواغ غير متشوهة غير محاذية.

أجريت اختبارات التعرف الكيميائي الحيوي باستخدام برنامج تعرف الكائنات الحية الدقيقة عبر الإنترنت لتحليل "رايبي دي 32 أ" وباستخدام دليل تحليلي لاختبار "آ بي 20 أ" حيث أكدت وجود بكتيريا سي.ديفيسيل بالنسب المئوية على التوالي 99.9 بالمئة و 90.5 بالمئة.

أظهر اختباري الـ "بي سي آر" التقليدي والمزدوج ظهور شريطين يتوافقان مع جينات "تي سي دي أ" و "تي سي دي ب" بأحجام 358 قاعدة نيوكليوتيدية و 440 قاعدة نيوكليوتيدية على التوالي. أكدت هذه النتائج الطبيعة المنتجة للسموم لـ سي.ديفيسيل وتسببها للعدوى.

أظهرت دراسة الحساسية للمضادات الحيوية، التي أجريت باستخدام اختبار الحساسية واختبار الإي تاست مقاومة طبيعية لـ سي.ديفيسيل اتجاه الأمبيسيلين/الأموكسيسيلين والإيميبينيم والكاناميسين، مما يؤكد التشخيص. كما لوحظ وجود مقاومة مكتسبة للسلفاميثوكسازول، بينما تبين أن المضادات الحيوية المتبقية المختبرة فعالة ضد سي.ديفيسيل (سي.ديفيسيل حساسة).

أخيراً، تم إجراء دراسة مستقصية متعددة المراكز تمتد لمدة خمس سنوات (2018-2023) لتحليل عدوى سي.ديفيسيل في منطقة شمال الجزائر في مختبر "البكتيريا اللاهوائية والботولينوم" بمعهد باستور بالجزائر. أسفرت هذه الدراسة عن بيانات قيمة حول المرض الذي تسببه هذه البكتيريا. أظهر تحليل البيانات استنتاج عوامل الخطر المرتبطة بعدوى سي.ديفيسيل مثل العمر والموقع ومدة الإقامة في المستشفى والعلاج بالمضادات الحيوية. كما ناقشت الدراسة أيضاً الأساليب العلاجية المستخدمة وفعاليتها، وسمحت بمراقبة اتجاهات ونمط العدوى في المنطقة.

Clostridioides difficile, toxine A et B, toxine binaire, entéropathogènes, colite pseudomembraneuse

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléotidique

ARN : Acide RiboNucléotidique

C. difficile : *Clostridioides difficile*

C3G : Céphalosporines de 3ème génération

CCFA : Cyclosérine-céfoxitine-fructose-agar

CDT : *Clostridioides difficile transferase* (toxine binaire)

CMI : concentration minimal inhibitrice

CPM : Colite pseudomembraneuse

CWB : *Cell Wall Binding*

CWP : *Cell Wall Proteins*

Fbp : Protéine liant la fibronectine

ICD : Infection à *Clostridioides difficile*

NAG : N-acétylglucosamine

NAM : N-acétylmuramique

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PS : Polysaccharide

SlpA : Surface Layer protein A

UV : Rayons ultraviolets

TRE : Acidification (TREhalose)

CAT : CATalase

ADH : Arginine dihydrolase

IND : Formation d'INDole

URE : UREase

GLU : acidification (GLUcose)

MAN : acidification (MANnitol)

LAC : acidification (LACtose)

SAC : acidification (SACcharose)

MAL : acidification (MALtose)

SAL : acidification (SALicine)

XYL : Acidification (XYLose)

ARA : Acidification (ARABinose)

SOR : Acidification (SORbitol)

GEL : Hydrolyse (protéase) (GELatine)

ESC : Hydrolyse (β -glucosidase) (ESCuline)

GLY : Acidification (GLYcérol)

RHA : Acidification (RHAmnose)

CEL : Acidification (CELlobiose)

MNE : Acidification (ManNosE)

MLZ : Acidification (MÉLÉZitose)

RAF : Acidification (RAFfinose)

Liste des figures

Figure 1 : Observation sous microscope électronique de <i>C. difficile</i> (Li et al., 2018)	4
Figure 2 : Observation sous microscope optique de <i>C. difficile</i> après coloration de GRAM (Djelouat, 2017).....	4
Figure 3 : Structure de la spore de <i>C. difficile</i> (Lawler et al., 2020)	5
Figure 4 : Modèle des voies de régulation de la germination de <i>C. difficile</i> . (A) Le rôle des régulateurs clés de la germination de <i>C. difficile</i> . (B) Cascade de signalisation de germination de <i>C. difficile</i> (Lawler et al., 2020).....	6
Figure 5 : Colonies de <i>C. difficile</i> sur milieu sélectif (Le Guern & Wallet, 2013)	6
Figure 6 : Structure globale de l'holotoxine TcdB en taille réelle. (a) Un diagramme schématisant montrant l'organisation en domaines de TcdB et les régions approximatives de liaison aux VHH. GTD, domaine de glucosyltransférase (en couleur rouge) ; CPD, domaine d de protéase à cystéine (en couleur bleu clair) ; DRBD, domaine de livraison et de liaison aux récepteurs (en couleur jaune) ; CROPS, domaine de peptides oligorépétitifs combinés (en couleur bleu). (b) Représentations schématisées de l'holotoxine TcdB. Les 3 VHH qui ont été utilisés pour faciliter la cristallisation ont été omis pour des raisons de clarté. Les domaines de TcdB sont colorés comme dans le panneau (a) (Chen et al., 2019)...	15
Figure 7 : Algorithme universel de dépistage pour les cas présumés d'ICD (Rancich & Roman, 2019)	23
Figure 8 : Formation diffuse de pseudomembranes dans tout le côlon révélée par coloscopie. (A) et (B) côlon transverse, (C) et (D) côlon ascendant (Bassi et al., 2023).....	24
Figure 9 : Formation d'une pseudomembrane colique visualisée par photomicrographie (Coloration H&E, Gr : X 200) (Perez Bouza, 2022)	25
Figure 10 : Schéma global des méthodes employées au laboratoire pour diagnostiquer les infections causées par <i>C. difficile</i> (Salas, 2020).....	26
Figure 11 : Test d'agglutination de latex : (A) représente une réaction positive d'agglutination, (B) représente une réaction négative (aspect lisse de couleur blanche) (Ortika et al., 2013)	27
Figure 12 : Illustration d'un test de détection de la GDH (Salas, 2020).....	27
Figure 13 : Colonies de <i>C. difficile</i> fluorescentes sous ultra-violet de couleur vert chartreuse (Le Guern & Wallet, 2013).....	28
Figure 14 : Test de cytotoxicité (CNR) : (A) Culture de cellules embryonnaires humaines (MRC-5), (B) effet cytopathique associé à <i>C. difficile</i> (Gr : X 200) (Lalande et al., 2004).....	30
Figure 15 : Illustrations schématisées de la technique ELISA sandwich. (a) L'anticorps de capture est lié dans chaque puit de la plaque ELISA. (b) la substance cible (en violet) se lie à l'anticorps de capture. (c) Un anticorps accroché à une enzyme de peroxydase de raifort (HRP) est ajouté et se lie à la substance cible liée à l'anticorps de capture, formant ainsi un "sandwich", suivi de l'ajout du substrat qui subit une hydrolyse enzymatique (comme décrit dans la partie "A" de la figure 16), ou un anticorps de détection biotinylé est ajouté, qui se lie à l'antigène cible lié à l'anticorps de capture, formant ainsi un "sandwich" (comme décrit dans la partie "B" de la figure 16), ou un anticorps primaire est ajouté qui se lie à l'antigène cible lié à l'anticorps de capture, formant ainsi un "sandwich" (comme décrit dans la partie "C" de la figure 16). (d) La streptavidine-peroxydase de raifort (S-HRP) est par la suite incorporé et s'attache à l'anticorps biotinylé (comme décrit dans la partie "B" de la figure 16), ou un anticorps secondaire accroché à une HRP qui se lie à l'anticorps primaire est ajouté (comme décrit dans la partie "C" de la figure 16). (e) La dégradation enzymatique du substrat ajouté lors de l'étape suivante conduit à un changement de couleur pouvant être mesuré à l'aide d'un luminomètre en unités relatives de lumière	

(URL), d'un spectrophotomètre en densité optique (DO), ou bien par observation visuelle du précipité formé si une solution de transfert précipitant est employée (Matson, 2023).....	31
Figure 16 : Colonies de <i>C. difficile</i> sur gélose Columbia au sang frais (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)	44
Figure 17 : Visualisation au microscope optique de <i>C. difficile</i> coloré au bleu de méthylène (Gr : X 1000) (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)	45
Figure 18 : Visualisation au microscope optique de <i>C. difficile</i> après coloration de GRAM (Gr : X 1000) (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger).....	46
Figure 19 : Galerie miniaturisée Rapid® ID 32 A après inoculation et incubation (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger).....	46
Figure 20 : Fiche de résultats remplie à partir des données générées par la Galerie miniaturisée Rapid® ID 32 A (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger).....	47
Figure 21 : Résultats générés par le programme d'identification microbienne en ligne -UBPM le Lab-	47
Figure 22 : Galerie miniaturisée API® 20 A après inoculation et incubation (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)	47
Figure 23 : Fiche de résultats remplie à partir des données générées par la Galerie miniaturisée API® 20 A (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger).....	48
Figure 24 : Une page du répertoire analytique de la galerie miniaturisée API® 20 (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger).....	48
Figure 25 : Profil de migration sur gel d'agarose 1.5% après PCR classique (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)	49
Figure 26 : Profil de migration sur gel d'agarose 1.5% après PCR dultiplex (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)	50
Figure 27 : Répartition du nombre de prélèvements analysés ainsi qu'au prélèvement positif d'ICD en fonction des années (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)	52
Figure 28 : Répartition des prélèvements positif et négatifs d'ICD totaux entre 2018 et 2023 (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)	53
Figure 29 : Répartition des données des cas d'ICD positifs en fonction du sexe entre 2018 et 2023 (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger).....	54
Figure 30 : Répartition des données des cas d'ICD positifs en fonction du lieu d'hospitalisation entre 2018 et 2023 (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger).....	54
Figure 31 : Répartition des données des cas d'ICD positifs en fonction de l'application ou non de l'antibiothérapie entre 2018 et 2023 (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)	55
Figure 32 : Répartition des pourcentages des antibiotiques reçus au préalable de l'ICD chez les patients (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger).....	56
Figure 33 : Profil de résistance des souches de <i>C. difficile</i> vis à vis aux antibiotiques (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger).....	57

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau des caractéristiques enzymatiques et biochimiques de <i>C. difficile</i>	7
Tableau 2 : Tableau de l'antibiorésistance du <i>C. difficile</i> isolé.....	51
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des CMI des antibiotiques vis-à-vis de la souche de <i>C. difficile</i> détecté	51

Tables des matières

Remerciements

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
Revue bibliographique	1
1. Généralité.....	3
1.1 Historique	3
1.2 Taxonomie et nomenclature	3
1.3 Propriétés bactériologiques de <i>C. difficile</i> et facteurs de pathogénicité	4
1.3.1 Caractères morphologiques	4
1.3.1.1 Etat végétatif.....	4
1.3.1.2 Etat sporulé.....	5
1.3.2 Caractères cultureux	6
1.3.3 Caractères biochimiques	7
1.3.4 Caractères antigéniques	8
1.3.4.1 Les polysaccharides.....	8
1.3.4.2 Le peptidoglycane.....	8
1.3.4.3 Les protéines de surface.....	8
1.3.5 Sensibilité aux antibiotiques.....	9
1.3.5.1 Résistance naturelle.....	9
1.3.5.2 Résistance acquise.....	10
1.3.6 Facteurs de pathogénicité	11
1.3.6.1 Molécules d'adhésions et de colonisations.....	12
1.3.6.2 Les toxines secrétées par <i>C. difficile</i>	13
2. Physiopathologie et facteurs de risque	16
2.1 Physiopathologie	16
2.2 Facteurs de risque	17
2.2.1 L'hospitalisation	17
2.2.2 L'antibiothérapie	17
2.2.3 L'âge	18

2.2.4	D'autres facteurs de risque	18
3.	Épidémiologie	19
3.1	Réservoir.....	19
3.2	Mode de transmission	19
3.3	Données épidémiologiques.....	19
4.	Manifestations cliniques et récidives	20
4.1	Manifestations cliniques	20
4.1.1	Portage asymptomatique	20
4.1.2	Diarrhée simple	21
4.1.3	Colite pseudomembraneuse et complications	21
4.2	Récidives	21
5.	Diagnostic et identification au laboratoire	22
5.1	Diagnostic clinique	23
5.2	Diagnostic endoscopique	24
5.3	Diagnostic histopathologique	25
5.4	Diagnostic bactériologique	26
5.4.1	La mise en évidence du germe	26
5.4.1.1	Test de glutamate déshydrogénase.....	26
5.4.1.2	Isolement et identification de <i>C. difficile</i>	27
5.4.1.3	Culture toxigénique : Recherche d'un effet cytopathique à partir de la culture bactérienne suspectée.....	29
5.4.2	La mise en évidence des toxines	30
5.4.2.1	Test de cytotoxicité : Recherche d'un effet cytopathique à partir d'un filtrat stérile de selles	30
5.4.2.2	La méthode immuno-enzymatique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).....	31
5.4.2.3	Détection des gènes des toxines A et B par les techniques de biologie moléculaire (PCR).....	32
6.	Traitements thérapeutiques	33
6.1	Traitement antibiotiques	33
6.2	Transplantation fécale.....	33
6.3	Bactériophages.....	33
6.4	Traitement chirurgical	34
7.	Traitements préventifs.....	34
	Matériel et méthodes.....	37

1. Diagnostic bactériologique	35
1.1 Mise en évidence du germe	35
1.1.1 Préparation du milieu de culture	35
1.1.2 Préparation de la suspension bactérienne (dilution des selles) et traitement	35
1.1.3 Mise en culture de la suspension de selles diluée et traitée.....	36
1.1.4 Préparation des frottis bactériens	36
1.1.5 Coloration au bleu de méthylène.....	36
1.1.6 Coloration de GRAM	37
1.1.7 Tests biochimique : préparation des galeries miniaturisées d'identification	37
1.2 Mise en évidence des toxines	39
1.2.1 Recherche des gènes : tcdA et tcdB de <i>C. difficile</i> par PCR classique et duplex.....	39
1.2.1.1 Extraction de l'Acide désoxyribonucléique (ADN) par méthode d'élution....	39
1.2.1.2 Amplification en Chaîne par Polymérase classique et duplex.....	40
1.2.1.3 Préparation du gel d'agarose 1.5%.....	41
1.2.1.4 Dépôt sur le gel, migration et lecture de la PCR classique et duplex.....	42
2. Tests de sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme standard et E-test)	42
2.1 Préparation de l'inoculum	42
2.2 Ensemencement	42
2.3 Application des disques d'antibiotiques et E-tests	43
Résultats et discussion.....	47
1 Résultats.....	44
1.1 Diagnostic bactériologique	44
1.1.1 Observation macroscopique après l'isolement des microorganismes.....	44
1.1.2 Observation microscopique de la bactérie suspectée	44
1.1.3 Tests biochimique : galeries miniaturisées d'identification	46
1.1.3.1 Lecture de la galerie Rapid® ID 32 A après incubation.....	46
1.1.3.2 Lecture de la galerie API® 20 A après incubation.....	47
1.1.4 Recherche des toxines A et B par biologie moléculaire (Recherche des gènes : tcdA et tcdB de <i>C. difficile</i> par PCR).....	49
1.2 Tests de sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme standard et E-test).....	51
1.2.1 Antibiogramme.....	51
1.2.2 E-test.....	51

1.3	Résultats de l'analyse rétrospective des facteurs de risque associés à l'apparition d'infections à <i>C. difficile</i>	52
1.3.1	Répartition du nombre total des prélèvements analysés et les prélèvements positifs en fonction des années	52
1.3.2	Répartition total des pourcentages des prélèvements à ICD positifs et négatifs entre 2018 et 2023.....	53
1.3.3	La moyenne d'âge des patients à ICD positif entre 2018 et 2023.....	53
1.3.4	Répartition des données en fonction du sexe entre 2018 et 2023	53
1.3.5	Répartition des données selon l'hospitalisation ou non des patients entre 2018 et 2023	54
1.3.6	Répartition des données en fonction de la prise ou non d'une antibiothérapie préalable entre 2018 et 2023	55
1.3.7	Répartition des données en fonction de la nature des antibiotiques reçus au préalable entre 2018 et 2023	55
1.3.8	Profil de résistance des souches de <i>C. difficile</i> vis à vis des antibiotiques	56
2.	Discussion.....	57
2.1	Identification bactériologique.....	57
2.2	Discussion des résultats statistiques	59
	Conclusion.....	61
	Références bibliographiques	
	Annexes	

Introduction

Dans le règne bactérien, les bactéries peuvent être classées en deux catégories distinctes : les bactéries non pathogènes et les bactéries pathogènes, ces derniers sont responsables de diverses infections, y compris *Clostridioides difficile* (Barketi-Klai *et al.*, 2012). *C. difficile* est une bactérie anaérobie stricte à Gram positif, sporulée, hôte commensal du tube digestif de l'homme et l'animal, responsable d'une proportion significative des cas de diarrhées post-antibiotiques et de la grande majorité des cas de colites pseudomembraneuses. (Barketi-Klai *et al.*, 2012).

L'infection à *C. difficile* présente des symptômes allant de la diarrhée légère à des complications graves telles que la perforation intestinale et le décès. Récemment, un clone épidémique hyper-virulent de *C. difficile*, appelé B1/NAP1/027, a augmenté les taux de maladie et de décès. Ce clone produit une toxine binaire (CDT) en plus des toxines TcdA et TcdB, aggrave les conséquences de l'infection (Pantaléon, 2015). Depuis 2003, le Canada et les États-Unis ont connu une augmentation des cas de diarrhée sévère liée à ce clone, il s'est rapidement répandu en Amérique du Nord avec 2,28 cas pour 10 000 journées d'hospitalisation, au Royaume-Uni, en Belgique, aux Pays-Bas et récemment en France avec 3,6 cas pour 10 000 journées d'hospitalisation, déclenchant des épidémies, principalement dans le nord de la France. Un autre clone, le PCR ribotype 078, émerge en Europe et provoque des cas de diarrhée sévère, touchant souvent des patients plus jeunes que B1/NAP1/027 (Blanckaert *et al.*, 2007).

C. difficile se distingue par sa résistance naturelle aux antibiotiques anciens et sa capacité à développer une résistance même aux nouveaux antibiotiques. Ce phénomène est en constante évolution et source d'inquiétude (Veyssiere, 2019).

Le laboratoire offre des services complets aux professionnels de la santé, tels que le diagnostic, l'identification et la caractérisation précise, ainsi qu'une évaluation biologique complète. Il joue un rôle crucial dans la détection et la confirmation des épidémies, permettant une surveillance épidémiologique efficace et une réponse rapide. Une communication ouverte entre le personnel du laboratoire et les cliniciens est essentielle pour interpréter correctement les résultats.

L'étude a pour objectifs principaux d'explorer les méthodes et les techniques d'isolement et d'identification de *C. difficile* à partir d'un échantillon suspect de selle diarrhéique, de caractériser sa sensibilité aux antibiotiques en utilisant la technique d'antibiogramme et CMI par E-test ainsi que la recherche des toxines A et B par PCR pour confirmer sa pathogénicité.

Une étude rétrospective multicentrique sur les infections à *C. difficile* est menée au niveau du laboratoire des “Bactéries Anaérobies et du Botulisme” de l’Institut Pasteur d’Alger afin d’identifier les facteurs de risque associés à cette maladie, qui s’est étalée sur une période de cinq ans (du 2018 au 2023), en examinant les données relatives aux patients atteints d’ICD dans la région nord de l’Algérie, on a pu faire une analyse précieuse de cette pathologie bactérienne qui peut être particulièrement difficile à traiter

Revue bibliographique

1. Généralité

1.1 Historique

La colite pseudomembraneuse a été initialement décrite en 1893 par Finney, qui a observé des cas de pseudo membranes diphtériques et de diarrhée hémorragique chez un jeune homme (Lyerly *et al.*, 1988).

La bactérie *C. difficile* a été décrite pour la première fois en 1935 par Hall et O'Toole sous le nom de *Bacillus difficilis* (Hall et O'Toole, 1935). En 1970, Tedesco et son équipe ont identifié *C. difficile* comme l'agent causal de la CPM, une maladie infectieuse du côlon souvent associée à l'utilisation d'antibiotiques à large spectre (Tedesco *et al.*, 1974).

Au fil des années, des épidémies d'ICD ont été signalées dans les hôpitaux et les maisons de soins infirmiers dans le monde entier, avec une augmentation significative du nombre de cas depuis les années 2000. Cette augmentation a été attribuée à l'émergence de souches hypervirulentes de *C. difficile*, telles que la souche NAP1/BI/027 (Freeman *et al.*, 2010).

En 2016, la classification taxonomique de la bactérie a été modifiée, passant de *Clostridium difficile* à *Clostridioides difficile* pour refléter la phylogénie moléculaire et la génétique de la bactérie (Janezic *et al.*, 2020). Au fil du temps, des progrès ont été réalisés dans le diagnostic et le traitement de l'ICD. Les tests de détection des toxines de *C. difficile* dans les selles sont devenus plus sensibles et spécifiques, ce qui a amélioré la précision du diagnostic. De nouveaux traitements, tels que la transplantation de microbiote fécal, ont également été développés pour les cas réfractaires (Janezic *et al.*, 2020).

1.2 Taxonomie et nomenclature

Le genre *Clostridioides* a été créé en 2016, à la suite d'une révision taxonomique du genre *Clostridium*. Auparavant, *C. difficile* était connue sous le nom de *Clostridium difficile* (Lawson *et al.*, 2016).

Règne : Bacteria

Phylum : Firmicutes

Classe : Clostridia

Ordre : Clostridiales

Famille : Peptostreptococcaceae

Genre : *Clostridioides*

Espèce : *Clostridioides difficile*

1.3 Propriétés bactériologiques de *C. difficile* et facteurs de pathogénicité

1.3.1 Caractères morphologiques

1.3.1.1 Etat végétatif

C. difficile est mobile par des flagelles péritriches, sa taille est comprise entre 3 et 15 μm de longueur pour une largeur de 0,5 à 2 μm et possède des spores subterminales et terminales (Figure 1), cette bactérie est un bacille à Gram positif (Figure 2) (Le Guern, 2012).

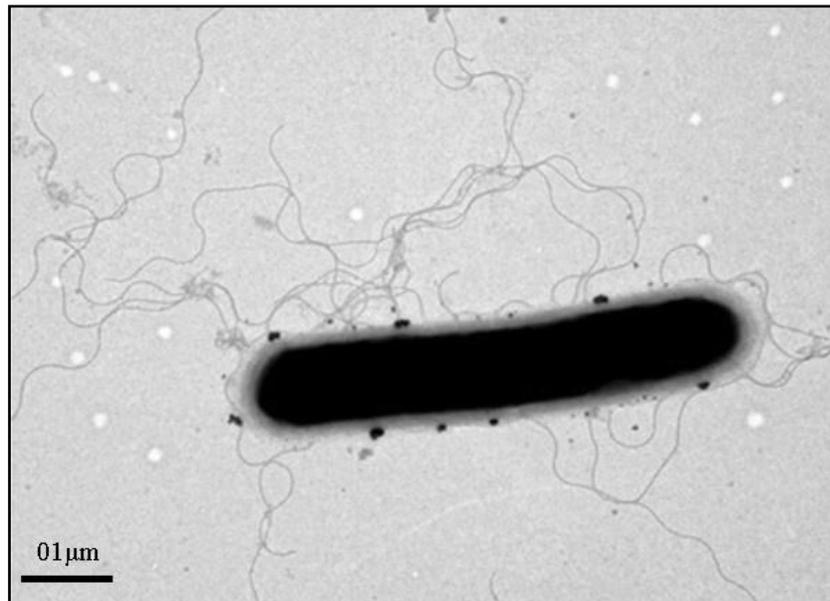


Figure 1 : Observation sous microscope électronique de *C. difficile* (Li *et al.*, 2018)



Figure 2 : Observation sous microscope optique de *C. difficile* après coloration de GRAM (Djelouat, 2017)

1.3.1.2 Etat sporulé

a) Structure de la spore

Les endospores de *C. difficile* ont une structure complexe avec un noyau contenant le génome bactérien, entouré d'une membrane et d'une couche de peptidoglycane résistante aux conditions environnementales. Cette couche est renforcée par un cortex modifié, tandis que le manteau et l'exosporium, composés de protéines, jouent un rôle important dans la germination de la spore (Figure 3) (Lawler *et al.*, 2020).

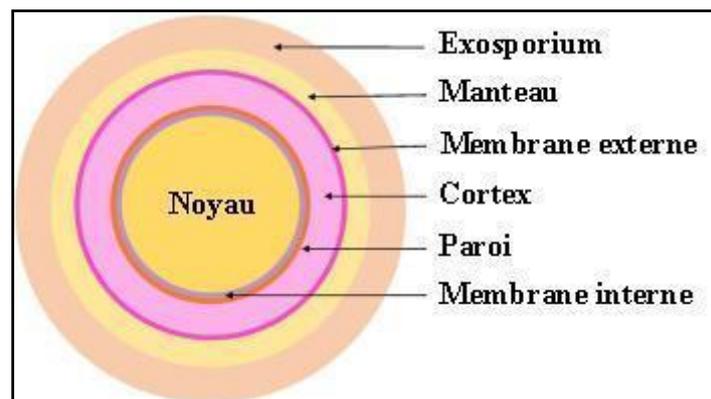


Figure 3 : Structure de la spore de *C. difficile* (Lawler *et al.*, 2020)

b) Régulation de la germination des spores chez *C. difficile*

C. difficile utilise des protéases subtilisine-like du locus cspBAC pour détecter les germinants. Les protéines CspB, CspA et CspC du même locus sont essentielles pour la transmission des signaux de germination et leurs interactions sont cruciales pour une germination efficace (Paredes-Sabja *et al.*, 2014).

GerG est crucial pour l'incorporation des protéines CspA, CspB et CspC dans les spores matures de *C. difficile*. Sans GerG fonctionnel, les niveaux réduits de ces protéines perturbent la détection des germinants, bloquent l'hydrolyse du cortex et empêchent la germination (Lawler *et al.*, 2020).

CspC est le récepteur de germination des sels biliaires chez *C. difficile*, transmettant le signal à CspB. La plus grande abondance de CspC dans les spores matures des souches cliniquement pertinentes ne correspond pas à une germination plus rapide, suggérant un rôle complexe de CspC dans la transduction du signal et une possible inhibition des processus en aval (Figure 4) (Lawler *et al.*, 2020).

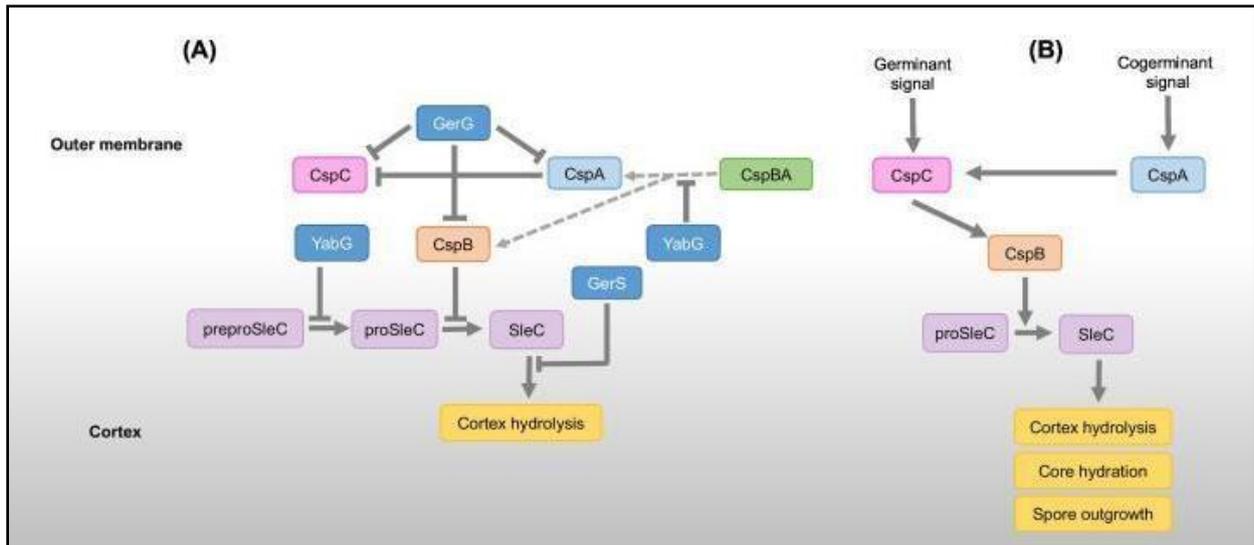


Figure 4 : Modèle des voies de régulation de la germination de *C. difficile*. (A) Le rôle des régulateurs clés de la germination de *C. difficile*. (B) Cascade de signalisation de germination de *C. difficile* (Lawler *et al.*, 2020)

1.3.2 Caractères culturels

C. difficile est une bactérie anaérobie stricte, exigeante, culture difficile (48h à 72h d'incubation) (Lalande *et al.*, 2004).

Sur gélose Columbia au sang frais, les colonies de *C. difficile* qui se forment ont une taille de 2 à 4 mm après 24 heures d'incubation et jusqu'à 8 à 12 mm après 48 heures, avec une sporulation maximale après 72 heures. Elles se distinguent par une couleur grise, une texture mate, une opacité et une fluorescence caractéristique sous rayons ultraviolets (Figure 5). La survie des bactéries isolées sur milieu gélosé est courte en atmosphère aérobie (Freney *et al.*, 2019).



Figure 5 : Colonies de *C. difficile* sur milieu sélectif (Le Guern & Wallet, 2013)

Sur le milieu sélectif cyclosérine-céfoxitine-fructose-agar, qui contient une combinaison d'agents antimicrobiens (la céfoxitine et la cyclosérine), associés à des nutriments comme le jaune d'œuf, le fructose et le rouge neutre (Xiao *et al.*, 2019), les colonies de *C. difficile*

apparaissent plus petites avec une couleur jaune à l'œil nu, un aspect de verre fritté à la loupe et des extrémités irrégulières. Le rouge neutre est ajouté en tant qu'indicateur de pH. La présence de *C. difficile* fera passer l'indicateur du rose/orange au jaune en raison de l'utilisation des acides aminés par l'organisme, ce qui augmente le pH global et provoque le changement de couleur de l'indicateur (McDonald *et al.*, 2005).

Sur le milieu chromogène CHROMagar™, les colonies de *C. difficile* apparaissent incolores et fluorescentes sous lumière UV (à 365 nm). Tandis que sur le milieu chromogène CHROMID® de biomérieux les colonies de *C. difficile* ont une couleur caractéristique grise à noire (Rousseau *et al.*, 2010).

L'odeur de crottin de cheval dégagée est une caractéristique inhabituelle de ce germe parmi les bactéries intestinales. Cette odeur est due à la synthèse d'un composé bactériostatique appelé para-crésol (p-crésol), qui est produit par la fermentation de la tyrosine. Cette capacité confère à *C. difficile* un avantage compétitif par rapport à d'autres bactéries intestinales telles que *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* et *Bacteroides thetaiotaomicron* (Passmore *et al.*, 2018).

1.3.3 Caractères biochimiques

C. difficile est capable de fermenter le fructose, le glucose, le mannitol, le mannose, le mélezitose et le sorbitol. Toutes les souches de *C. difficile* sont capable de liquéfier la gélatine à 2 % seulement. La fermentation du mannitol et la liquéfaction de la gélatine sont des caractéristiques importantes qui soulignent la spécificité de *C. difficile* parmi les espèces de clostridies capables de liquéfier la gélatine (Nakamura *et al.*, 1982).

Tableau 1 : Tableau des caractéristiques enzymatiques et biochimiques de *C. difficile* (Grosjean *et al.*, 2017)

IND	URE	GLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA	GEL
-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
ESC	GLY	CEL	MNE	MLZ	RAF	SOR	RHA	TRE	CAT	ADH
-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

1.3.4 Caractères antigéniques

1.3.4.1 Les polysaccharides

D'après les dernières études, il a été mis en évidence que les souches *C. difficile* sont capables d'exprimer trois polysaccharides hautement complexes (PSI, PSII et PSIII) à leur surface (Bertolo *et al.*, 2012) :

- a) Le polysaccharide PSI est constitué d'une unité répétitive pentaglycosyl-phosphate ramifiée composée de glucose et de rhamnose (Reid *et al.*, 2012).
- b) Le polysaccharide complexe PSII a été initialement identifié en 1982. Présent chez toutes les souches de *C. difficile*, PSII constitue un antigène commun formé d'unités répétées d'hexaglycosyl phosphates qui lui fournit une importante flexibilité (Bertolo *et al.*, 2012) et composées principalement de glucose (Glc), de mannose (Man) et de N-acétylglucosamine (GalNAc) (Ganeshapillai *et al.*, 2008).
- c) Le polysaccharide PSIII est un glycane insoluble dans l'eau de type acide lipotéichoïque, composé de lipides et de sucres (Jiao *et al.*, 2013).

1.3.4.2 Le peptidoglycane

Le peptidoglycane, qui constitue la composante principale de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif, joue un rôle essentiel dans leur protection contre les stress environnementaux, ainsi que dans leur virulence et favorise leur capacité à développer une résistance aux antibiotiques (Scheffers & Pinho, 2005).

Le peptidoglycane est habituellement constitué de chaînes glycaniques alternées, composées de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM), qui sont reliées par des courts peptides fixés à NAM (Vollmer *et al.*, 2008). Le peptidoglycane de *C. difficile* se caractérise par des traits inhabituels, incluant une abondance de liaisons peptidiques 3-3, et un taux élevé de désacétylation de (NAG) (Peltier *et al.*, 2011).

Dans de nombreuses bactéries, y compris *C. difficile*, la désacétylation du peptidoglycane est un mécanisme fréquemment utilisé pour résister à l'action du lysozyme (Davis & Weiser, 2011).

1.3.4.3 Les protéines de surface

Certaines molécules présentes à la surface de la bactérie *C. difficile* sont des protéines appelées *Cell Wall Binding* qui pourraient jouer un rôle crucial dans l'ancrage des composés à la surface de cette bactérie (Karjalainen *et al.*, 2001).

Le locus *cwp* code pour diverses protéines connues sous le nom de *Cell Wall Proteins* (CWP), parmi lesquelles se trouvent des protéines telles que SlpA (*Surface Layer protein A*), *cwp66* (qui encode une adhésine) et *cwp84* (qui code pour une protéase). Le rôle précis de ces protéines dans le mécanisme d'ancrage demeure inconnu (Fagan *et al.*, 2011).

Une protéine d'une grande importance est Fbp68 (également connue sous le nom de FbpA), qui se lie spécifiquement à la fibronectine située à la surface des cellules épithéliales (Lemée *et al.*, 2005).

Les protéines flagellaires sont indispensables pour la locomotion de *C. difficile* ainsi que pour son adhésion au mucus de l'hôte. La flagelline stimule la réponse immunitaire innée en activant le récepteur TLR5 présent sur les cellules coliques (Hayashi *et al.*, 2001).

1.3.5 Sensibilité aux antibiotiques

La résistance vis-à-vis des antibiotiques est un processus naturel au sein des populations bactériennes. Certaines bactéries comme *C. difficile* présentent une résistance innée, c'est-à-dire qu'elles sont naturellement insensibles à certains antibiotiques (Veysiere, 2019).

Cette résistance naturelle peut servir de critère d'identification des bactéries. En revanche, d'autres bactéries sont capables de développer une résistance acquise par le biais de modifications génétiques, ces modifications leur permettent d'échapper à l'action des antibiotiques auxquels elles étaient auparavant sensibles (Veysiere, 2019).

C. difficile présente une forte sensibilité vis-à-vis du métronidazole et de la vancomycine (*in vitro*) (Songer, 2010).

Bien que les céphalosporines et les pénicillines présentent une sensibilité (*in vitro*) contre *C. difficile*, ils ne sont pas employés dans le traitement de l'ICD en raison de leur possible neutralisation par les céphalosporinases et les β -lactamases, formées par la flore intestinale, cela entrave leur action thérapeutique *in vivo* (Ryan & Ray, 2004).

1.3.5.1 Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies y compris *C. difficile*, possèdent une résistance naturelle envers les aminosides tels que l'Amikacine, la Gentamicine, la Kanamycine, la Néomycine, la Plazomicine, la Streptomycine et la Tobramycine (Veysiere, 2019). Cette résistance est due à l'absence d'un système de transport actif nécessaire pour permettre un passage efficace de ces antibiotiques à travers leur membrane cytoplasmique (Veysiere, 2019).

C. difficile présente une résistance naturelle à la céfoxitine, avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) variant de 32 à 128 mg/L (Courvalin *et al.*, 2012). Cependant, cette résistance est exploitée dans la préparation de milieux de cultures sélectifs tels que le milieu CCFA (Courvalin *et al.*, 2012).

En ce qui concerne le céfotaxime, plus de 90% des souches de *C. difficile* montrent une résistance à cet antibiotique. Cela soulève des préoccupations importantes, car le céfotaxime est un antibiotique couramment utilisé dans le traitement des infections bactériennes (Courvalin *et al.*, 2012).

Une sensibilité significativement réduite à l'imipénème est aussi observée chez *C. difficile*. Une concentration minimale inhibitrice (CMI) variant de 01 à 16 mg/L, ce qui conduit à la classification d'un pourcentage notable de souches comme résistantes ou intermédiaires (Courvalin *et al.*, 2012).

1.3.5.2 Résistance acquise

La résistance acquise se réfère au phénomène où une ou plusieurs souches d'une espèce bactérienne, qui étaient initialement sensibles à un ou plusieurs antibiotiques, développent par la suite une résistance à cet ou ces antibiotiques (Veysiere, 2019).

La capacité de *C. difficile* à résister à un large éventail d'antibiotiques pourrait être expliquée par la présence d'éléments mobiles, ayant des gènes de résistance aux antibiotiques intégrés dans son patrimoine génétique (Sebahia *et al.*, 2006).

La résistance au métronidazole est vraisemblablement causée par plusieurs modifications dans des voies métaboliques qui ne sont pas encore clairement définies tels que l'activité des nitroréductases, la réparation de l' Acide DésoxyriboNucléotidique et l'absorption du fer (Peng *et al.*, 2017). Certaines études ont soulevé la question de la résistance au métronidazole, cependant, aucun lien n'a été établi entre cette résistance et des échecs cliniques (Courvalin *et al.*, 2012). La sensibilité de *C. difficile* à la vancomycine est généralement constante, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) inférieures à 4 mg/L, selon plusieurs études (Courvalin *et al.*, 2012).

La résistance à la vancomycine est causée par des changements au niveau des acides aminés présents dans des protéines impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane, comme MurG (Peng *et al.*, 2017).

La résistance de *C. difficile* à la clindamycine est due à plusieurs processus de transfert génétique horizontaux, tels que la conjugaison, la transduction et la transformation d'éléments génétiques mobiles (EGM), notamment des transposons. Environ 11 % du génome de *C. difficile* est composé d'EGM (Ackermann *et al.*, 2001). La résistance aux antibiotiques de la famille MLSB (*macrolide-lincosamide-streptogramin B*) chez *C. difficile* est médiée par différents types de transposons, dont Tn5398, Tn6194 et Tn6215. Ces transposons facilitent également le transfert du gène *ermB*, qui code pour une méthylase de l'Acide RiboNucléotidique 23S et qui confère la résistance à la clindamycine et à d'autres antibiotiques de la famille MLSB (Ackermann *et al.*, 2001).

C. difficile peut aussi acquérir une résistance vis-à-vis aux fluoroquinolones. Si la concentration environnementale de cet antibiotique n'est pas assez élevée pour inhiber *C. difficile*, le pathogène a la capacité de développer des substitutions d'acides aminés dans les sous-unités de l'ADN gyrase, à savoir GyrA et/ou GyrB. Les changements au niveau de la région responsable de la résistance aux quinolones de GyrA ou GyrB pourraient être impliqués dans la résistance aux fluoroquinolones chez *C. difficile* (Peng *et al.*, 2017). La résistance acquise à la moxifloxacine dans la majorité des cas est due à une mutation dans le gène *gyrA*(ADN gyrase) par substitution d'acides aminés (Ackermann *et al.*, 2001).

1.3.6 Facteurs de pathogénicité

La transmission de l'ICD se fait par le biais des endospores, lesquelles sont en état de dormance métabolique et présentent une grande résistance à diverses formes de stress environnementaux, tels que le pH, la chaleur, les antibiotiques et l'oxygène (Pantaléon, 2015). La persistance de ces endospores est responsable de l'accroissement des taux de CDI récurrents, et il est estimé qu'environ 33 % et 45 % des patients connaîtront une récurrence après le premier et le deuxième épisode de la maladie, respectivement (Li *et al.*, 2018).

La pathogenèse des ICD s'articule autour de deux étapes majeures. La première étape, appelée colonisation intestinale, se caractérise par l'établissement et la prolifération de la bactérie dans le tube digestif de l'hôte. La deuxième étape implique la synthèse, par les souches toxigènes de la bactérie, des toxines A et B, qui jouent un rôle causal dans le développement des lésions intestinales (Barketi-Klai, 2012).

1.3.6.1 Molécules d'adhésions et de colonisations

La phase de colonisation du système digestif par *C. difficile* revêt une importance capitale. Elle autorise la persistance de cette bactérie dans le système gastro-intestinal, malgré le flux constant de liquides intestinaux, et lui confère la capacité de s'adhérer aux cellules épithéliales de l'intestin (Barketi-Klai, 2012).

Les protéines de surface de *C. difficile* ont plusieurs rôles, notamment la protection contre les agressions extérieures, l'utilisation des nutriments et les interactions bactérie-bactérie. Plusieurs de ces protéines ont été identifiées pour leur structure et leurs fonctions (Barketi-Klai, 2012 ; Scott & Barnett, 2006).

a) Cell Wall Proteins

Certaines protéines associées à la surface des bactéries présentent une séquence homologue composée de deux à trois domaines Pfam 04122 appelé CWB, qui pourraient jouer un rôle dans l'ancrage des protéines à la surface de la bactérie (Karjalainen *et al.*, 2001).

Les domaines CWB ont été trouvés dans 29 protéines de *C. difficile*, appelées protéines CWP, dont 12 sont codées par un même locus de 37 Kb appelé locus *cwp*. Des études ont identifié le rôle de certains gènes de ce locus, comme *slpA*, *cwp66* (gène qui code pour une adhésine) et *cwp84* (gène qui code pour une protéase). Cependant, le mécanisme d'ancrage de ces protéines à la surface de la bactérie reste inconnu (Fagan *et al.*, 2011). La protéine *SlpA* de *C. difficile* possède un effet inhibiteur sur l'expression des protéines des jonctions serrées et l'induction de cytokines pro-inflammatoires dans les cellules épithéliales (Noori *et al.*, 2022).

b) Protéine liant la fibronectine Fbp68

La protéine de surface Fbp68, également appelée FbpA chez *C. difficile*, exprimée à partir du gène *fbp68* (Lemée *et al.*, 2005). C'est une protéine qui se lie à la fibronectine : une glycoprotéine présente à la surface des cellules eucaryotes notamment les cellules épithéliales et/ou dans le ciment intercellulaire (Hennequin *et al.*, 2003).

c) Les protéines flagellaires

Les filaments flagellaires jouent un rôle crucial dans la locomotion des bactéries, la formation du film bactérien, leur capacité de chimiotactisme, ainsi que dans leur adaptation à leur niche écologique (Twine *et al.*, 2009).

Le processus de locomotion de *C. difficile* est régulé par trois opérons. Dans le génome de *C. difficile*, un seul exemplaire du gène *fliC* est détecté. Ce gène est responsable de la biosynthèse

d'une protéine de surface (Tasteyre *et al.*, 2000). La protéine FliD qui constitue la coiffe, codé par le gène *fliD*, est impliquée dans l'adhésion de *C. difficile* au mucus de l'hôte, contribuant ainsi à la capacité de cette bactérie à se fixer et à coloniser la surface du mucus (Tasteyre *et al.*, 2001).

d) Les enzymes hydrolytiques

C. difficile synthétise un grand nombre d'enzymes telles que la collagénase, la chondroïtine-sulfatase et l'hyaluronidase. Ces enzymes provoquent la perturbation des jonctions étanches des cellules épithéliales et la perte de liquide (Markovska *et al.*, 2023).

1.3.6.2 Les toxines secrétées par *C. difficile*

Les toxines A et B sont des éléments essentiels de la virulence de *C. difficile* et ont fait l'objet de nombreuses études approfondies. Elles sont responsables des manifestations cliniques constatées dans les infections à *C. difficile* (ICD) (Voth & Ballard, 2005). Après l'implantation, les souches pathogènes de *C. difficile* généralement produisent deux toxines, à savoir la toxine A (également appelée entérotoxine ou TcdA) et la toxine B (également appelée cytotoxine ou TcdB), qui agissent de manière synergique. Seules les souches toxigènes sont pathogènes. Ces toxines provoquent une réaction inflammatoire intense qui entraîne la nécrose des entérocytes (Braun *et al.*, 1996). Certains isolats de *C. difficile* présentent la particularité de produire de manière concomitante les deux toxines A et B, ainsi qu'une autre troisième toxine nommée la toxine binaire (Voth & Ballard, 2005).

a) Les toxines A et B

- **Structure des toxines A et B**

Les deux toxines partagent une similitude de 66 %. Leur structure se caractérise par une organisation multi-modulaire identique, comprenant quatre domaines qui s'assemblent pour former deux entités distinctes (Genth *et al.*, 2008 ; Pantaléon, 2015). La première partie se compose d'un unique domaine situé en position N-terminale situé après le domaine cystéine protéase. Ce domaine spécifique est responsable de la fonction glycosyltransférase (Genth *et al.*, 2008). La deuxième partie qui concerne la distribution des toxines, comportant trois domaines distincts, le premier, qui est situé à l'extrémité C-terminale correspond au domaine d'association au récepteur. Le second domaine qualifié transmembranaire, exerce une fonction cruciale en favorisant la création d'un pore au sein de la membrane de l'endosome, ceci facilite ultérieurement la translocation des toxines vers le cytosol de la cellule hôte (Genth *et al.*, 2008). Le troisième domaine, connu sous le nom de domaine cystéine protéase, présente une triade

catalytique qui joue un rôle important dans le processus de clivage autocatalytique des toxines. Ce clivage se produit spécifiquement au niveau de l'acide aminé 543 des deux toxines, ce qui entraîne la libération de la partie N-terminal fonctionnelle (Genth *et al.*, 2008).

Les CROPS (*Combined Repeated Oligopeptides*) sont des motifs courts et répétitifs qui composent le domaine C-terminal de liaison au récepteur (Voth & Ballard, 2005). Elle comprend à la fois des motifs courts (SR) et longs (LR). Les motifs courts sont constitués de 19 jusqu'à 24 acides aminés, tandis que les motifs longs sont composés de 31 acides aminés (Ho *et al.*, 2005).

Le domaine de liaison de la toxine A est constitué de 32 motifs (SR) courts et 7 motifs (LR) longs, tandis que celui de la toxine B est formé de 19 motifs (SR) courts et 4 motifs (LR) longs (Figure 6) (Pruitt & Lacy, 2012). Ensemble, ces motifs constituent des répétitions de liaison à la paroi. Ces répétitions sont capables de détecter la structure polysaccharidique présente à la surface des cellules épithéliales (Pruitt & Lacy, 2012).

- **Mécanisme d'action des toxines A et B**

Tous les récepteurs spécifiques auxquels les toxines se lient ne sont pas encore identifiés (Pantaléon, 2015).

Les récepteurs des toxines varient d'une espèce animale à une autre (Voth & Ballard, 2005). Chez l'homme, il a été observé que la toxine A se lie à une glycoprotéine nommée gp96, connue pour sa capacité à être glycosylée (Na *et al.*, 2008). Toutefois, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour confirmer le disaccharide spécifique impliqué dans cette interaction et comprendre pleinement son rôle dans la fixation de la toxine A (Na *et al.*, 2008).

Les toxines A et B pénètrent dans les cellules épithéliales du côlon par endocytose et désactivent les GTPases, notamment les Rho, Rac et Cdc42, perturbant ainsi le cytosquelette et les fonctions cellulaires essentielles (Carter *et al.*, 2010 ; Pothoulakis & Lamont, 2001).

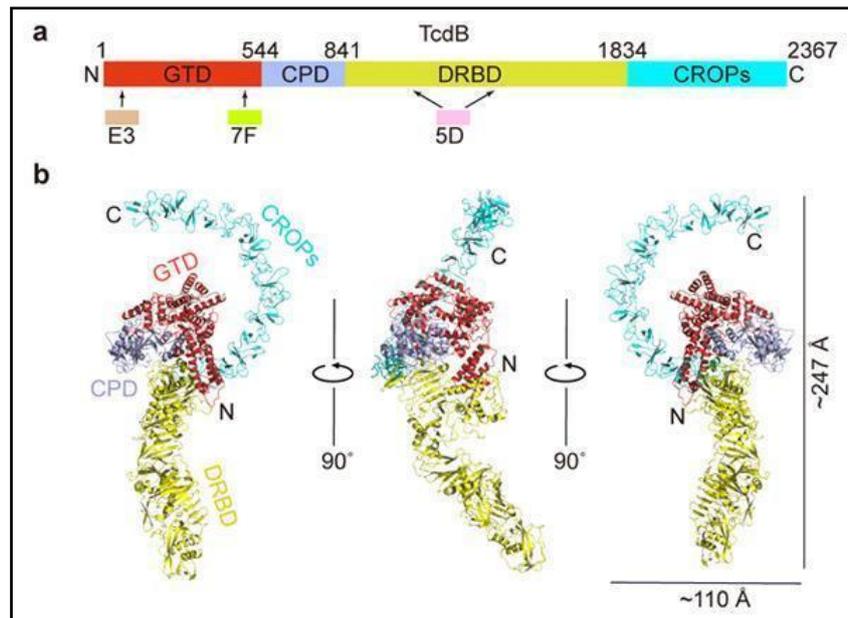


Figure 6 : Structure globale de l'holotoxine TcdB en taille réelle. (a) Un diagramme schématisant l'organisation en domaines de TcdB et les régions approximatives de liaison aux VHH. GTD, domaine de glucosyltransférase (en couleur rouge) ; CPD, domaine d de protéase à cystéine (en couleur bleu clair) ; DRBD, domaine de livraison et de liaison aux récepteurs (en couleur jaune) ; CROPs, domaine de peptides oligorépétitifs combinés (en couleur bleu). (b) Représentations schématisées de l'holotoxine TcdB. Les 3 VHH qui ont été utilisés pour faciliter la cristallisation ont été omis pour des raisons de clarté. Les domaines de TcdB sont colorés comme dans le panneau (a) (Chen *et al.*, 2019)

Les toxines ont la capacité d'augmenter la perméabilité de la barrière tissulaire de l'épithélium intestinal, ce qui peut entraîner une altération de son intégrité et une fuite de molécules à travers celle-ci. De plus, elles peuvent également déclencher la mort cellulaire par apoptose, un processus programmé de mort cellulaire (He *et al.*, 2000).

En plus des effets mentionnés précédemment, les toxines activent des voies pro-inflammatoires, ce qui conduit à une inflammation accrue de la muqueuse épithéliale et la survenue de manifestations cliniques graves telles que les pseudomembranes (Voth & Ballard, 2005).

b) La toxine binaire

La toxine binaire, également appelée CDT (*C. difficile* transférase), est une toxine produite par un petit pourcentage de souches de *C. difficile* (entre 5% et 30%) (Aktories *et al.*, 2017). Elle agit comme une ADP-ribosyltransférase, perturbant l'actine cellulaire. Cela entraîne une désorganisation du cytosquelette et une redistribution anormale des filaments d'actine (Gülke *et al.*, 2001 ; Schwan *et al.*, 2009).

Selon plusieurs études, il existe un lien entre la gravité de l'ICD et la production de la toxine binaire (Gerding *et al.*, 2014). Cette toxine binaire est composée de deux sous-unités protéiques, CDTa et CDTb. CDTa, est la partie enzymatique de la toxine (Gülke *et al.*, 2001). Une fois

fonctionnelle grâce à l'intervention d'une protéase de type sérine, CDTb se lie au récepteur des cellules épithéliales LSR (lipolysis stimulated lipoprotein receptor) (Papatheodorou *et al.*, 2011).

Les subdivisions CDTb et CDTa sont exprimées par les gènes *cdtB* et *cdtA* respectivement, localisés dans un même site appelé CdtLoc (Carter *et al.*, 2007). La présence de ce site n'est pas liée à la présence du locus de pathogénicité. Cela signifie que même les souches avirulentes ont la capacité d'exprimer le CdtLoc (Geric *et al.*, 2003).

2. Physiopathologie et facteurs de risque

2.1 Physiopathologie

Le processus initial de la physiopathologie des ICD implique une altération de la composition de la flore intestinale anaérobie protectrice, souvent induite par une antibiothérapie (Janoir *et al.*, 2007). Cette altération facilite l'établissement et la multiplication de *C. difficile* dans le tractus gastro-intestinal. Lors de la colonisation du système digestif par cette bactérie, divers mécanismes entrent en jeu, notamment l'implication d'adhésines ainsi que potentiellement des enzymes protéolytiques et hydrolytiques (Janoir *et al.*, 2007).

Les protéines de surface identifiées jusqu'à présent dans le contexte de *C. difficile* comprennent : Cwp66, P36 et P47 de la couche S, FliD et FliC des flagelles, GroEL du choc thermique, Fbp68 pour l'attachement à la fibronectine et la protéase Cwp84 (type cystéine) responsable de l'altération du tissu épithélial et la propagation de l'infection (Janoir *et al.*, 2007).

La deuxième phase du processus implique que les souches de *C. difficile* toxigènes produisent les toxines A et B. Ces toxines possèdent des caractéristiques à la fois entérotoxiques et cytotoxiques qui interagissent de manière mutuelle. De récentes données expérimentales, apportent des éléments de preuve évoquant qu'uniquement la toxine B pourrait être un facteur de pathogénicité important chez cette bactérie (Jank & Aktories, 2008). Les toxines A et B de *C. difficile* sont des enzymes glucosyltransférases dont leur action est la monoglucosylation de l'acide aminé thréonine qui est présente dans les GTPases Cdc42, Rac, Rho des cellules épithéliales (Yang *et al.*, 2015). La perte de leur activité entraîne une apoptose cellulaire qui est due à la destruction de l'infrastructure cytosquelettique. Les toxines A et B exercent leur action en dégradant le complexe d'adhérence intercellulaire entre les cellules épithéliales intestinales, entraînant ainsi une réponse inflammatoire considérable caractérisée par la mobilisation des granulocytes neutrophiles dans le tissu conjonctif lâche (Dupuy *et al.*, 2008).

Il a été observé que la toxine binaire peut optimiser les effets délétères des deux toxines A et B. De plus, elle est plus fréquemment liée à des états graves d'infections causées par cette bactérie (Kyne *et al.*, 2000).

2.2 Facteurs de risque

2.2.1 L'hospitalisation

Les centres hospitaliers peuvent être considérés comme des sources potentiels de spores de *C. difficile* pour deux principales causes : La première est liée à la présence de sujets infecté, la deuxième une proportion de porteurs sains supérieur à la normale chez les personnes hospitalisées et sous antibiothérapie (Dubberke *et al.*, 2007 ; Hedge *et al.*, 2008). Effectivement, une prévalence estimée de 2 à 3 % de porteurs sains parmi un groupe d'individus, tandis qu'elle augmente de 5 à 11 % chez les personnes hospitalisées (Alasmari *et al.*, 2014 ; Hedge *et al.*, 2008). L'admission d'un individu à l'hôpital représente un facteur de risque majeur, en particulier lorsqu'il s'agit d'une hospitalisation prolongée, car cela augmente considérablement la probabilité d'être infecté par cette bactérie. La colonisation de *C. difficile* est particulièrement susceptible de conduire au développement d'une ICD chez les individus dont l'état de santé est déjà compromis (Khanna & Pardi, 2014).

2.2.2 L'antibiothérapie

L'un des principaux risques associés au développement d'une ICD est l'utilisation d'antibiotiques. Cette classe de médicaments peut déstabiliser la microflore anaérobie du tube digestif, entraînant une diminution de sa variété en microorganismes (Permpoonpattana *et al.*, 2011).

Il est suggéré que la microflore occupant le tube digestif peut perdre sa capacité à garantir efficacement son activité de bouclier protecteur contre l'implantation et la dissémination des microorganismes virulents. Le déséquilibre de la microflore intestinale favorise la colonisation et le développement de cette bactérie, consécutivement à la germination des spores extrinsèques ou intrinsèques, la bactérie s'implante ainsi dans le tractus gastro-intestinal et se prolifère sans être entravée par d'autres groupes bactériens (Barc *et al.*, 2004 ; Rupnik *et al.*, 2009).

Les ICDs ont été fréquemment liées à plusieurs antibiotiques, comme les céphalosporines de 3ème génération, les pénicillines du type (A), ainsi que les macrolides et les fluoroquinolones (Ackermann *et al.*, 2005 ; Dhalla *et al.*, 2006).

La période de l'antibiothérapie peut influencer la survenue d'une ICD. Effectivement, une antibiothérapie d'une période de moins de trois jours présenterait un risque moindre de déclenchement d'une ICD en comparaison avec une antibiothérapie prolongée ou à l'utilisation concomitante de plusieurs antibiotiques (Barbut *et al.*, 2004). Néanmoins, il convient de noter que des ICDs ont été identifiés chez des patients ayant administré un antibiotique en une seule et unique dose, ainsi que chez des patients n'ayant pas pris d'antibiotique antérieurement (Barbut *et al.*, 2004).

2.2.3 L'âge

Il est établi que les personnes âgées, généralement définies comme ayant plus de 65 ans, présentent une sensibilité accrue aux infections communautaires ou nosocomiales, notamment lorsqu'elles sont hospitalisées (Khanna *et al.*, 2012). Les individus appartenant à d'autres groupes d'âge ne manifestent pas des symptômes aussi graves que ceux observés chez les personnes âgées. Selon les données disponibles, il semble y avoir une corrélation plus élevée entre le risque de déclencher une ICD chez les personnes âgées atteintes de CPM vis-à-vis des patients qui n'ont pas de facteur lié de comorbidité, ce dernier représente un facteur de risque important (Khanna *et al.*, 2012).

Les facteurs qui contribuent aux liens entre l'âge et la gravité de l'infection ne sont que partiellement élucidés. Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer ceci, notamment la réduction de l'efficacité du mécanisme de défense immunitaire, une fréquence accrue des hospitalisations, les altérations de la microflore du tractus gastro-intestinal liées au processus de vieillissement et l'aggravation des affections préexistantes (Khanna *et al.*, 2012).

2.2.4 D'autres facteurs de risque

Il existe d'autres médicaments qui peuvent entraîner une augmentation des risques d'ICD, incluant les chimiothérapies, les laxatifs et les antiacides. La coloscopie, la sonde nasogastrique, les interventions chirurgicales dans l'intestin, la nutrition, la fréquentation d'animaux, les maladies associées tel que les cancers, les maladies rénales chroniques et la déficience immunitaire, représentent des facteurs de risques importants qui ne doivent pas être sous-estimés (Chapeton Montes, 2012).

D'après Khanna et son équipe, le sexe ne possède aucune influence sur le déclenchement d'une ICD (Khanna *et al.*, 2012).

3. Épidémiologie

3.1 Réservoir

C. difficile se trouve au niveau du tractus gastro-intestinal des animaux et de l'homme (Grosjean *et al.*, 2017). Il peut se trouver également dans l'environnement sous forme sporulé (20% dans le sol et de 50% jusqu'à 80% dans l'eau) (Grosjean *et al.*, 2017).

Le portage asymptomatique de cette bactérie est plus répandu chez les nouveau-nés avec un pourcentage touchant les 70% qui baisse systématiquement jusqu'à l'âge de deux ans (Freney *et al.*, 2019).

3.2 Mode de transmission

La transmission de *C. difficile* se produit par voie oro-fécale, généralement par le biais de l'environnement contaminé ainsi que par les mains des professionnels de santé qui peuvent être contaminées directement après avoir effectué un contact avec un sujet infecté (Verity *et al.*, 2001).

La transmission est grandement influencée par l'environnement. Effectivement, les spores démontrent une résistance aux désinfectants largement employé dans les établissements de santé, ce qui leur permet de survivre et de persister pendant plusieurs mois, sur des surfaces inanimées. Le voisinage rapproché entre les sujets, l'administration des antibiotiques, retard de diagnostic ou d'instauration des mesures de précaution favorise la transmission de ce germe (Verity *et al.*, 2001).

3.3 Données épidémiologiques

Depuis le commencement des années 2000, la statistique des ICDs a vécu de notables transformations. Un accroissement considérable des occurrences d'ICD graves et l'apparition d'épidémies à vaste envergure ont été initialement constatés en Amérique du Nord de 30 à 120 pour 100 000 personnes par années (O'Connor *et al.*, 2009 ; Pépin *et al.*, 2004). Ces épidémies ont été liées à la survenue d'un clone de PCR-ribotype 027 rare jusqu'alors. Il s'est rapidement répandu dans de nombreux établissements hospitaliers européens, en particulier dans la région nord de la France, où l'épidémie initiale a été rapportée en 2006 avec 3,6 cas pour 10.000 journées hospitalières. Ce ribotype s'est propagé sur toutes les régions de la France et reste à ce jour endémique dans les Structures de soins de santé du Nord (Eckert *et al.*, 2013).

En Europe, ce ribotype demeure le plus souvent trouvé (18% des souches identifiées) (Davies *et al.*, 2016). L'étude nationale menée en 2009 a démontré que la survenue des ICD dans les structures de soins et de santé françaises était de 2,28 pour 10000 journées d'hospitalisation (Eckert *et al.*, 2013).

En 2013, une augmentation observée de 3,6 pour 10000 journées d'hospitalisation a été signalée en France selon EUCLID, qui était inférieur par rapport à la moyenne européenne avec 7,9 pour 10000 journées d'hospitalisation.

Systématiquement l'impact des ICD ne cesse de prendre des valeurs importantes depuis une décennie (Barbut *et al.*, 2015). Cette augmentation est certainement due à une réelle hausse des ICDs mais de même à l'optimisation des techniques de diagnostic et à la prudence considérable exécuté par les professionnels de santé, qui recommandent plus régulièrement la recherche de *C. difficile* en présence de diarrhées nosocomiales (Barbut *et al.*, 2015). Une mortalité de 3%, l'équivalent de 3700 morts par an.

Les ICDs ont un impact financier important. En 2013, le coût moyen par épisode d'ICD en France a été évalué à 9 024 € (Monnier *et al.*, 2015).

4. Manifestations cliniques et récidives

4.1 Manifestations cliniques

Après l'implantation du *C. difficile* dans le tractus gastro-intestinal, l'individu peut soit demeurer sans symptômes, soit présenter des manifestations cliniques de l'ICD (**Pantaléon, 2015**).

4.1.1 Portage asymptomatique

La prévalence du portage asymptomatique est de 2 jusqu'à 3 % chez les individus adultes (également observé chez les enfants âgés de plus de 2 à 3 ans). Ce portage sans symptômes est plus élevé chez les sujets résidant dans les établissements médicaux, atteignant un taux compris entre 5 % et 11 % (Alasmari *et al.*, 2014 ; Hedge *et al.*, 2008). Contrairement au Nouveau-né (âgés de moins de 2 ans), La prévalence du portage est très importante estimée à environ 70 % (reste inexplicable jusqu'à ce jour) (Rousseau *et al.*, 2011).

Des hypothèses ont été proposées à ce sujet, à titre d'exemple, la présence d'une microflore qui entrave la production ou neutralise les toxines, ainsi qu'un système gastro-intestinal peut

développé ou qui ne possède pas encore de récepteurs pour les deux toxines A et B (Carter *et al.*, 2010).

4.1.2 Diarrhée simple

Le sujet souffre de selles liquides le plus souvent sans symptômes cliniques généraux d'infection. Le rétablissement du sujet est constaté dans 25 % des cas après deux à trois jours de l'interruption de l'antibiothérapie responsable (Barbut *et al.*, 2004).

La diarrhée bénigne est la forme d'ICD la plus fréquemment constatée en société. L'admission à l'hôpital des patients est nécessaire dans les situations les plus critiques (Khanna *et al.*, 2012).

4.1.3 Colite pseudomembraneuse et complications

Dans 10 % des situations d'ICD, le patient présente des symptômes cliniques de CPM. Les manifestations observées sont une diarrhée liquide et abondante dépourvue de sang, accompagnée de fièvre (dans 75 % des cas) et de douleurs abdominales (dans 70 % des cas) (Barbut *et al.*, 2004 ; Hedge *et al.*, 2008). On observe souvent chez les patients une perte d'appétit, des nausées, une augmentation du nombre de globules blancs, un taux élevé de protéine C réactive ainsi qu'un taux d'albumine réduit (Hedge *et al.*, 2008).

La détection d'une CPM se fait par une endoscopie qui repère la présence de lésions jaunâtres aphtoïdes particulière sur la muqueuse. Ces lésions peuvent être dispersées ou regroupées selon la phase de la maladie. Les pseudomembranes sont composées de débris cellulaires, de mucus, de fibrine et de globules blancs (Barbut *et al.*, 2004). Dans certains cas, il peut y avoir des complications telles que la perforation du côlon ou le mégacôlon toxique. Ces deux complications graves, parfois mortelles pour les sujets, nécessitent une intervention chirurgicale d'urgence (Bauer *et al.*, 2009). Dans ces cas extrêmes, on parle de colite fulminante.

Le taux de mortalité des ICD est 4 %, mais il peut arriver jusqu'à 35 à 50 % dans les cas de CPM les plus graves (Barbut *et al.*, 2004). Dans de rares cas, l'ICD peut s'étendre au-delà du côlon. Effectivement, des manifestations extra-coliques peuvent être détectées (Jacobs *et al.*, 2001). D'autres affections causées par *C. difficile* ont été évoquées, y compris des bactériémies et des abcès viscéraux (Abdelghani *et al.*, 2010).

4.2 Récidives

L'une des caractéristiques de l'ICD est sa propension à récidiver, ce qui constitue la principale préoccupation des cliniciens et des patients. Effectivement, un patient qui a été

efficacement traité, autrement dit avec disparition de toute manifestation clinique, est apte de faire une récurrence dans les deux mois ou trois mois qui suivent l'interruption du traitement (Barbut *et al.*, 2004). Avec un taux de 20 % à la suite d'une première infection, et 50 % à la suite d'une première récurrence (Valiente *et al.*, 2014).

Certains facteurs tels que la poursuite d'une antibiothérapie ou une hospitalisation prolongée et un âge supérieur à 65 ans augmentent le risque de faire des récurrences (Aslam *et al.*, 2005). Dans 50% des cas de rechutes, la souche est la même (souche originale). L'autre moitié des cas de récurrence est liée à une souche externe (Barbut *et al.*, 2004). Les récurrences peuvent se produire plusieurs fois sur une période pouvant s'étendre sur plusieurs années (Bartlett, 1996).

5. Diagnostic et identification au laboratoire

Au laboratoire, le dépistage et l'identification de *C. difficile* revêtent une importance capitale dans la détection et la confirmation des infections causées par cette bactérie (Salas, 2020).

Un diagnostic précis de *C. difficile* est indispensable pour orienter le traitement approprié et mettre en place des mesures de prévention et de contrôle de l'infection. Les laboratoires utilisent diverses techniques et méthodes pour détecter et identifier *C. difficile*. Une identification précise de *C. difficile* au laboratoire permet de prendre des décisions éclairées sur la gestion des infections liées à cette bactérie et contribue à la sécurité des patients dans les établissements de soins de santé (Czepiel *et al.*, 2019). Cela est réalisé grâce à l'algorithme de diagnostic en cas de suspicion d'ICD qui représente un outil essentiel pour guider les professionnels de santé dans l'évaluation et la confirmation des cas suspects de CDI (Sambri *et al.*, 2020).

Au fil du temps, les directives et recommandations ont évolué pour refléter les avancées scientifiques et les meilleures pratiques en matière de diagnostic de la CDI. L'adoption d'un algorithme de diagnostic approprié peut permettre une identification rapide et précise des cas de CDI (Figure 7), minimisant ainsi les tests inutiles et optimisant l'utilisation des ressources disponibles, tout en assurant une prise en charge efficace et efficiente des patients suspectés d'être atteints de cette infection nosocomiale (Rancich & Roman, 2019).

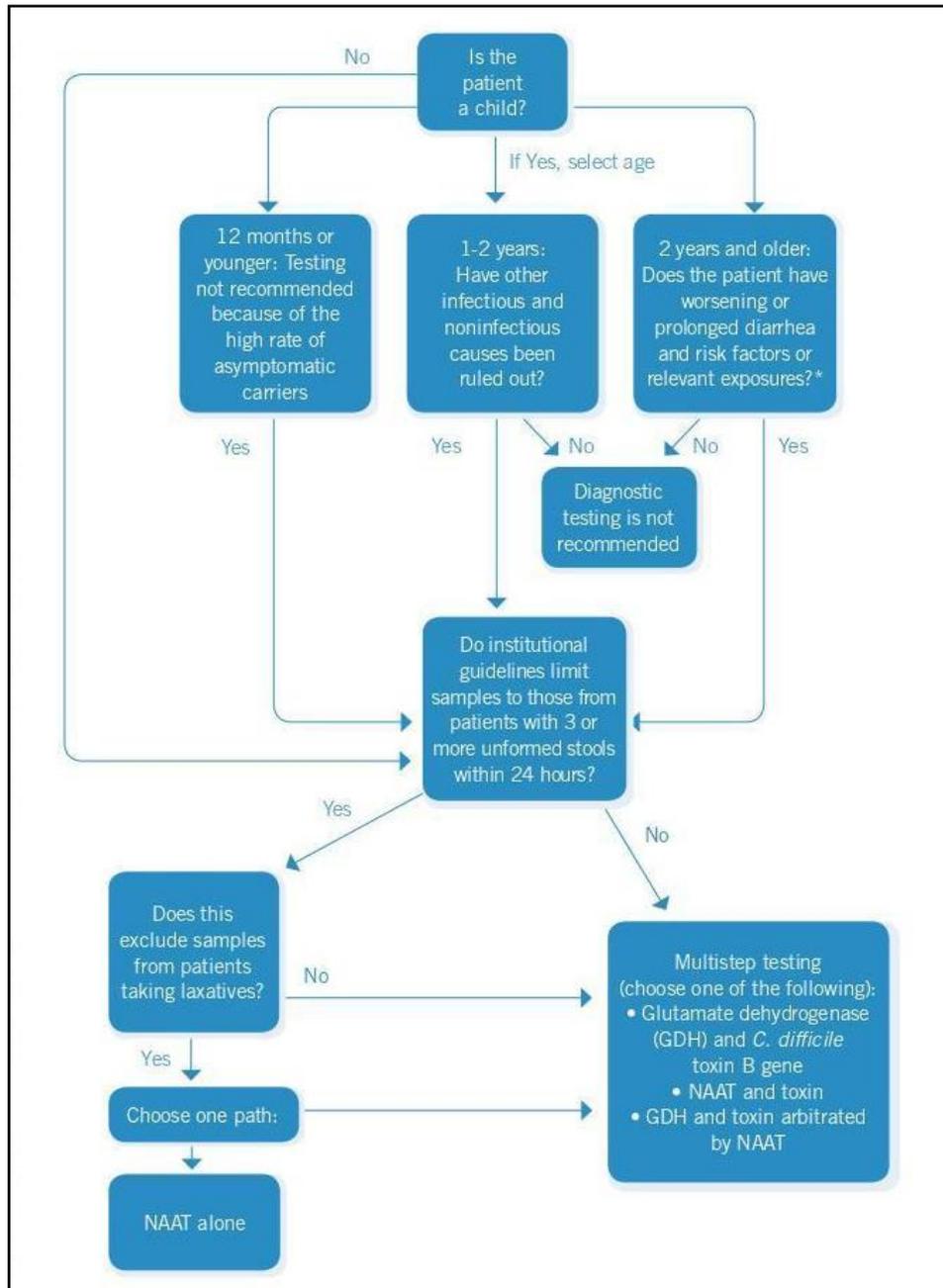


Figure 7 : Algorithme universel de dépistage pour les cas présumés d'ICD (Rancich & Roman, 2019)

5.1 Diagnostic clinique

Il est essentiel de détecter la présence de *C. difficile* après apparition des signes de diarrhées intenses et non structurés (occasionnellement hémorragique), avec une fréquence d'au moins trois selles diarrhéiques par jour, après l'utilisation ou non d'antibiotiques ou de laxatifs, ainsi qu'en présence de fièvre supérieure à 38°C, douleurs abdominales et altération de l'état général chez des patients à risque tels que les personnes âgées de plus de 65 ans, les immunodéprimés, les insuffisants rénaux, les patients post-chirurgie gastro-intestinale, post-

chimiothérapie anticancéreuse, ou en proximité avec un patient porteur de *C. difficile*, ou alimentés par sonde nasogastrique (Sartelli *et al.*, 2019 ; Chapeton Montes, 2012).

En cas de diarrhée nosocomiale, c'est le seul entéropathogène à rechercher régulièrement. Il est déconseillé de répéter l'examen, sauf en cas d'un premier résultat négatif accompagné d'une forte suspicion d'ICD (Lalande *et al.*, 2004).

5.2 Diagnostic endoscopique

Si les résultats des tests bactériologiques sont négatifs, des tests d'amplification des acides nucléiques (NAAT) sont réalisés en vue de confirmer le diagnostic. Dans certaines situations rares où une suspicion clinique élevée de la maladie persiste malgré des résultats négatifs, une évaluation endoscopique peut être requise (Bassi *et al.*, 2023).

La coloscopie (appelée aussi endoscopie digestive basse) est une procédure diagnostique et thérapeutique utilisée pour évaluer le gros intestin (côlon, rectum, anus) ainsi que l'iléon terminal de l'intestin grêle. Elle utilise un coloscope, un dispositif flexible équipé d'une caméra haute définition à son extrémité, ainsi que de canaux pour insérer des équipements et des liquides de nettoyage (Stauffer & Pfeifer, 2023).

Cet examen peut servir à des fins diagnostiques pour détecter diverses affections gastro-intestinales, comme les polypes, les tumeurs, les pseudomembranes et les saignements, et peut également être utilisé à des fins thérapeutiques, notamment pour l'ablation de polypes ou la réalisation de biopsies de tissus (Figure 8) (Lawson-Ananissouh *et al.*, 2014).

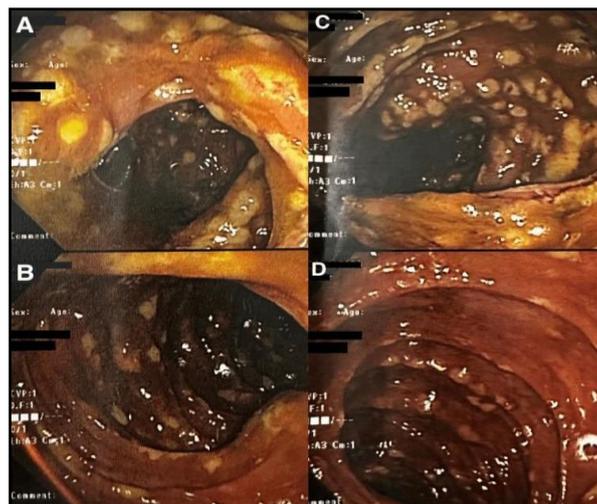


Figure 8 : Formation diffuse de pseudomembranes dans tout le côlon révélée par coloscopie. (A) et (B) côlon transverse, (C) et (D) côlon ascendant (Bassi *et al.*, 2023)

5.3 Diagnostic histopathologique

La photomicrographie d'une CPM révèle des caractéristiques pathologiques distinctes au niveau microscopique. On peut observer des pseudomembranes formées par des nodules ou des plaques aphtoïdes jaunâtres surélevées, parfois hémorragiques, qui se regroupent en une couche étendue à la surface de la muqueuse colique (Chen & Shih, 2011).

Ces pseudomembranes sont composées de matériel nécrotique, de cellules inflammatoires et de fibrine. La muqueuse colique environnante apparaît enflammée, avec des signes d'infiltration inflammatoire, de congestion vasculaire et d'œdème (Chen & Shih, 2011).

Les pseudomembranes peuvent être de taille variable, atteignant parfois jusqu'à 2 cm de diamètre, et sont dispersées de manière diffuse parmi les zones de muqueuse colique normale ou saine. Les pseudomembranes confluentes, couvrant la totalité de la muqueuse colique, sont également observées chez les patients les plus gravement atteints. La photomicrographie permet ainsi d'identifier les caractéristiques histopathologiques spécifiques de la CPM, contribuant ainsi à un diagnostic précis de cette affection inflammatoire du côlon (Figure 9) (Czepiel *et al.*, 2019).

Le test histopathologique implique la préparation d'un échantillon de tissu biologique (habituellement obtenu par biopsie ou résection chirurgicale) et son examen sous microscope. Il permet de mettre en évidence les éléments d'intérêt et de "fixer" l'échantillon dans un état similaire à son état vivant à un moment donné, tout en permettant l'étude de sa morphologie (Czepiel *et al.*, 2019).

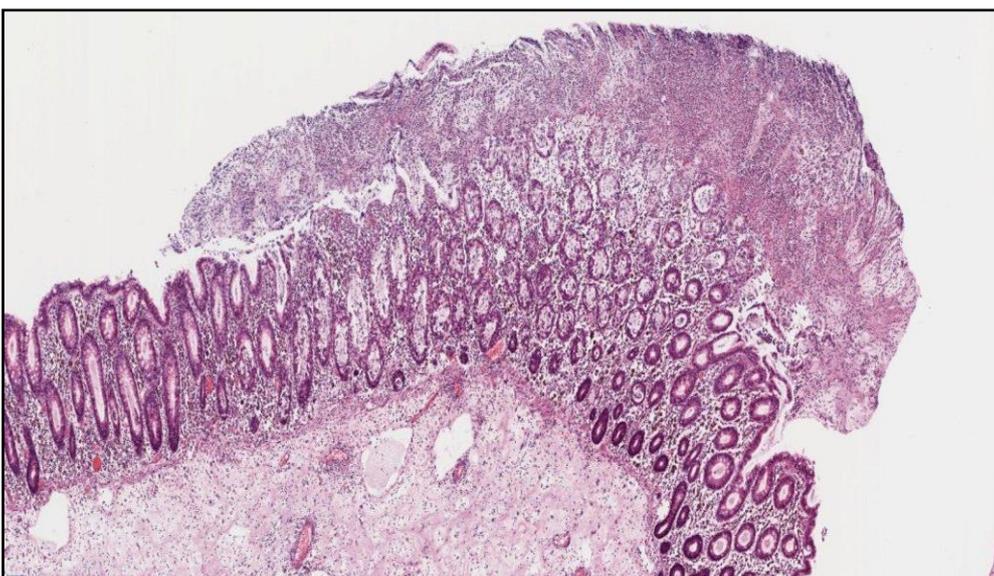


Figure 9 : Formation d'une pseudomembrane colique visualisée par photomicrographie (Coloration H&E, Gr : X 200) (Perez Bouza, 2022)

5.4 Diagnostic bactériologique

La première étape du diagnostic bactériologique consiste à recevoir les échantillons de selles, qui doivent être d'une consistance diarrhéique (non formé) ou molle, dans des récipients hermétiques préalablement stériles, et transportés à +4°C au laboratoire pour assurer leur transport (Lalande *et al.*, 2004). Les prélèvements doivent être accompagnés d'une fiche de renseignement remplie (voir annexe 1).

Pour une identification ultérieure, ces échantillons doivent être stockés dans des conditions appropriées, à une température de -20°C (Lalande *et al.*, 2004). La figure 10 montre le schéma global des méthodes employées au laboratoire pour diagnostiquer les infections causées par *C. difficile*.

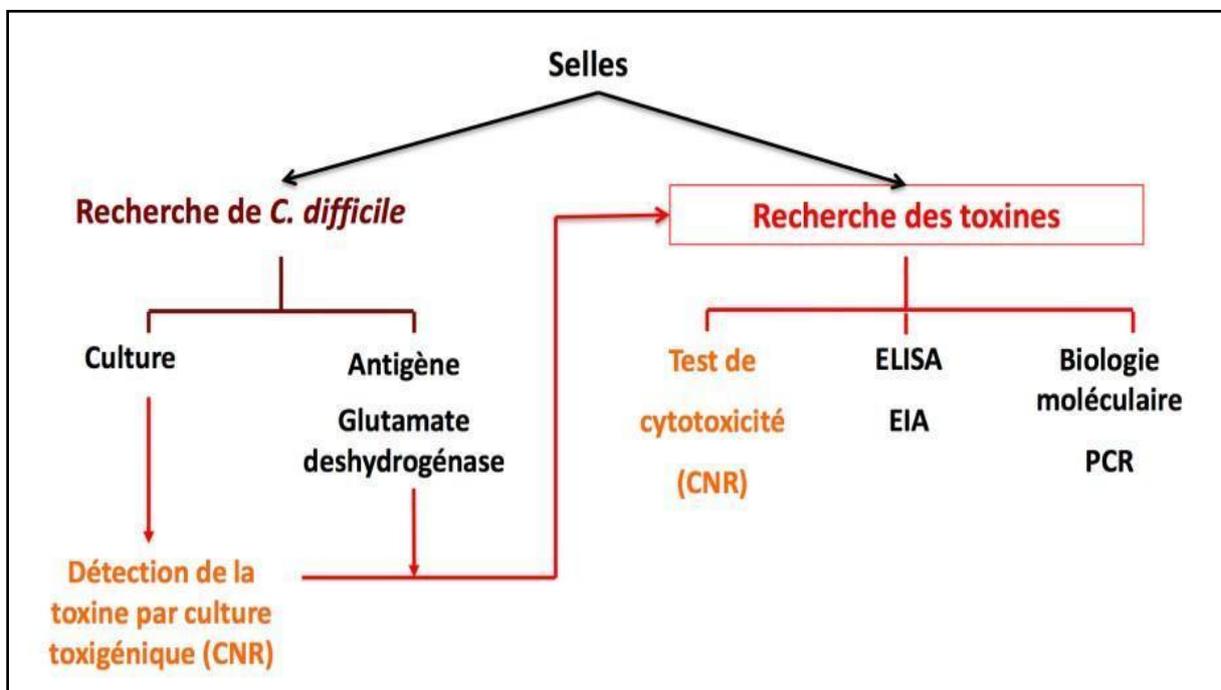


Figure 10 : Schéma global des méthodes employées au laboratoire pour diagnostiquer les infections causées par *C. difficile* (Salas, 2020)

5.4.1 La mise en évidence du germe

5.4.1.1 Test de glutamate déshydrogénase (GDH)

C. difficile se caractérise par une enzyme particulière, la glutamate déshydrogénase. Il est possible de détecter sa présence directement à partir de la matière fécale diluée du sujet suspect, en utilisant soit la méthode immunoenzymatique (EIA) (avec une sensibilité importante pouvant atteindre jusqu'à 93%), soit la technique d'agglutination de particules de latex (moins sensible) (Figure 11) (Lalande *et al.*, 2004).

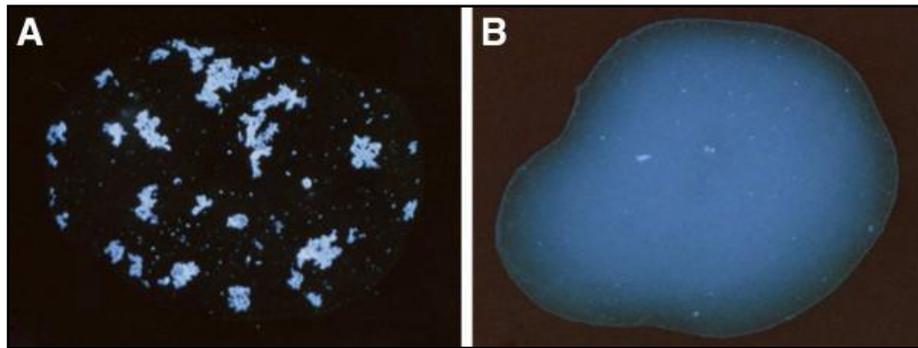


Figure 11 : Test d'agglutination de latex : (A) représente une réaction positive d'agglutination, (B) représente une réaction négative (aspect lisse de couleur blanche) (Ortika *et al.*, 2013)

Un test positif de GDH indique la détection de l'ensemble des souches de *C. difficile* qu'elles soient toxigènes ou non-toxigènes (Xiao *et al.*, 2019). Le test GDH est par conséquent peu spécifique et de même l'existence de plusieurs croisements de réactions avec d'autres germes anaérobies producteurs de glutamate déshydrogénase comme *Clostridium sordellii* et *Clostridium bifermentans* (Figure 12) (Barbut *et al.*, 2013).



Figure 12 : Illustration d'un test de détection de la GDH (Salas, 2020)

5.4.1.2 Isolement et identification de *C. difficile*

a) Technique d'isolement

Le but principal consiste à isoler les souches de *C. difficile* susceptibles d'être impliquées dans l'infection. Pour réduire la microflore fécale dispensable, il est possible de traiter les selles diarrhéiques par chauffage ou par choc à l'alcool après dilution. Cette considération est particulièrement importante lors de l'utilisation d'un milieu de culture qui n'est pas sélectif (Salas, 2020).

Étant donné l'exigence particulière de *C. difficile*, la culture de ce germe est effectuée sur le milieu CCFA ou CCA additionnés de sang de mouton ainsi qu'aux facteurs de germination. Une durée d'incubation allant de 24 heures jusqu'à 48 heures à une température de 37°C et dans des conditions totalement dépourvues d'oxygène sont recommandés (Wilcox & Miller, 2015).

Une quantité de 0,1% de taurocholate de sodium et de glycine constituent deux éléments favorables pour la germination des spores de *C. difficile* (Lalande *et al.*, 2004 ; Ramirez *et al.*, 2010). Étant donné que ce germe est résistant à le lysozyme, il dépend aussi de cette dernière pour déclencher ce processus à une concentration de 0,2 mmol.L⁻¹ (Kaus *et al.*, 2020 ; Chai *et al.*, 2017).

b) Technique d'identification macroscopique et microscopique

Les colonies obtenues après 24 heures d'incubation ont un diamètre de 2 à 4 mm, qui augmente à 8 jusqu'à 12 mm après 48 heures. Circulaires, plates et possèdent des bords irréguliers. Elles peuvent être de couleurs blanches, jaunes ou grises et ne sont pas hémolytiques. Pour détecter cette bactérie, cinq critères morphologiques spécifiques sont pris en considération : son métabolisme anaérobie, son odeur caractéristique similaire à celle du crottin de cheval, un aspect de verre brisé de ses colonies observé sous microscope binoculaire, sa fluorescence vert chartreuse sous lumière UV à 360 nm (Figure 13). sa coloration de Gram et son aspect morphologique (coloration Gram positif (+), forme bacillaire avec présence d'une spore subterminale ou terminale pas trop déformante) (Lalande *et al.*, 2004).

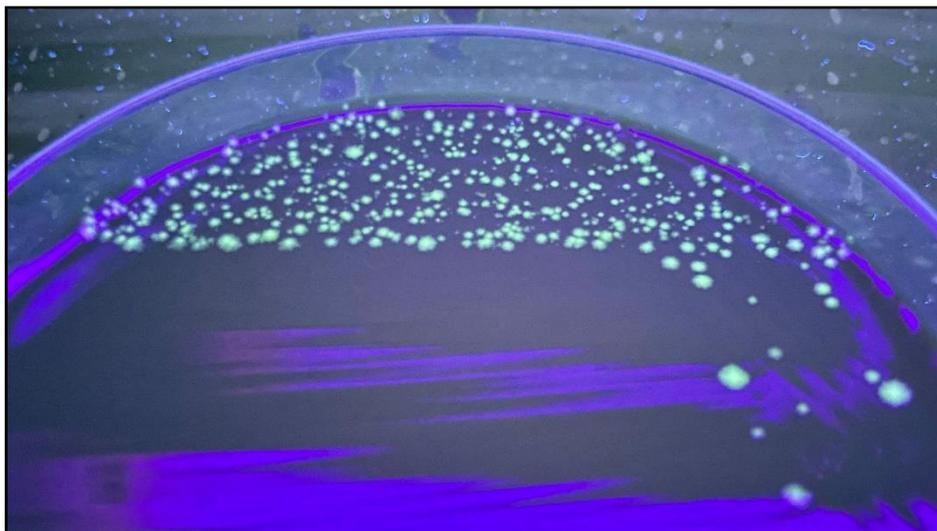


Figure 13 : Colonies de *C. difficile* fluorescentes sous ultra-violet de couleur vert chartreuse (Le Guern & Wallet, 2013)

c) Identification par techniques biochimiques

La chromatographie en phase gazeuse des acides gras volatils de ce germe ainsi que l'emploi des galeries biochimiques classiques ou miniaturisées telles que les galeries API® 20 A ou Rapid® ID 32A peuvent être efficaces pour la réalisation d'une identification décisive de *C. difficile* (Lalande *et al.*, 2004).

La galerie biochimique miniaturisée API® 20A est un panneau en plastique qui contient 20 cupules, dont chacune contient des substrats sous forme déshydratés, procurent la capacité d'établir 21 réactions biochimiques colorées, impliquant l'indole, l'uréase, la catalase, la liquéfaction de la gélatine, l'esculine et la fermentation des sucres tel que le glucose, le mannitol, le lactose, le saccharose, le maltose, la salicine, le xylose, l'arabinose, le glycérol, le cellobiose, le mannose, le mélézitose, le raffinose, le sorbitol, le rhamnose et le tréhalose. L'incubation de ce type de galerie est effectuée pendant 24 heures jusqu'à 48 heures en atmosphère anaérobie à une température de 35 °C (Karachewski *et al.*, 1985).

La galerie biochimique Rapid® ID 32A est un panneau en plastique composée de 32 puits miniaturisés dont 29 d'entre elles contiennent des substrats déshydratés pour les tests biochimiques suivants : Uréase (URE), Dihydrolase d'arginine (ADH), α -galactosidase (α GAL), β -galactosidase (β GAL), β -galactosidase 6-phosphate (β GP), α -glucosidase (α GLU), β -glucosidase (β GLU), α -arabinosidase (α ARA), β -glucuronidase (β GUR), β -N-acétylglucosaminidase (β NAG), la fermentation du mannose (MNE), du raffinose (RAF), décarboxylase de l'acide glutamique (GDC), α -fucosidase (α FUC), réduction des nitrates (NIT), l'indole (IND), phosphatase alcaline (PAL), arylamidase d'arginine (ArgA), arylamidase de proline (ProA), arylamidase de leucyl glycine (LGA), arylamidase de phénylalanine (PheA), arylamidase de leucine (LeuA), arylamidase d'acide pyroglutamique (PyrA), arylamidase de tyrosine (TyrA), arylamidase d'alanine (AlaA), arylamidase de glycine (GlyA), arylamidase d'histidine (HisA), arylamidase d'acide glutamyl-glutamique (GGA) et arylamidase de sérine (SerA). Les puits sont inoculés suivant les instructions du fabricant, l'incubation de ce type de galerie est effectuée pendant 04 heures jusqu'à 05 heures en atmosphère aérobie à une température de 37 °C (Downes *et al.*, 1999).

5.4.1.3 Culture toxigénique : Recherche d'un effet cytopathique à partir de la culture bactérienne suspectée

La culture toxigénique est une méthode très sensible et spécifique pour diagnostiquer l'ILCD, bien qu'elle soit lente. Elle présente une valeur prédictive positive d'environ 95 % et

une valeur prédictive négative d'environ 98 % (Lalande *et al.*, 2004). Près d'un tiers des souches de *C. difficile* isolées chez des patients ayant un test de cytoxicité des selles négatif sont tout de même toxigènes in vitro. Environ 10 % des cas de diagnostic d'ILCD reposent exclusivement sur la culture toxigénique (Lalande *et al.*, 2004).

5.4.2 La mise en évidence des toxines

5.4.2.1 Test de cytototoxicité : Recherche d'un effet cytopathique à partir d'un filtrat stérile de selles

C'est une technique utilisée pour détecter la présence de la toxine B produite par *C. difficile* qui est d'une puissance cytotoxique mille fois plus élevée que celle de la toxine A (Figure 14) (Lalande *et al.*, 2004). Elle consiste à filtrer les selles afin d'obtenir un échantillon stérile, puis à l'incuber en contact direct avec des cellules en culture pendant 24 heures à 48 heures à une température de 37°C et en atmosphère anaérobie (Lalande *et al.*, 2004). Il est possible d'utiliser différentes lignées cellulaires, telles que des cellules rénales (AGMK, BHK21, VERO), des cellules fibroblastiques humaines ou animales (MRC-5, L929, WI38), des cellules MacCoy, CHO, Hep-2 ou Hela (Lalande *et al.*, 2004). Un résultat positif est confirmé par une ouverture des jonctions serrées, détachement et ballonnisation des cellules (Lalande *et al.*, 2004).

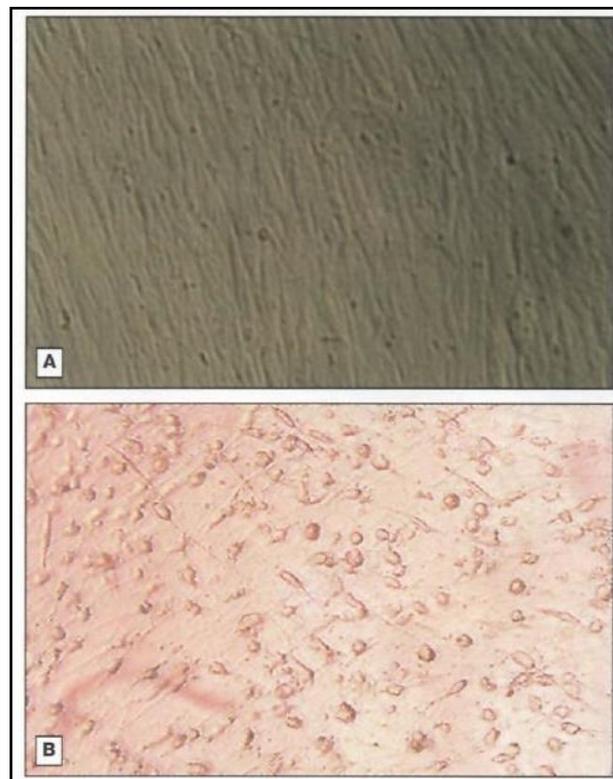


Figure 14 : Test de cytototoxicité (CNR) : (A) Culture de cellules embryonnaires humaines (MRC-5), (B) effet cytopathique associé à *C. difficile* (Gr : X 200) (Lalande *et al.*, 2004)

5.4.2.2 La méthode immuno-enzymatique ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*)

L'ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) est une technique d'analyse immunologique qui permet de détecter la présence d'une substance protéique spécifique dans un échantillon biologique, il existe 4 types d'ELISA différentes : l'ELISA directe, l'ELISA indirecte, l'ELISA sandwich (Figure 15) et l'ELISA compétitive (Matson, 2023).

L'ELISA "sandwich" est l'une des techniques ELISA les plus utilisées au laboratoire pour l'identification et la quantification d'un antigène spécifique libre dans un échantillon. Cette technique est fondée sur la formation d'un "sandwich" entre l'anticorps de capture fixé dans le puit, l'antigène visé (les toxines A et B) et un anticorps attaché à une peroxydase (HRP) (Lall *et al.*, 2017). Un résultat positif se traduit par la formation de ce "sandwich", une hydrolyse du substrat ajouté entraîne l'émergence d'une fluorescence ou un changement de couleur qui peut être repéré en densité optique (DO) ou en unités relatives de lumière (URL).

Si une solution de transfert précipitant est employée, le changement peut être ainsi observé de manière visuelle (Matson, 2023).

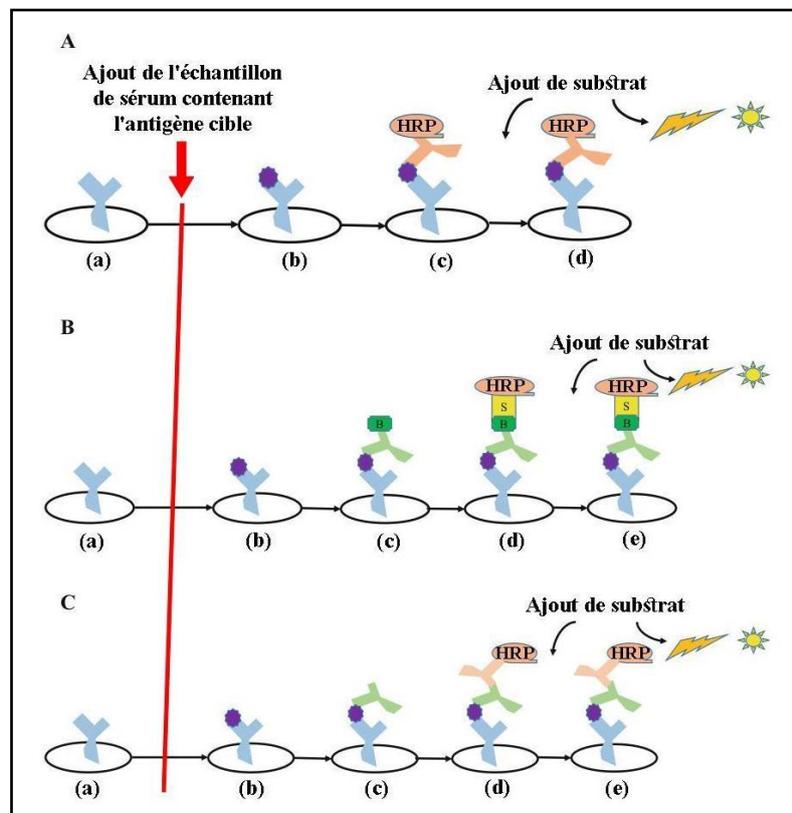


Figure 15 : Illustrations schématiques de la technique ELISA sandwich. (a) L'anticorps de capture est lié dans chaque puit de la plaque ELISA. (b) la substance cible (en violet) se lie à l'anticorps de capture. (c) Un anticorps accroché à une enzyme de peroxydase de raifort (HRP) est ajouté et se lie à la substance

cible liée à l'anticorps de capture, formant ainsi un "sandwich", suivi de l'ajout du substrat qui subit une hydrolyse enzymatique (comme décrit dans la partie "A" de la figure 16), ou un anticorps de détection biotinylé est ajouté, qui se lie à l'antigène cible lié à l'anticorps de capture, formant ainsi un "sandwich" (comme décrit dans la partie "B" de la figure 16), ou un anticorps primaire est ajouté qui se lie à l'antigène cible lié à l'anticorps de capture, formant ainsi un "sandwich" (comme décrit dans la partie "C" de la figure 16). (d) La streptavidine-peroxydase de raifort (S-HRP) est par la suite incorporé et s'attache à l'anticorps biotinylé (comme décrit dans la partie "B" de la figure 16), ou un anticorps secondaire accroché à une HRP qui se lie à l'anticorps primaire est ajouté (comme décrit dans la partie "C" de la figure 16). (e) La dégradation enzymatique du substrat ajouté lors de l'étape suivante conduit à un changement de couleur pouvant être mesuré à l'aide d'un luminomètre en unités relatives de lumière (URL), d'un spectrophotomètre en densité optique (DO), ou bien par observation visuelle du précipité formé si une solution de transfert précipitant est employée (Matson, 2023)

5.4.2.3 Détection des gènes des toxines A et B par les techniques de biologie moléculaire (PCR)

La PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase) est une technique très sensible et spécifique qui permet de détecter la présence d'un marqueur génétique caractéristique à partir d'une petite quantité d'un échantillon. L'identification par PCR est largement utilisée en bactériologie clinique et en biologie moléculaire pour détecter la présence de *C. difficile*, déterminer son génotype, identifier les mutations génétiques, diagnostiquer les maladies plus tôt et identifier les patients atteints de d'ICD avant même que des complications n'apparaissent (Novakova *et al.*, 2021).

Il est possible de détecter directement à partir d'échantillons de selles les gènes *tcdA* et *tcdB* chromosomiques, qui codent pour les toxines A et B respectivement de *C. difficile* grâce à la PCR en temps réel (Deshpande *et al.*, 2011). Ce type de PCR se déroule en plusieurs étapes : tout d'abord, l'ADN génomique ou l'ADN brut extrait d'échantillons de selles est purifié, puis une amplification multiplex est réalisée en utilisant des amorces spécifiques pour les gènes *tcdA* et *tcdB*. Deux sondes moléculaires portant des fluorophores différents sont utilisées comme sondes internes spécifiques pour chaque type d'amplicon. La composition ainsi que les conditions et concentrations des réactifs sont variables suivant la littérature du Kit utilisé. D'une façon générale, les amorces et les sondes spécifiques pour les toxines A et B sont ajoutées au mélange de réaction de PCR, ainsi que les nucléotides (dNTPs), la Taq polymérase, le tampon de réaction, le MgCl₂ et l'ADN génomique purifié (Bélanger *et al.*, 2003).

La méthode de PCR en temps réel développée est plus performante que le test de cytotoxicité pour la détection des toxines A et B, qui est considérée comme "*gold standard*" (Bélanger *et al.*, 2003).

6. Traitements thérapeutiques

Une bonne prise en charge de l'ICD dépend de la rapidité et de la précision du diagnostic (Sartelli *et al.*, 2019). Les premières étapes à suivre consistent à réhydrater le patient et à suspendre l'administration de l'antibiotique, ou à le remplacer par un autre présentant un risque moindre. La récupération rapide du microbiote intestinal et de son rôle de bouclier protecteur est essentielle pour assurer la guérison des patients (Freney *et al.*, 2019). Dans 25 % des cas, ces mesures basiques engendrent une amélioration clinique satisfaisante. Toutefois, si l'antibiotique à l'origine de l'infection ne peut pas être interrompu ou modifié, ou si les manifestations cliniques persistent, il est impératif de démarrer un traitement plus spécifique (Freney *et al.*, 2019).

6.1 Traitement antibiotiques

Il existe trois agents antibiothérapeutiques pour traiter les ICD : la fidaxomicine (n'est pas disponible en Algérie), la vancomycine et le métronidazole. La sélection de la molécule la plus adaptée dépend de l'état clinique du patient (Freney *et al.*, 2019).

En règle générale, le métronidazole (500 mg, 3 fois par jour, par voie orale et pendant 10 jours) est administré spécifiquement pour les cas d'ICD non graves, tandis que la vancomycine (125 mg, 4 fois par jour, pendant 10 jours) ou la fidaxomicine (200 mg, 2 fois par jour, pendant 10 jours) sont plutôt recommandées pour les cas sévères de la maladie ou pour les patients qui présentent un risque élevé de récurrence (Freney *et al.*, 2019).

6.2 Transplantation fécale

Selon les dernières directives européennes, la transplantation de microbiote fécal est une solution thérapeutique recommandée pour traiter les récurrences multiples de manière efficace, avec un taux de réussite satisfaisant de plus de 90% (Freney *et al.*, 2019).

6.3 Bactériophages

Il est envisageable d'utiliser un cocktail de bactériophages spécifiques, qui sont des virus ciblant spécifiquement les bactéries, pour traiter les patients atteints d'ICD, sans altérer leur barrière de microbiote intestinal. Ce traitement pourrait également être utilisé à titre préventif lors d'une épidémie causée par une souche de *C. difficile* connue (Le Guern, 2012).

6.4 Traitement chirurgical

Un Traitement chirurgical s'impose en urgence en cas de mégacôlon toxique qui est une complication grave et potentiellement mortelle de l'ICD, avec un taux de mortalité élevé entre 32 et 50% (Halvorson *et al.*, 2006)

Cette affection se caractérise par une distension colique majeure accompagnée de diarrhées ou d'un iléus, et peut entraîner des complications telles qu'un choc septique et une perforation colique (Halvorson *et al.*, 2006).

7. Traitements préventifs

- Une fois le diagnostic d'ICD posé, le médecin responsable du patient doit immédiatement prescrire des mesures de précaution de type "contact", supplémentaires aux mesures "standard" (Le Guern, 2012)
- Il est conseillé de revêtir une blouse à manches longues accompagnée d'un tablier étanche lors des interactions directes avec le patient, ses excréments ou son milieu environnant et de les enlever avant de sortir de son lieu d'hospitalisation (Le Guern, 2012)
- Les solutions hydro-alcooliques ne sont pas efficaces contre les spores de *C. difficile* et donc l'hygiène des mains ne peut pas être assurée uniquement par leur utilisation
- Il est conseillé de se frictionner les mains avec une solution hydro-alcoolique avant de pénétrer dans la pièce, puis de revêtir des gants jetables
- Pour assurer une bonne hygiène des mains, il est conseillé de se débarrasser des gants avant de quitter la pièce, puis de se laver les mains soigneusement avec du savon pour se débarrasser mécaniquement des spores.
- Ensuite, se frictionner les mains avec une solution hydro-alcoolique pour se débarrasser des formes germinatives de *C. difficile* (Le Guern, 2012)
- Il est conseillé de procéder à une désinfection complète du milieu environnant du patient infecté quotidiennement en utilisant une solution de javel diluée à 1/5ème (Le Guern, 2012)
- Trois vaccins à base de toxoïde CD sont en essais cliniques. Bien que prometteurs, ces essais soulignent les limites des vaccins basés uniquement sur les toxoïdes (Razim *et al.*, 2023). Le vaccin Pfizer a réduit la durée et la gravité de la maladie, mais n'a pas prévenu l'infection initiale. Sanofi-Pasteur a abandonné son vaccin après les essais de phase III, tandis que le vaccin VLA84 de Valneva est toujours en cours d'essais cliniques, bien que sa phase III ait été suspendue (Razim *et al.*, 2023).

Matériel et méthodes

L'objectif principal de cette étude est la mise en évidence et la caractérisation de *C. difficile* à partir de selles diarrhéiques des patients soupçonnés d'être infectés par cette bactérie.

Une étude statistique multicentrique a été menée en analysant des données préexistantes provenant des fiches de renseignements médicaux. Un total de 172 prélèvements suspects ont été analysés durant une période qui s'est étalée sur 61 mois (du 1 janvier 2018 au 15 janvier 2023).

Notre stage a été effectué au niveau du laboratoire des "Bactéries Anaérobies et du Botulisme" de l'institut pasteur d'Algérie à Dely-brahim durant une période de 05 mois du 19 février au 15 juin 2023.

1 Diagnostic bactériologique

La détection et la caractérisation précises de *C. difficile* présent dans un échantillon de selle sont indispensables pour établir un diagnostic précis et élaborer un plan de traitement adapté. Ce processus d'identification peut inclure plusieurs étapes, telles que : la mise en culture, identification par tests biochimiques, étude de la sensibilité aux antibiotiques et les techniques de biologie moléculaire.

1.1 Mise en évidence du germe

1.1.1 Préparation du milieu de culture

Pour préparer le milieu de culture, commencer par faire fondre la gélose columbia dans de l'eau bouillante. Ensuite, laisser le mélange refroidir jusqu'à ce qu'il atteigne une température de surfusion comprise entre 45°C et 50°C. Ajouter ensuite 5% à 10% de sang de mouton à la gélose columbia tout en maintenant des conditions d'asepsie rigoureuses. Pour homogénéiser le mélange sans créer de bulles d'air, effectuer délicatement des mouvements rotatoires sur le flacon placé sur la paillasse. Avant de verser le milieu de culture dans les boîtes de Pétri, ajouter une goutte de lysozyme dans la moitié des boîtes et laisser les autres boîtes vides. Une fois le milieu de culture écoulé, éliminer les bulles d'air à l'aide du bec Bunsen. Enfin, pour le séchage, placer partiellement ouvertes les boîtes de Pétri dans une armoire de séchage.

NB : L'ajout d'une goutte de lysozyme est limité aux boîtes de Pétri utilisées pour l'isolement à partir des suspensions de selle diluées.

1.1.2 Préparation de la suspension bactérienne (dilution des selles) et traitement

Ajouter 10 ml d'eau distillée stérile dans un tube à essai stérile tout en maintenant les conditions d'asepsie. Ensuite, ajouter 2 à 3 ml (5 à 6 gouttes) de selle diarrhéique dans le même tube à essai. Homogénéiser la suspension en l'agitant vigoureusement avec un vortex. Puis,

chauffer la suspension de selle à 80°C pendant 10 minutes afin de sélectionner les spores. Prélever ensuite 0.75 ml de la suspension chauffée dans un autre tube à essai stérile et ajouter 0.25 ml de thioglycolate de Sodium (1M). Ajouter une goutte de NaOH (1N) pour ajuster le pH à 10. Enfin, chauffer la suspension de selle à 50°C pendant 30 minutes.

1.1.3 Mise en culture de la suspension de selles diluée et traitée

Pour réaliser l'ensemencement bactérien, il faut prélever une goutte de la suspension bactérienne de manière aseptique à l'aide d'une pipette pasteur. Ensuite, déposer cette goutte près de la surface interne de la boîte de culture. Ensemencer la goutte déposée en effectuant des stries serrées en quatre quadrants à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Après cela, placer les boîtes de Pétri ensemencées et renversées à l'intérieur d'une jarre d'anaérobiose. Introduire des catalyseurs dans la jarre d'anaérobiose, puis la sceller hermétiquement. Connecter la jarre d'anaérobiose au générateur d'atmosphère anaérobie (Anoxomat®) afin de créer une atmosphère anaérobie composée de N₂, CO₂ et H₂. Ensuite, incuber la jarre d'anaérobiose à 37°C pendant 48 heures. En parallèle, incuber d'autres échantillons en aérobiose avec une atmosphère contenant de l'oxygène (+ O₂).

1.1.4 Préparation des frottis bactériens

En maintenant les conditions d'asepsie, introduire précautionneusement 5 à 6 gouttes d'eau physiologique dans un tube à essai stérile. En utilisant une pipette pasteur stérile, prélever 2 ou 3 colonies de la boîte de pétri et les transférer dans le tube à essai. Agiter vigoureusement avec un vortex pour homogénéiser la suspension bactérienne. Déposer une goutte de la suspension bactérienne sur une lame préalablement dégraissée à l'aide d'une pipette pasteur, puis étaler uniformément en effectuant des mouvements circulaires du centre vers l'extérieur. Sécher la lame en la plaçant dans une armoire de séchage ou à l'air libre. Fixer le frottis en effectuant trois (03) passages sur la flamme du bec bunsen à l'aide d'une pince.

1.1.5 Coloration au bleu de méthylène

Déposer quelques gouttes de bleu de méthylène sur le frottis fixé et laisser agir pendant cinq (05) minutes. Ensuite, jeter l'excès de colorant et rincer brièvement avec de l'eau du robinet. Sécher la lame en utilisant un papier buvard. Enfin, ajouter une goutte d'huile à immersion sur le frottis, puis procéder à l'observation sous microscope en immersion à un grossissement X100.

1.1.6 Coloration de GRAM

Déposer quelques gouttes de violet de gentiane sur un frottis fixé et laisser agir pendant une minute. Ensuite, éliminer l'excès de colorant et rincer brièvement à l'eau du robinet. Effectuer un mordantage au lugol sur le frottis fixé et laisser agir pendant une minute. Enlever l'excès de lugol et rincer brièvement à l'eau du robinet. Procéder à la décoloration du frottis fixé en utilisant de l'alcool éthylique et laisser agir pendant 15 à 30 secondes. Éliminer l'excès d'alcool éthylique et rincer abondamment avec de l'eau du robinet pour stopper la décoloration. Ensuite, réaliser la recoloration du frottis fixé en utilisant de la fuchsine et laisser agir pendant une minute. Jeter l'excès de fuchsine et rincer brièvement à l'eau du robinet. Sécher la lame en utilisant un papier buvard. Enfin, ajouter une petite goutte d'huile à immersion sur le frottis et procéder à l'observation sous microscope en utilisant un grossissement de X 100.

1.1.7 Tests biochimique : préparation des galeries miniaturisées d'identification

a) Purification de la souche

Prélever une colonie de la culture précédente en prenant les précautions nécessaires pour garantir un environnement stérile à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Ensemencer la colonie prélevée sur une boîte de gélose columbia en effectuant des stries serrées en quatre quadrants. Placer la boîte de pétri ensemencée et renversée à l'intérieur d'une jarre d'anaérobiose. Insérer des catalyseurs à l'intérieur de la jarre d'anaérobiose et la sceller hermétiquement. Effectuer un repiquage (- O₂/ + O₂) pour confirmer le caractère anaérobie. Connecter la jarre d'anaérobiose au générateur d'atmosphère anaérobie (Anoxomat®). Incuber la jarre d'anaérobiose à 37°C pendant 48 heures.

b) Inoculation et lecture de la galerie Rapid® ID 32 A

Prélever la culture obtenue sur la gélose columbia au sang en veillant à maintenir un environnement stérile à l'aide d'un écouvillon stérile, puis disperser la culture dans une ampoule de milieu API® Suspension Medium. Ajuster régulièrement l'opacité de la suspension bactérienne avec un densitomètre jusqu'à ce qu'elle atteigne 4 Mac Farland, et inoculer 55 µl de la suspension bactérienne dans chaque cupule de la galerie à l'aide d'une micropipette P200. Ajouter une (01) goutte d'huile de vaseline dans la cupule URE, et enfin incuber la galerie en aérobie à 36 ± 2°C pendant 4 à 4h30min.

Après incubation et avant lecture :

Pour effectuer les étapes suivantes, il faut ajouter une goutte de réactif FB du test PAL au test SerA, ajouter une goutte de réactif de Kovacs dans la cupule IND, ajouter une goutte de réactif de GRIESS-ILOSVAY dans la cupule NIT, et ajouter une goutte de réactif TRIS dans chaque cupule : PAL, α -GAL, β -GUR et β -GAL.

Lecture :

Remplir la fiche de résultats (Annexe 3) comme suit :

Suivant le tableau de lecture de la galerie **Rapid® ID 32 A** (Annexe 4), mentionner : (+) pour tous résultats positifs, (-) pour tous résultats négatifs et (?) pour les résultats douteux.

Pour déterminer le micro-organisme recherché, il convient de saisir les résultats obtenus dans un logiciel d'identification microbienne en ligne conçu par -UBPM le Lab-. Ce logiciel est accessible via l'adresse <https://lab.upbm.org/identifieur>.

c) Inoculation et lecture de la galerie API® 20 A

Pour obtenir une culture pure à partir de la gélose Columbia au sang, prélever un échantillon à l'aide d'un écouvillon stérile dans un environnement stérile. Ensuite, diluer l'écouvillon dans une ampoule contenant du milieu API® Suspension Medium. Mesurer régulièrement la densité optique de la suspension bactérienne à l'aide d'un densitomètre jusqu'à ce qu'elle atteigne 4 Mac Farland. Ensuite, verser la suspension dans les cupules de la galerie et les remplir. Déposer une goutte d'huile de vaseline dans la cupule IND, puis insérer la galerie inoculée dans une jarre d'anaérobiose. Introduire des catalyseurs dans la jarre d'anaérobiose et la fermer hermétiquement. Connecter la jarre d'anaérobiose au générateur d'atmosphère anaérobie (Anoxomat®). Enfin, incuber la jarre d'anaérobiose à 37°C pendant 48 heures.

Après incubation et avant lecture :

Ajouter une goutte de Xylène et une goutte de Kovacs dans la cupule IND. Ensuite, ajouter une goutte de H₂O₂ dans la cupule GLU ou dans n'importe quelle cupule où le sucre est fermenté. Enfin, ajouter une goutte d'indicateur coloré de pH dans chacune des cupules : MAN, SAL, MNE, MLZ (en cas de doute de lecture).

Lecture :

Suivant le tableau de lecture de la galerie **API® 20 A** (Annexe 6), remplir la fiche de résultats (Annexe 5) comme suit :

- Chaque trait négatif ne donne aucun point
- Chaque trait positif dans la première position du triplet rapporte 1 point
- Chaque trait positif dans la deuxième position rapporte 2 points
- Chaque trait positif dans la troisième position rapporte 4 points
- Calculer la somme des points obtenus pour chaque triplet de la galerie

Se référer au catalogue analytique de la galerie **API® 20 A**, en utilisant le code obtenu afin de pouvoir identifier le microorganisme recherché.

1.2 Mise en évidence des toxines

1.2.1 Recherche des gènes : tcdA et tcdB de *C. difficile* par PCR classique et duplex

1.2.1.1 Extraction de l'Acide désoxyribonucléique (ADN) par méthode d'élution

Pour réaliser l'extraction d'ADN, commencez par ajouter 200 µl de la suspension bactérienne du microorganisme à identifier dans un tube Eppendorf de 1.5 ml, puis ajouter 200 µl de la suspension bactérienne de contrôle (ATCC 9689) dans un autre tube Eppendorf de 1.5 ml. Centrifuger les deux tubes à 8500 rpm pendant 5 minutes et resuspendre le culot de cellules dans 200 µl de Tampon phosphate salin (PBS) dans chacun des deux tubes. Ensuite, ajouter 5 µl de lysozyme dans chacun des deux tubes et incubé les deux tubes à 37°C dans un bain marie pendant 15 minutes.

Ajouter 200 µl de tampon d'extraction dans chacun des deux tubes, suivi de l'ajout de 40 µl de protéinase K. Homogénéiser le mélange de chaque tube avec le vortex et incubé les deux tubes à 70°C dans un bain marie pendant 10 minutes. Ajouter 100 µl d'isopropanol dans chacun des deux tubes et homogénéiser à nouveau. Assembler chacun des deux tubes de filtration ultra-pure avec deux nouveaux tubes Eppendorf de 1.5 ml, puis transférer la mixture homogène de chaque tube Eppendorf dans le réservoir haut de chaque tube de filtration ultra-pure. Centrifuger les deux dispositifs à 13500 rpm pendant une minute, retirer les deux tubes de filtration des deux tubes collecteurs et jeter les deux tubes collecteurs.

Assembler à nouveau chacun des deux tubes de filtration avec deux nouveaux tubes collecteurs. Ajouter 500 µl de tampon d'élimination d'inhibiteurs dans le réservoir supérieur de chacun des deux tubes de filtration et centrifuger à nouveau. Retirer les deux tubes de filtration des deux tubes collecteurs et jeter les deux tubes collecteurs. Assembler les deux tubes de filtration avec deux nouveaux tubes collecteurs et ajouter 500 µl de solution de lavage dans le réservoir supérieur de chaque tube de filtration. Centrifuger à nouveau les deux dispositifs, retirer les

tubes de filtration des tubes collecteurs, et jeter les deux tubes collecteurs. Répéter les mêmes étapes pour ajouter 500 µl de tampon de lavage dans le réservoir supérieur de chaque tube de filtration et centrifuger à nouveau. Jeter les deux tubes collecteurs, assembler les deux tubes de filtration avec deux nouveaux tubes collecteurs, puis centrifuger l'ensemble complet des deux dispositifs pendant 10 secondes à pleine vitesse.

Jetez les deux tubes collecteurs, assembler chaque tube de filtration avec deux nouveaux tubes Eppendorf de 1.5 ml stériles, ajouter 20 µl de tampon d'éluion préchauffé dans le réservoir supérieur de chaque tube de filtration, et centrifuger les deux dispositifs à 13500 rpm pendant une minute. On constate que les deux tubes Eppendorf contiennent à présent l'ADN extrait.

L'extraction de l'ADN a été réalisée en se servant du protocole du Kit d'extraction : *High Pure PCR Template preparation Kit* < Roche >

1.2.1.2 Amplification en Chaîne par Polymérase classique et duplex

a) Mix PCR :

1) Pour PCR classique

- dNTP
- Amorces pour gène tcdA et tcdB
- MgCl₂
- Taq polymérase
- Eau ultra pure
- Tampon PCR

2) Pour PCR duplex

- Master Mix
- GC enhancer
- Deux couples d'amorce pour tcdA et tcdB
- Eau pure

b) Méthode

1) Pour PCR classique

Préparer le Mix PCR (A) en utilisant la formule mentionnée dans l'annexe 7 et préparer le Mix PCR (B) en utilisant la formule mentionnée dans l'annexe 8. Ensuite, vortexer soigneusement tous les réactifs contenus dans les deux tubes Eppendorf. Après cela, répartir le Mix PCR (A) et le Mix PCR (B) dans quatre tubes chacun, en ajoutant 45 µl par tube : un tube

pour le témoin négatif, un tube pour le témoin positif, et deux tubes pour les deux souches à tester. Enfin, ajouter respectivement 5 µl d'eau pure (pour vérifier sa pureté), 5 µl d'extrait d'ADN de l'ATCC (témoin positif) et 5 µl d'extrait des deux souches testées.

2) Pour PCR duplex

Préparer le Mix PCR en suivant la formule mentionnée dans l'annexe 9. Ensuite, vortexez soigneusement tous les réactifs contenus dans le tube Eppendorf. Ensuite, prener 22.5 µl du Mix PCR et répartir le dans chaque tube : 1 tube pour le témoin négatif, 1 tube pour le témoin positif (ATCC 9689) et 2 tubes pour les 2 souches à tester. Ajouter 2.5 µl d'eau pure dans le tube PCR du témoin négatif contenant le mix PCR, puis ajouter 2.5 µl d'extrait d'ADN de la souche de contrôle (ATCC 9689) dans le tube PCR témoin positif contenant le mix PCR. Enfin, ajouter 2.5 µl d'extrait d'ADN des microorganismes à identifier dans les tubes PCR des deux souches à tester contenant le mix PCR.

Ensuite :

Programmer le thermocycleur comme suit :

Dénaturation préliminaire :	94°C pendant 5 minutes	} 35 Cycles
Dénaturation :	94°C pendant 1 minute	
Renaturation :	50°C pendant 1 minute	
Elongation :	72°C pendant 1 minute	
Extension finale :	72°C pendant 10 minutes	

Mettre les tubes PCR individuels dans le thermocycleur, puis appuyer sur “Démarrer” pour initier l’amplification

1.2.1.3 Préparation du gel d’agarose 1.5%

Diluer le tampon TBE (TRIS-Borate-EDTA) 10X au 1/10ème pour obtenir du TBE 1X. Ensuite, pesez 1.5 g de poudre d'agarose ultra-pure et dissolvez-la dans 100 ml de tampon TBE 1X. Utiliser un appareil microonde pour faire fondre la solution tout en l'agitant délicatement et régulièrement, puis laissez-la refroidir légèrement. Ajoutez 5 µl de l'agent fluorescent SYBR® *Safe DNA gel Stain*, en agitant doucement pour éviter la formation de bulles. Placez le peigne dans la cuve d'électrophorèse et versez le gel. Une fois le gel solidifié, retirez le peigne.

1.2.1.4 Dépôt sur le gel, migration et lecture de la PCR classique et duplex

1) Pour PCR classique

Pour le marqueur de taille, il faut prendre 1 µl de marqueur de taille 100 Pb, 3 µl de tampon de charge et 3 µl d'eau pure, puis le déposer dans le premier puits du gel. En ce qui concerne les produits de la PCR (Mix A et Mix B), il faut prendre 04 µl de tampon de charge et 04 µl d'eau pure, ainsi que 04 µl des produits de la PCR, et les déposer respectivement dans les puits du gel : témoin négatif, témoin positif et les deux souches à tester pour chacun des Mix A et B. Ensuite, il faut faire migrer le gel à 100 V pendant 45 minutes et enfin lire le gel sur le transilluminateur Ultra-violet.

2) Pour PCR duplex

Préparer le marqueur de taille en prenant 1 µl de marqueur de taille 100 Pb, 3 µl de tampon de charge et 3 µl d'eau pure, puis déposez ce mélange dans le premier puit du gel. Ensuite, préparez les échantillons à analyser en prenant 4 µl de tampon de charge, 4 µl d'eau pure et 4 µl des produits de la PCR, et déposez-les respectivement dans l'ordre suivant les puits du gel : témoin négatif, témoin positif et les deux souches à tester. Une fois les échantillons prêts, procédez à la migration électrophorétique en appliquant une tension de 100 V pendant 45 minutes. Enfin, observez le gel sur un transilluminateur ultraviolet pour visualiser les résultats.

2 Tests de sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme standard et E-test)

2.1 Préparation de l'inoculum

Cultiver les bactéries dans le milieu de culture pendant 18 à 24 heures. Ensuite, prélever quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques à l'aide d'une anse de platine ou d'un écouvillon. Transférer soigneusement l'anse ou l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%. Assurer de bien homogénéiser la suspension bactérienne jusqu'à ce que son opacité atteigne 0,5 MF, en utilisant éventuellement un densitomètre pour cette étape.

2.2 Ensemencement

Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum, puis essorez-le en le pressant fermement contre la paroi interne du tube tout en le tournant pour maximiser le déchargement. Ensuite, frotter l'écouvillon sur toute la surface gélosée, sèche, en effectuant des stries serrées de haut en bas. Répéter cette étape deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois et en veillant à

faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Enfin, terminer l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. Si plusieurs boîtes de Petri sont ensemencées, recharger l'écouvillon à chaque fois.

2.3 Application des disques d'antibiotiques et E-tests

Presser chaque disque d'antibiotique et E-test à l'aide de pince bactériologique stérile, veillez à ne pas déplacer les disques après application. Ensuite, placez les boîtes de Pétri ensemencées et renversées à l'intérieur d'une jarre d'anaérobiose. Introduisez des catalyseurs dans la jarre d'anaérobiose et verrouillez-la hermétiquement. Connectez ensuite la jarre d'anaérobiose au générateur d'atmosphère anaérobie Anoxomat®. Incubez la jarre d'anaérobiose à une température de 37°C pendant 48 heures. Après l'incubation, mesurez les diamètres critiques pour chaque antibiotique, puis discutez les résultats obtenus.

- NB :
- Le milieu adéquat doit être coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm
 - Les géloses doivent être séchées avant emploi
 - Il est préférable de ne pas mettre plus de 4 disques d'antibiotique sur une boîte de 90 mm

Résultats et discussion

1. Résultats

1.1 Diagnostic bactériologique

1.1.1 Observation macroscopique après l'isolement des microorganismes

Après avoir incubé les boîtes de Pétri ensemencées, nous avons réussi à isoler des colonies pures de *C. difficile*. Ces colonies étaient de couleur grise, ronde et plate, avec un bord irrégulier et une apparence granuleuse. Elles présentaient également une légère dépression au centre, une surface lisse et dégageaient une odeur caractéristique de crottin de cheval. Par ailleurs, ces colonies n'étaient pas hémolytiques (Figure 16).

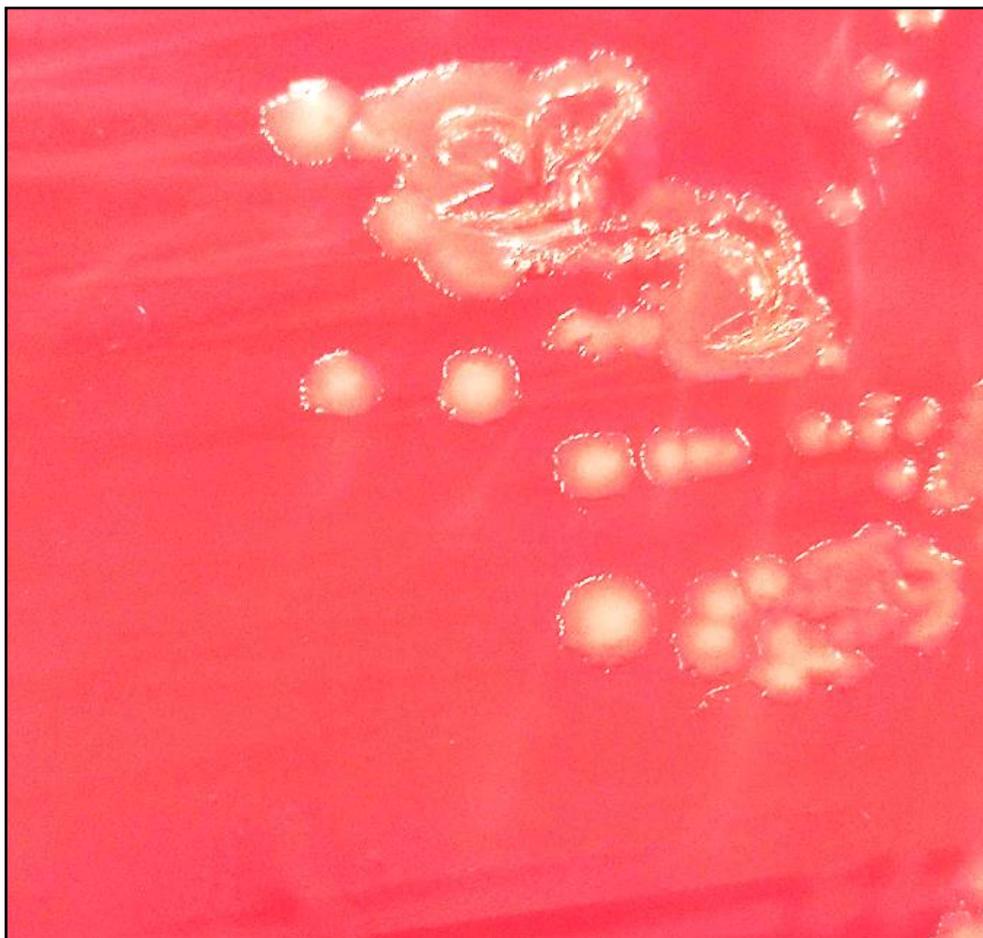


Figure 16 : Colonies de *C. difficile* sur gélose Columbia au sang frais (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)

1.1.2 Observation microscopique de la bactérie suspectée

a) Observation sous microscope après coloration au bleu de méthylène

La coloration au bleu de méthylène a pu nous être utile pour observer les caractéristiques morphologiques de *C. difficile*. Selon l'observation sous microscope optique, on a pu distinguer des formes bacillaires avec des extrémités peut arrondies (Figure 17).

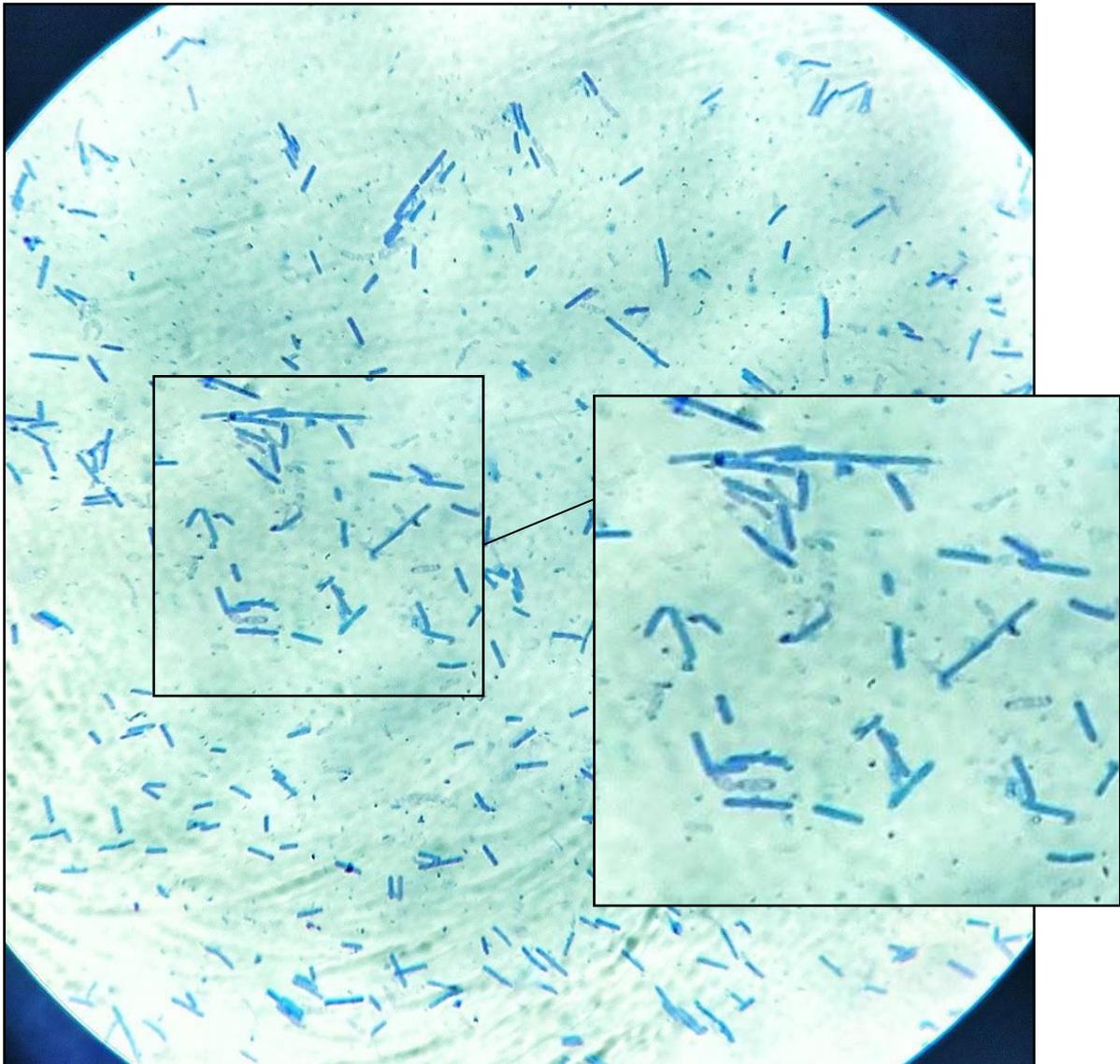


Figure 17 : Visualisation au microscope optique de *C. difficile* coloré au bleu de méthylène (Gr : X 1000) (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)

b) Observation sous microscope après coloration de Gram

La coloration de Gram de *C. difficile* révèle des bactéries à Gram positif présentant une forme de bâtonnet avec des extrémités légèrement pointues, avec présence de spores subterminales peu déformantes (Figure 18).

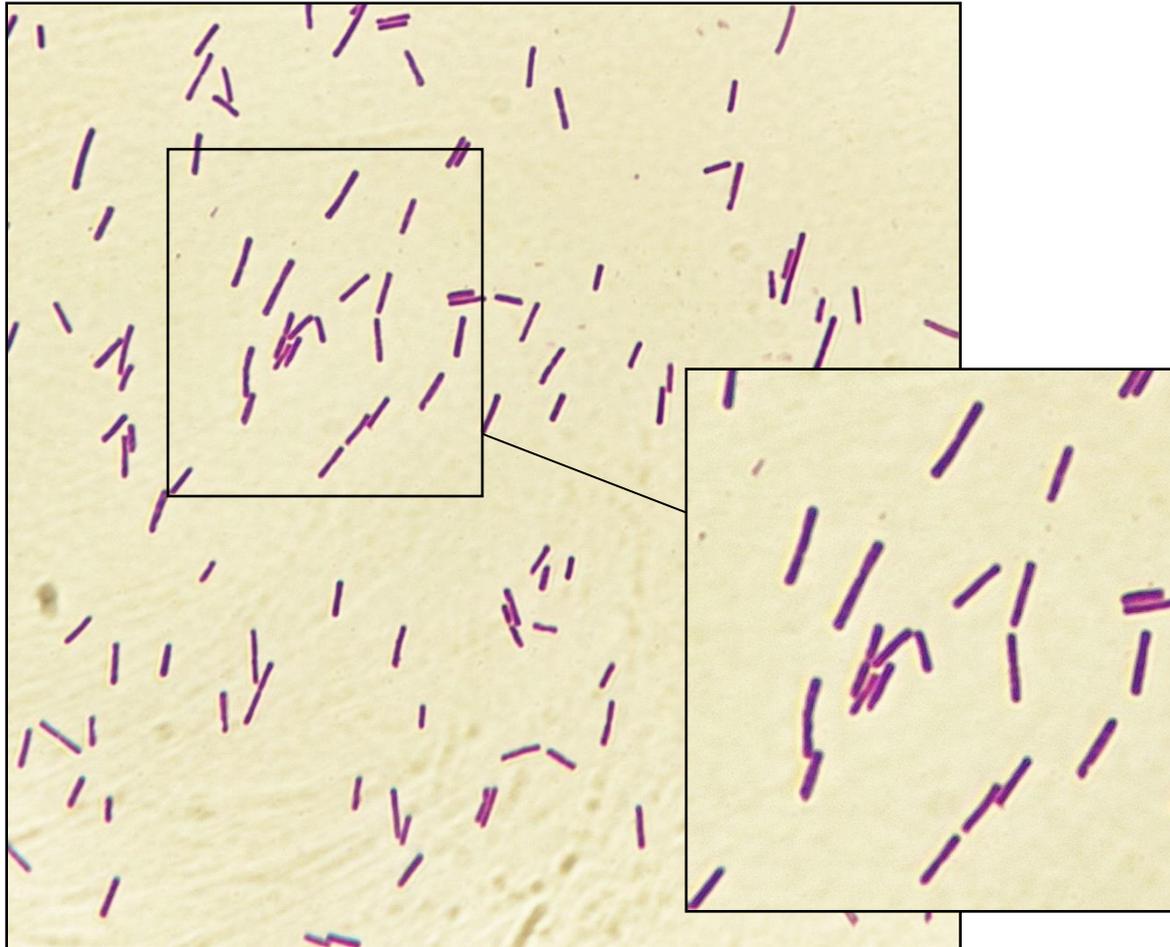


Figure 18 : Visualisation au microscope optique de *C. difficile* après coloration de GRAM (Gr : X 1000) (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)

1.1.3 Tests biochimique : galeries miniaturisées d'identification

1.1.3.1 Lecture de la galerie Rapid® ID 32 A après incubation

Après 05 heures d'incubation à 37°C et ajouts des réactifs on obtient comme suit (Figure 19).

La figure 20 montre les données générées par la Galerie miniaturisée Rapid® ID 32 A.



Figure 19 : Galerie miniaturisée Rapid® ID 32 A après inoculation et incubation (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)

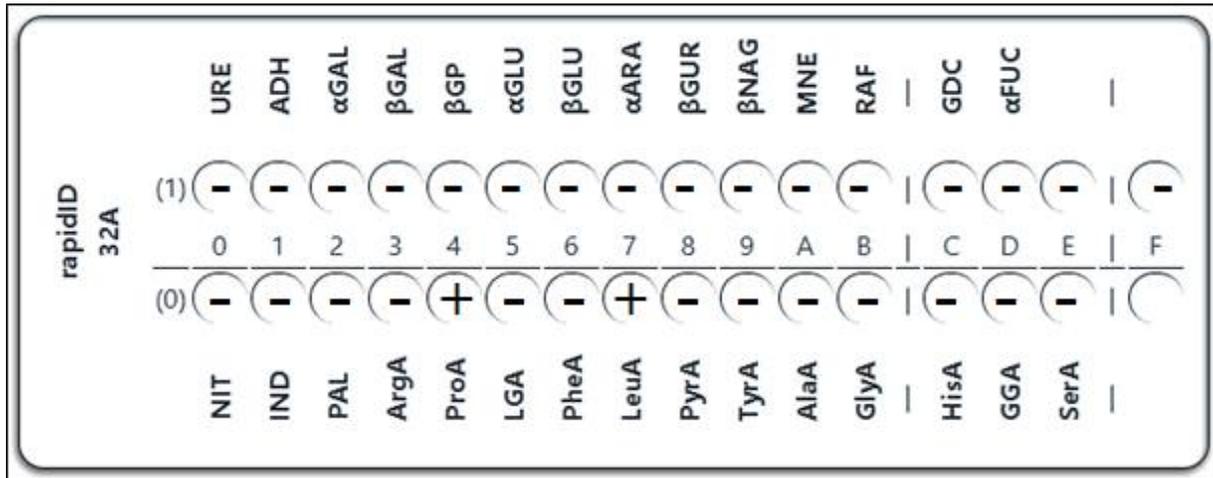


Figure 20 : Fiche de résultats remplie à partir des données générées par la Galerie miniaturisée Rapid® ID 32 A (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)

Après avoir saisi les résultats dans le logiciel d'identification microbienne en ligne -UBPM le Lab-, le programme a pu générer une réponse positive (Figure 21) révélant comme suit :

- Une excellente identification et un niveau élevé de probabilité à hauteur de 90,5 % que la bactérie suspectée soit *C. difficile*
- Un niveau très faible de probabilité soit seulement 5,7 % que la bactérie suspectée est *Clostridioides glycolicum*

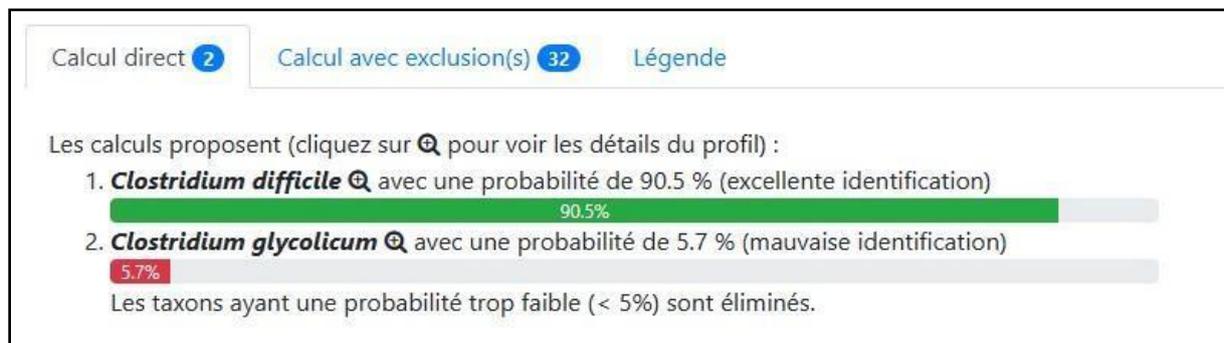


Figure 21 : Résultats générés par le programme d'identification microbienne en ligne -UBPM le Lab-

1.1.3.2 Lecture de la galerie API® 20 A après incubation

Après 24 heures d'incubation à 37°C et ajouts des réactifs on obtient comme suit (Figure 22).

La figure 23 montre les données générées par la Galerie miniaturisée API® 20 A

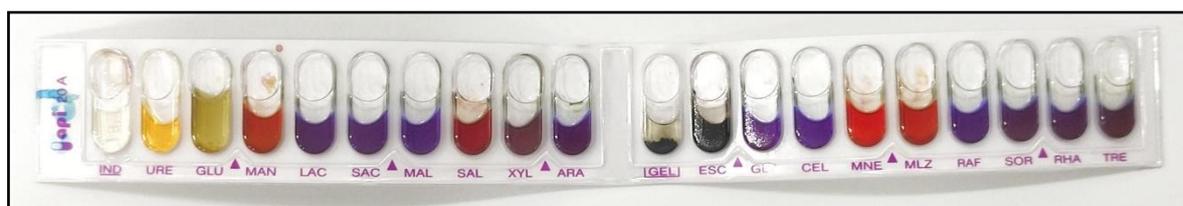


Figure 22 : Galerie miniaturisée API® 20 A après inoculation et incubation (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)

API[®] 20 A

REF: 2023 / 03 / 30

CE 07225 B

BIOMÉRIEUX

Origine / Source / Herkunft /
Origen / Origen / Προέλευση
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie:

-	-	+	+	-	-	=	=	-	-	+	=	=	+	+	-	=	=	-	-	+	+	-	
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
IND	URE	GLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA	GEL	ESC	GLY	CEL	MNE	MLZ	RAF	SOR	RHA	TRE	CAT	SPOR	GRAM	COCC
4			1			0			2			4			1			0			3		

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις dra tester /
Andre tests / Inne testy:

Ident. / Ταυτοποίηση

Imprimé en France / Printed in France / Rev. 2004/01/18

Figure 23 : Fiche de résultats remplie à partir des données générées par la Galerie miniaturisée API[®] 20 A (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)

En examinant le répertoire analytique de la galerie API[®] 20 A et en recherchant le code précédemment obtenu dans ce répertoire, il a été possible de découvrir l'information suivante (figure 24) :

- La bactérie suspectée a été identifiée avec une grande précision, atteignant un taux de 99,9 %, et il a été confirmé qu'il s'agissait de *C. difficile*.

4 102 012 3	TRES BONNE IDENTIFICATION	VERY GOOD IDENTIFICATION	SEHR GUTE IDENTIFIZIERUNG	4 102 012 3
<i>Cl.difficile</i>	%id=99.8 T=0.72 (TRE 5%)			
4 102 050 3	TRES BONNE IDENTIFICATION	VERY GOOD IDENTIFICATION	SEHR GUTE IDENTIFIZIERUNG	4 102 050 3
<i>Cl.difficile</i>	%id=99.9 T=0.72 (SOR 5%)			
4 102 100 2	TRES BONNE IDENTIFICATION	VERY GOOD IDENTIFICATION	SEHR GUTE IDENTIFIZIERUNG	4 102 100 2
<i>Eubacterium limosum</i>	%id=99.4 T=0.66 (GEL 6%)(GLY 12%)			
4 102 210 3	TRES BONNE IDENTIFICATION	VERY GOOD IDENTIFICATION	SEHR GUTE IDENTIFIZIERUNG	4 102 210 3
<i>Cl.difficile</i>	%id=99.9 T=0.72 (CEL 5%)			
4 102 400 3	TRES BONNE IDENTIFICATION	VERY GOOD IDENTIFICATION	SEHR GUTE IDENTIFIZIERUNG	4 102 400 3
<i>Cl.difficile</i>	%id=99.8 T=0.87 (MLZ 83%)			
4 102 410 2	TRES BONNE IDENTIFICATION	VERY GOOD IDENTIFICATION	SEHR GUTE IDENTIFIZIERUNG	4 102 410 2
<i>Cl.difficile</i>	%id=99.9 T=0.70 (SPOR 99%)			
4 102 410 3	EXCELLENTE IDENTIFICATION	EXCELLENT IDENTIFICATION	AUSGEZEICHNETE IDENTIFIZIERUNG	4 102 410 3
<i>Cl.difficile</i>	%id=99.9 T=0.98			
4 102 412 3	EXCELLENTE IDENTIFICATION	EXCELLENT IDENTIFICATION	AUSGEZEICHNETE IDENTIFIZIERUNG	4 102 412 3
<i>Cl.difficile</i>	%id=99.9 T=0.77 (TRE 5%)			

Figure 24 : Une page du répertoire analytique de la galerie miniaturisée API[®] 20 (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)

1.1.4 Recherche des toxines A et B par biologie moléculaire (Recherche des gènes : tcdA et tcdB de *C. difficile* par PCR)

a) Lecture du gel d'agarose après PCR classique

- Apparition de plusieurs bandes pour le puit 1 (marqueur de taille) (Figure 25)
- Absence de bandes sur le gel d'électrophorèse pour les puits 2 et 6 (contrôle négatif)
- Pour le Mix PCR (A), apparition d'une seule bande pour chacun des puits : 3, 4 et 5, dont le puit 3 correspond au contrôle positif, tandis que les puits 4 et 5 correspondent aux souches à tester
- Pour le Mix PCR (B), apparition d'une seule bande pour chacun des puits : 7, 8 et 9, dont le puit 7 correspond au contrôle positif, tandis que les puits 8 et 9 correspondent aux souches à tester
- La bande correspondante pour chacun des puits : 3, 4 et 5 ont une taille intermédiaire entre 300 Pb et 400 Pb
- La bande correspondante pour chacun des puits : 7, 8 et 9 ont une taille intermédiaire entre 400 Pb et 500 Pb

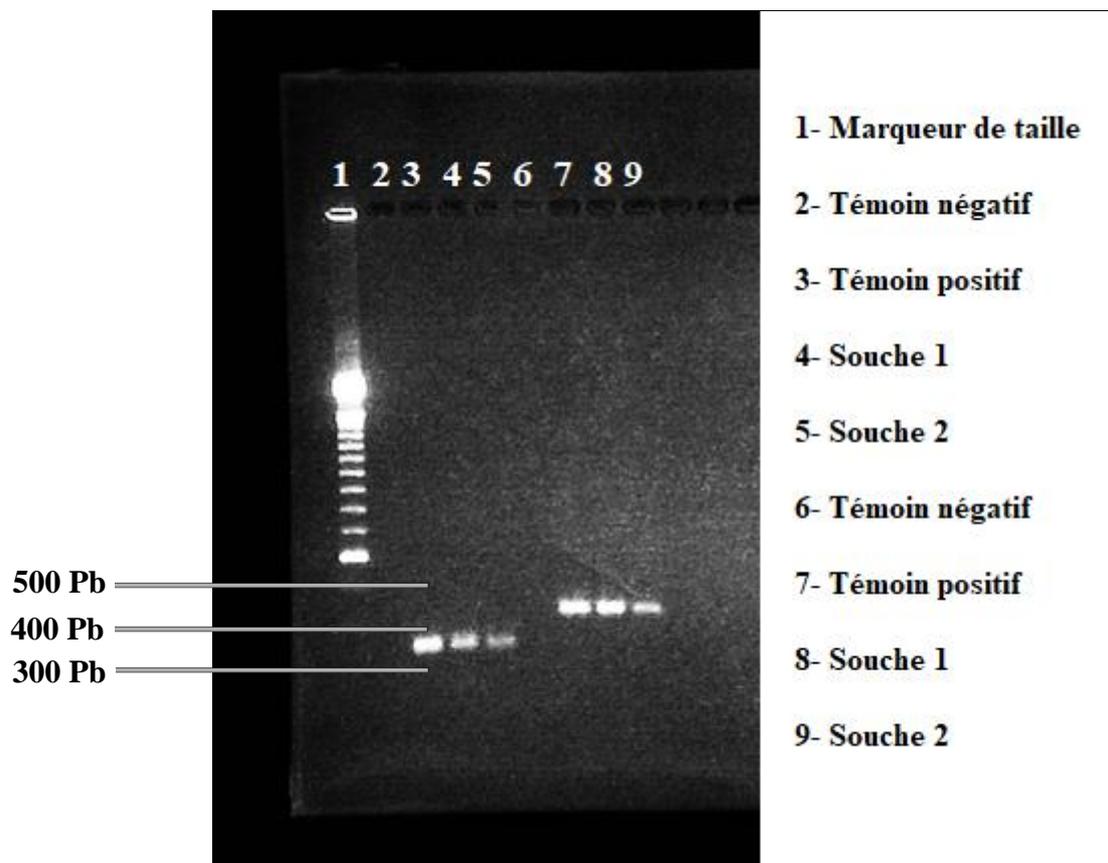


Figure 25 : Profil de migration sur gel d'agarose 1.5% après PCR classique (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)

b) Lecture du gel d'agarose après PCR Duplex

- Apparition de plusieurs bandes pour le puit 1 (marqueur de taille) (Figure 26)
- Absence de bandes pour le puit 2 (contrôle négatif)
- Apparition de deux bandes pour chacun des puits : 3, 4 et 5, dont le puit 3 correspond au contrôle positif, tandis que les puits 4 et 5 correspondent aux souches à tester
- L'une des bandes correspondante pour chacun des puits : 3, 4 et 5 qui possèdent un même poids moléculaire ont une taille intermédiaire entre 300 Pb et 400 Pb, tandis que l'autre bandes correspondante pour les même puits possèdent aussi un même poids moléculaire mais d'une taille différente aux premières bandes avec une valeur intermédiaire entre 400 Pb et 500 Pb

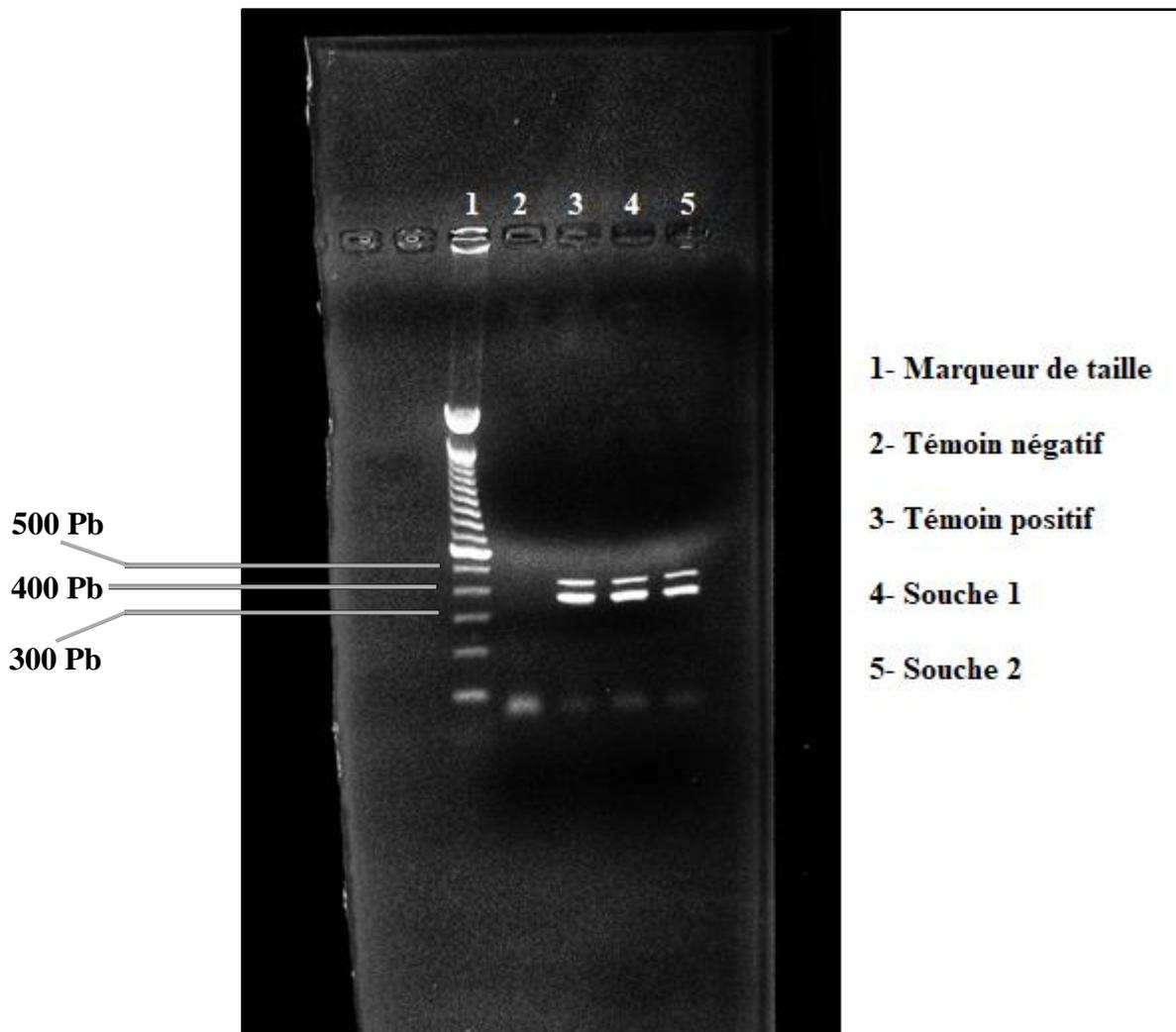


Figure 26 : Profil de migration sur gel d'agarose 1.5% après PCR dultiplex (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)

1.2 Tests de sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme standard et E-test)

1.2.1 Antibiogramme

La mesure des tailles des zones d'inhibition autour des disques d'antibiotiques (Annexe 12) a été effectuée pour évaluer la sensibilité de l'une des souches bactériennes détectées vis-à-vis de chaque antibiotique et représentée dans le tableau ci-dessous (tableau 2) :

Tableau 2 : Tableau de l'antibiorésistance du *C. difficile* isolé (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)

Antibiotiques	Diamètre (mm)	Interprétation
Bêta-lactamines : Ampicilline / Amoxicilline Amoxicilline / Acide clavulanique	< 6 21	Résistante Sensible
Aminosides : Kanamycine	< 6	Résistante
Macrolides : Clindamycine 15 UI	Disque déchargé	Sensible
Autres : Vancomycine Tétracycline Sulfaméthoxazole Rifampicine Chloramphénicol	31 45 < 6 38 21	Sensible Sensible Résistante Sensible Sensible

1.2.2 E-test

En lisant les résultats des E-test (Annexe 13) on a pu déterminer les concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques vis à vis de *C. difficile*, indiqué dans le tableau 3 comme suit :

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des CMI des antibiotiques vis-à-vis de la souche de *C. difficile* détecté (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)

Antibiotiques	CMI (µg/ml)	Interprétation
Clindamycine	03	Sensible
Moxifloxacine	0.625	Sensible
Imipénème	> 32	Résistante
Érythromycine	0.75	Sensible
Métronidazole	0.64	Sensible

1.3 Résultats de l'analyse rétrospective des facteurs de risque associés à l'apparition d'infections à *C. difficile*

Etude rétrospective multicentrique : Au total, 172 prélèvements suspects ont été examinés sur une période de 61 mois, s'étendant du 1 janvier 2018 au 15 janvier 2023.

1.3.1 Répartition du nombre total des prélèvements analysés et les prélèvements positifs en fonction des années

Dans une population de 172 personnes, 17 sont touchées par *C. difficile* et donc avec une prévalence de 9.88%. Les années présentant les valeurs les plus élevées sont les suivantes (Figure 27) :

- En 2018, sur 21 prélèvements analysés, 3 étaient positifs à *C. difficile*
- En 2019, sur un total de 13 prélèvements analysés, 1 était positif à *C. difficile*
- En 2020, 20 prélèvements ont été analysés, parmi lesquels 1 était positif à *C. difficile*
- En 2021, parmi les 30 prélèvements analysés, 3 étaient positifs à *C. difficile*
- En 2022, sur un total de 82 prélèvements analysés, 9 étaient positifs à *C. difficile*
- En 2023, aucun des 6 prélèvements analysés n'a été positif à *C. difficile*

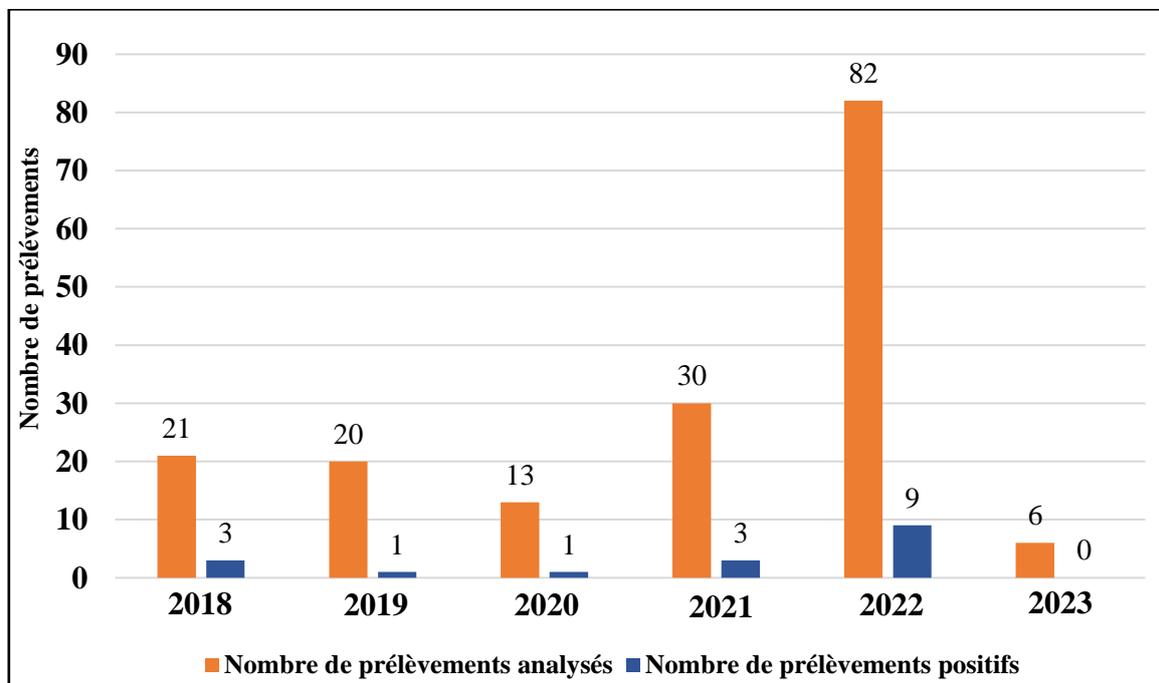


Figure 27 : Répartition du nombre de prélèvements analysés ainsi qu'au prélèvement positif d'ICD en fonction des années (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)

1.3.2 Répartition total des pourcentages des prélèvements à ICD positifs et négatifs entre 2018 et 2023

Parmi les 172 prélèvements analysés pour suspicion d'ICD entre 2018 et 2023, on a relevé 17 cas positifs, ce qui représente 9,89% de l'ensemble. Les 155 prélèvements restants étaient négatifs, correspondant à 90,11% des prélèvements reçus par le laboratoire (Figure 28).

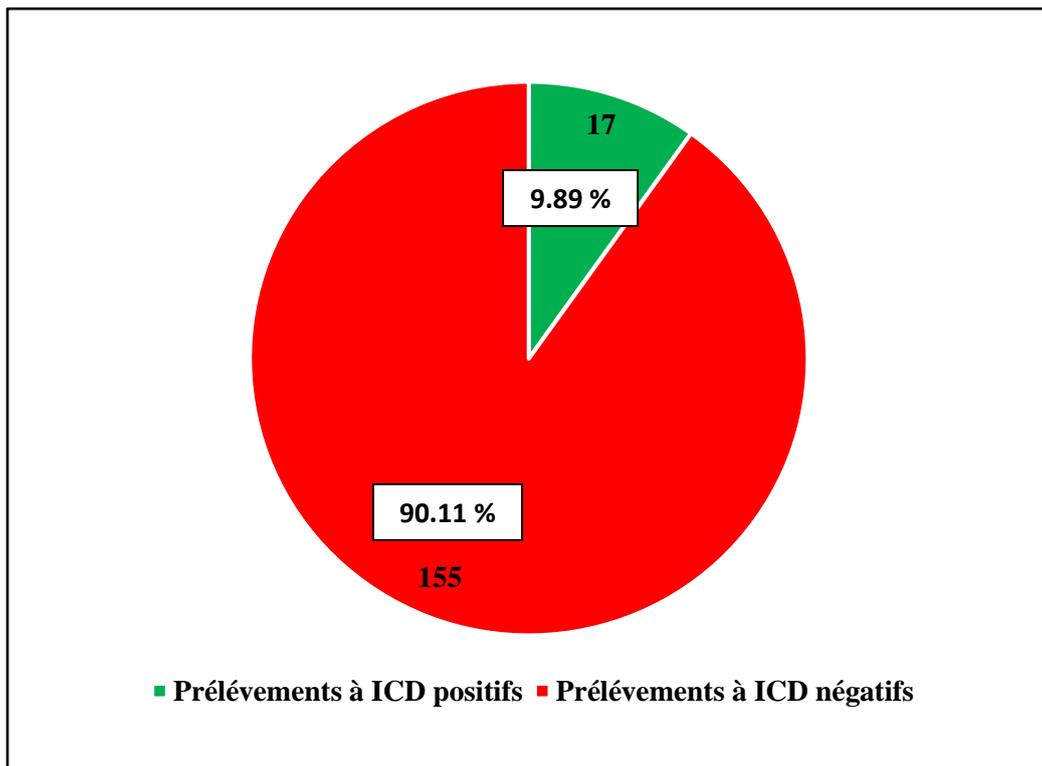


Figure 28 : Répartition des prélèvements positif et négatifs d'ICD totaux entre 2018 et 2023 (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)

1.3.3 La moyenne d'âge des patients à ICD positif entre 2018 et 2023

Les 17 cas positifs à *C. difficile* parmi les 172 prélèvements analysés dans la période entre 2018 et 2023 ont une moyenne d'âge de 60 ans après un calcul effectué par le logiciel : « Excel ».

1.3.4 Répartition des données en fonction du sexe entre 2018 et 2023

Parmi les 17 cas d'ICD positifs, on observe une répartition pratiquement équilibrée entre les deux sexes. En effet, on dénombre 8 cas chez les patients du sexe féminin, représentant 47,05 % du total, tandis que 9 cas sont issus de la population masculine, correspondant à 52,94 % du total (Figure 29).

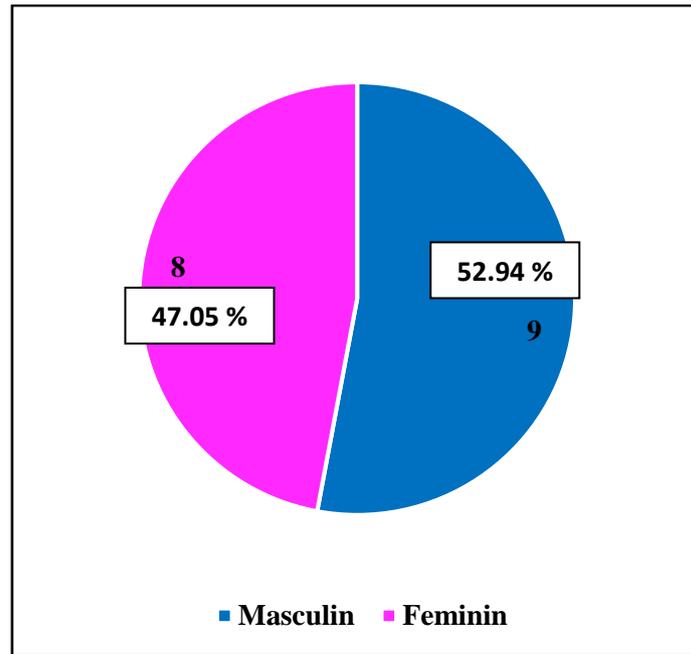


Figure 29 : Répartition des données des cas d'ICD positifs en fonction du sexe entre 2018 et 2023 (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)

1.3.5 Répartition des données selon l'hospitalisation ou non des patients entre 2018 et 2023

Parmi les 17 cas positifs à *C. difficile*, on dénombre 2 cas externes, représentant un pourcentage de 11.76 %, tandis que les 15 restants étaient hospitalisés dans des établissements de santé, correspondant à 88.23 % (Figure 30).

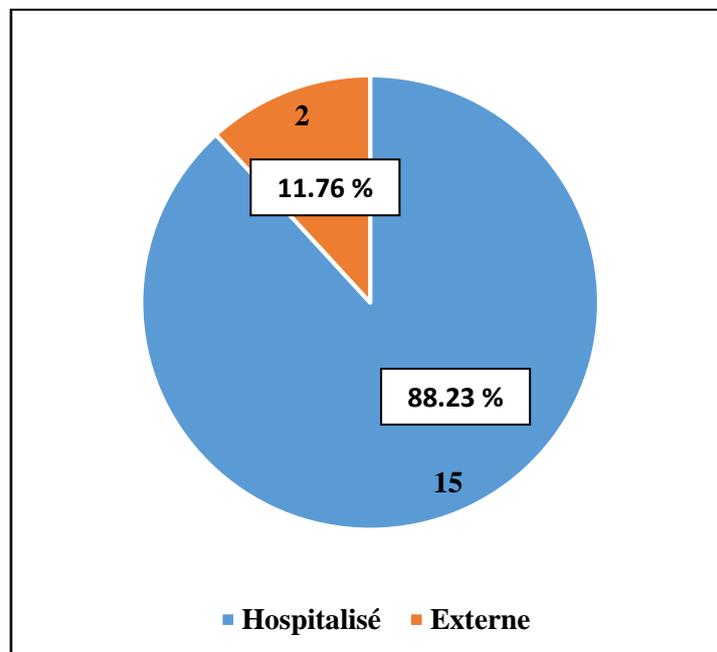


Figure 30 : Répartition des données des cas d'ICD positifs en fonction du lieu d'hospitalisation entre 2018 et 2023 (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)

1.3.6 Répartition des données en fonction de la prise ou non d'une antibiothérapie préalable entre 2018 et 2023

Parmi les 17 cas positifs à *C. difficile*, 14 cas ayant pris des antibiotiques avant d'effectuer le prélèvement, représentant un pourcentage de 82.35 %, tandis qu'on n'a pas de renseignements pour les 3 cas positifs restants, correspondant à 17.64 % (Figure 31).

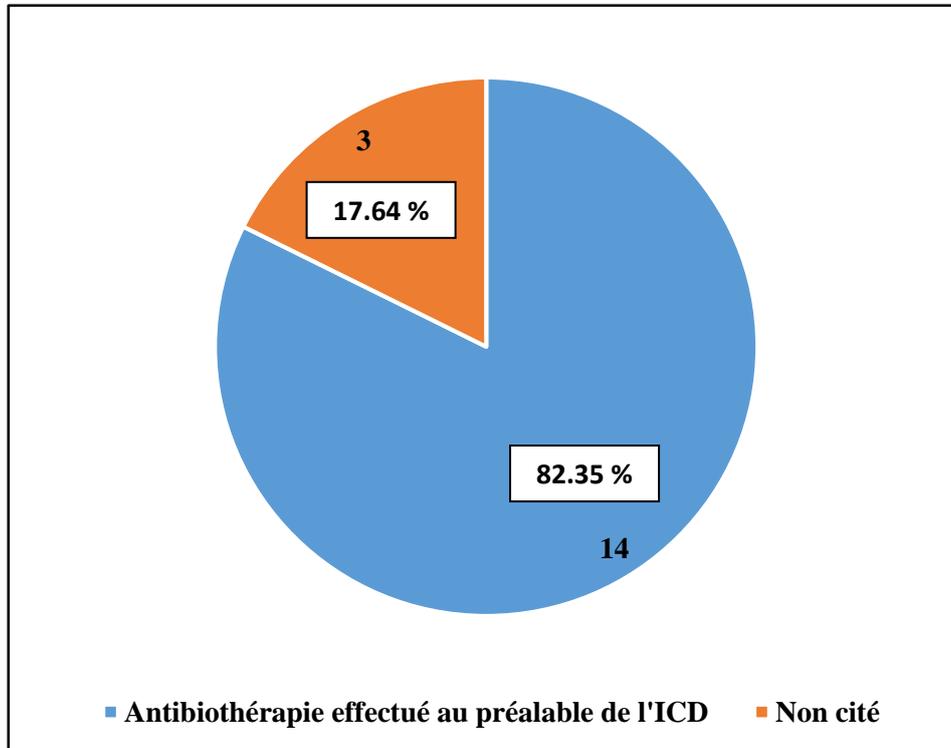


Figure 31 : Répartition des données des cas d'ICD positifs en fonction de l'application ou non de l'antibiothérapie entre 2018 et 2023 (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)

1.3.7 Répartition des données en fonction de la nature des antibiotiques reçus au préalable entre 2018 et 2023

L'analyse des données sur les antibiotiques administrés aux patients avant d'effectuer le prélèvement a permis de déterminer leurs pourcentages et de les représenter dans un secteur graphique global (Figure 32). Selon cette figure, le métronidazole est l'antibiotique le plus fréquemment utilisé pour traiter les infections dans les établissements de santé, représentant 20,93 % des antibiotiques. Il est suivi de la vancomycine et de la ciprofloxacine, toutes deux avec un pourcentage de 16,27 %. Ensuite, le céfotaxime représente 11,62 %, suivi de l'amoxicilline/acide clavulanique avec 9,30 %. L'azithromycine et les C3G ont un pourcentage de 4,65 %. Enfin, le tienam et l'amikacine sont utilisés dans 2,32 % parmi la totalité des antibiotiques.

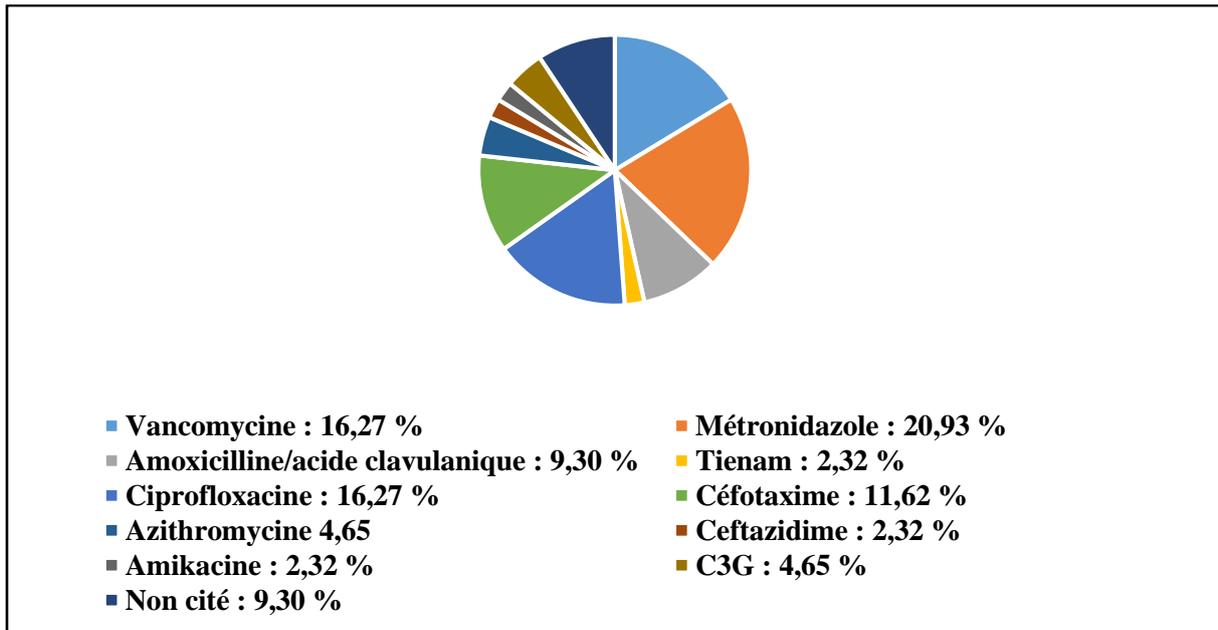


Figure 32 : Répartition des pourcentages des antibiotiques reçus au préalable de l'ICD chez les patients (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)

1.3.8 Profil de résistance des souches de *C. difficile* vis à vis des antibiotiques

Lors de l'étude rétrospective, on a identifié un total de 17 souches de *C. difficile*. Parmi ces souches, 15 ont été spécifiquement testées pour leur sensibilité aux antibiotiques. Les résultats de ces tests, indiquant la sensibilité et la résistance aux antibiotiques, sont illustrés dans la figure 33. D'après cette figure on relève :

- Une résistance naturelle des souches vis à vis aux céfoxitine, céfotaxime et kanamycine confirmant ainsi le diagnostic
- Concernant la clindamycine et le sulfaméthoxazole la majorité des souches sont résistantes avec des pourcentages de 73.33 % et 85.71 % respectivement
- Une sensibilité importante des souches de *C. difficile* vis à vis aux Amoxicilline/acide clavulanique, métronidazole, vancomycine et chloramphénicol
- Cependant une sensibilité réduite des souches vis à vis à l'imipénème est de 42.84 % pour une résistance de 57.14 %
- Concernant l'ampicilline/amoxicilline, la tétracycline et la rifampicine, la majorité des souches sont sensibles avec des pourcentages de 83.33 %, 92.3 % et 84.61 % respectivement

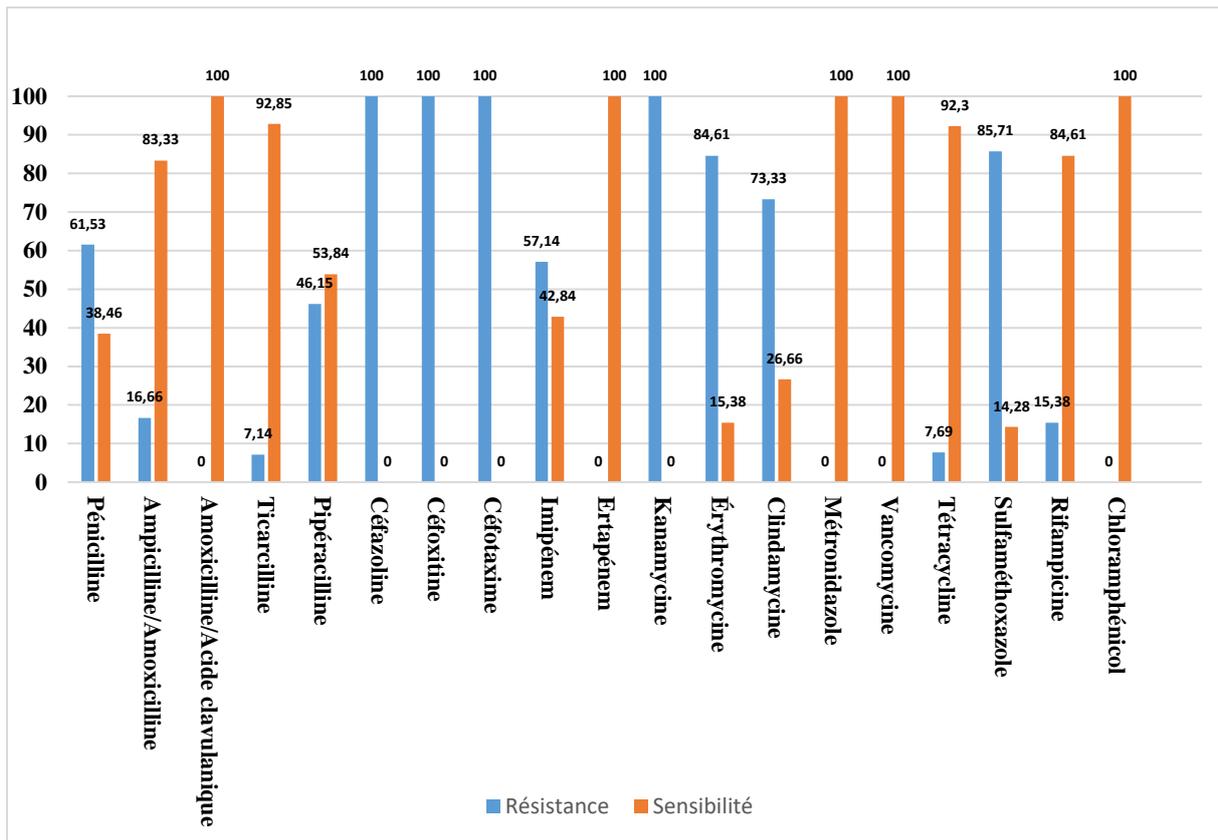


Figure 33 : Profil de résistance des souches de *C. difficile* vis à vis aux antibiotiques (laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme - IPA Alger)

2. Discussion

2.1 Identification bactériologique

L'échantillon a été cultivé sur le milieu Columbia au sang frais, un milieu spécifiquement conçu pour favoriser la croissance des bactéries anaérobies y compris *C. difficile*. Ce milieu nous a permis de sélectionner des colonies distinctes et isolées afin de procéder à une succession de tests, non seulement en suivant l'algorithme des méthodes employées pour la recherche de *C. difficile* décrit dans la figure 11 (Salas, 2020), mais aussi selon les capacités et les moyens disponibles dans chaque laboratoire.

Le traitement des selles effectué avait pour but de sélectionner les spores résistantes. Le thioglycolate de sodium est un agent réducteur, capable de réduire le potentiel redox et favoriser ainsi les conditions anaérobies nécessaires à la croissance de *C. difficile*. La cystéine et le lysozyme favorisent le déclenchement du processus de germination de ces spores (Kaus *et al.*, 2020).

La mise en évidence du germe recherché dans ce laboratoire commence par l'identification macroscopique des colonies obtenues, qui nous a permis d'observer quelques caractéristiques

spécifiques telles que le caractère non hémolytique, couleur grise, forme ronde et plate, bord irrégulier, apparence granuleuse, légère dépression au centre, surface lisse et une odeur de crottin de cheval. Ces caractéristiques nous permettent de suspecter le *C. difficile* (McDonald *et al.*, 2005).

L'identification microscopique des bactéries obtenues après coloration de Gram et au bleu de méthylène nous a permis d'observer quelques caractéristiques spécifiques telles qu'une coloration à Gram positif, une forme de bâtonnet, des spores subterminales peu déformantes. Ces caractéristiques spécifiques consistent la première étape d'identification de *C. difficile* (McDonald *et al.*, 2005).

La réalisation des galeries biochimiques miniaturisées Rapid® ID 32 et API® 20A afin de déterminer les caractéristiques biochimiques et métaboliques de la souche bactérienne suspecte et l'identifier de manière spécifique et rapide. Ces tests permettent de comprendre le profil biochimique de la bactérie, notamment ses capacités de fermentation, d'oxydation, de production d'enzymes spécifiques, ainsi que d'autres réactions métaboliques.

Pour le cas de notre souche suspecte, les deux galeries nous ont permis de confirmer l'identification de *C. difficile* avec des pourcentages importants et incontestables.

La mise en évidence des toxines A et B de *C. difficile* toxigène dans ce laboratoire implique l'application directe des techniques de biologies moléculaires. Dans notre cas deux types de PCR (classique et duplex) ont été effectués pour la recherche des deux gènes *tcdA* et *tcdB*.

Dans la PCR classique, l'apparition d'une bande avec une taille de 358 Pb indique clairement la présence du gène *tcdA* spécifique pour la bactérie *C. difficile*. L'apparition d'une bande avec une taille de 440 Pb indique aussi la présence du gène *tcdB* spécifique pour ce germe.

Dans la PCR Duplex, l'apparition de deux bandes avec une taille de 358 Pb et 440 Pb respectivement indiquent clairement la présence des deux gènes *tcdA* et *tcdB* spécifiques pour *C. difficile*.

La présence des gènes *tcdA* et *tcdB* confirme le caractère toxigène des deux souches et donc leurs implication dans l'infection.

Doté d'une grande sensibilité et spécificité (Novakova *et al.*, 2021), les deux types de PCR (classique et multiplex) confirment incontestablement la présence de deux souches toxigènes de *C. difficile* dans les échantillons de selle.

Après avoir confirmé la présence de *C. difficile* dans l'échantillon de selle, des tests de sensibilité aux antibiotiques doivent être réalisés non seulement pour surveiller son profil de résistance mais aussi de déterminer l'efficacité des antibiotiques spécifiques vis à vis de cette bactérie, ce qui aide les médecins à choisir le traitement antibiotique le plus approprié et une bonne prise en charge pour les patients atteints de l'ICD. Dans notre cas un antibiogramme et des CMI par E-test ont été effectués. La souche testée a présenté une résistance à la l'ampicilline/amoxicilline, l'imipenème, la kanamycine et le sulfaméthoxazole. Ainsi qu'une sensibilité vis-à-vis l'amoxicilline/acide clavulanique, la vancomycine, la tétracycline, la rifampicine, le chloramphénicol, la clindamycine, la moxifloxacine, l'érythromycine et le métronidazole.

La résistance naturelle de *C. difficile* envers les aminosides (dans notre cas : la kanamycine) est due à l'absence d'un système de transport actif nécessaire pour permettre un passage efficace de cette famille d'antibiotiques à travers sa membrane cytoplasmique (Veysiere, 2019).

Le mécanisme de résistance naturelle de *C. difficile* envers les β -lactamines (dans notre cas : l'ampicilline/amoxicilline et l'imipenème) reste inconnu à notre jour (Toth *et al.*, 2018). La résistance de *C. difficile* vis-à-vis le sulfaméthoxazole est génétiquement acquise par transfert génétique horizontal (Ackermann *et al.*, 2003).

La sensibilité de *C. difficile* à la vancomycine dans la majorité des cas constante, avec des CMI inférieures à 4 mg/L, selon plusieurs études (Courvalin *et al.*, 2012).

2.2 Discussion des résultats statistiques

D'après les résultats statistiques de l'étude rétrospective, une augmentation du nombre de prélèvements analysés est corrélé positivement au nombre des cas d'ICDs positifs qui atteint des valeurs maximales en 2022. Cette augmentation significative est due à une antibiothérapie préalable et à une sensibilisation des cliniciens pour l'indication de la recherche de *C. difficile* mais malheureusement après avoir donné soit le métronidazole ou la vancomycine ce qui donne des résultats faussement négatifs (Permpoonpattana *et al.*, 2011). D'après les fiches de renseignements des patients atteints d'ICD, les patients hospitalisés souffrant de la COVID-19 après le début de la pandémie sont traités préalablement avec des antibiotiques, ce qui explique le nombre élevé des cas positif à *C. difficile* chez cette population (Maslennikov *et al.*, 2022).

D'après la répartition des données entre 2018 et 2023, en fonction de l'utilisation ou non d'une antibiothérapie et des antibiotiques précédemment administrés avant l'ICD, il a été constaté que

82,35 % des patients atteints de cette infection avaient reçu une antibiothérapie préalable, tandis que pour 17,64 % des patients, il n'est pas mentionné s'ils avaient ou non reçu une antibiothérapie. Les ICDs sont fréquemment associées à plusieurs antibiotiques, tels que la ciprofloxacine (16,27 %), le céfotaxime (11,62 %), l'amoxicilline/acide clavulanique (9,30 %), l'azithromycine et les autres C3G (4,65 %), le tienam et l'amikacine (2,32 %). Ces résultats confirment que l'antibiothérapie est un facteur de risque important favorisant le développement des ICDs (Ackermann *et al.*, 2005 ; Dhalla *et al.*, 2006).

Il est communément admis que les personnes âgées, généralement définies comme étant âgées de plus de 65 ans, sont plus vulnérables aux infections communautaires ou nosocomiales, surtout lorsqu'elles sont hospitalisées. Dans notre étude, nous avons identifié 17 prélèvements positifs à *C. difficile* entre 2018 et 2023, avec une moyenne d'âge de 60 ans. Selon les fiches de renseignements, les individus appartenant à des groupes d'âge différents ne présentent pas des symptômes aussi graves que ceux observés chez les personnes âgées. Cela confirme ainsi que l'âge du sujet est un facteur de risque qui influe sur l'apparition et la gravité de l'ICD (Khanna *et al.*, 2012).

En analysant toujours les fiches de renseignements des 17 cas d'ICD positifs, on a pu déduire qu'il y avait un taux de 88,23 % de patients hospitalisés et de 11,76 % de patients externes. Ces résultats démontrent clairement que l'ICD est une infection nosocomiale et que l'admission d'un individu à l'hôpital constitue un facteur de risque significatif, en particulier lorsqu'il s'agit d'une hospitalisation prolongée, car cela augmente considérablement la probabilité d'être contaminé par cette bactérie (Khanna & Pardi, 2014).

Le sexe des patients ne semble pas jouer un rôle majeur en tant que facteur de risque dans l'apparition et la sévérité des ICD, car des pourcentages pratiquement équivalents ont été déduits pour les deux sexes durant l'étude rétrospective.

Conclusion

Conclusion

L'épidémiologie bactérienne des infections nosocomiales associées à des diarrhées n'a pas beaucoup changé au cours de ces dernières années, elle reste toujours liée à *C. difficile*.

Les ICDs occupent une place prépondérante parmi les infections nosocomiales, entraînant un fardeau économique considérable pour les unités de soins. Plusieurs méthodes d'isolement et de détection ont été mises au point pour identifier *C. difficile*. Néanmoins, le traitement des patients infectés est fréquemment confronté à des défis dus à l'émergence de la résistance aux antibiotiques, à l'état immunodéprimé des patients ainsi qu'à leur âge avancé.

Le présent travail se concentre sur l'étude et l'identification de *C. difficile*, ainsi que sur l'évaluation de sa résistance aux antibiotiques, chez les patients hospitalisés dans divers établissements de santé à Alger et dans d'autres wilayas.

Selon notre étude, il a été conclu que :

- Le processus d'identification de *C. difficile* implique plusieurs étapes, comprenant la détermination et la collecte d'un ensemble de caractéristiques spécifiques pour cette bactérie, tel que l'observation à l'œil nu de la culture bactérienne, l'observation microscopique après différentes colorations, l'utilisation de tests biochimiques et de techniques de biologie moléculaire.
- Les étapes d'identification sont hiérarchisées sous forme d'un algorithme bien précis pour guider et orienter la réalisation de tests, en jouant sur le choix en fonction de leur sensibilité, spécificité et leur disponibilité dans le laboratoire, afin d'obtenir des résultats plus rigoureux et incontestables.
- Les résultats de sensibilité aux antibiotiques indiquent que *C. difficile* isolé durant notre étude possède une résistance génétiquement acquise par transfert génétique horizontal vis à vis le sulfaméthoxazole.
- *C. difficile* est une bactérie entéropathogène majeure liée à plusieurs facteurs de risque pour l'infection, principalement l'antibiothérapie, l'âge ainsi qu'au lieu et durée d'hospitalisation des patients.
- Une moyenne d'âge de 60 ans, est un facteur de risque important qui influence à la fois la survenue et la gravité de l'ICD.

- Les antibiotiques tels que le métronidazole, la vancomycine sont utilisés pour le traitement de l'ICD.
- Les antibiotiques tels que la ciprofloxacine, les bêta-lactames et récemment les nouvelles fluoroquinolones comme gatifloxacine et moxifloxacine sont considérés comme les principaux médicaments à risque élevé de favoriser le déclenchement d'une ICD.
- le sexe des patients n'est pas un facteur de risque majeur dans la survenue et la gravité des ICD.

Les résultats de cette étude pourraient être utilisés pour :

- Améliorer la prise en charge des patients atteints d'infections à *C. difficile* en Algérie
- Développer des programmes de prévention pour réduire l'incidence de cette maladie potentiellement grave en Algérie
- Etudier les marqueurs épidémiologiques afin de surveiller les souches en Algérie, voire la région méditerranéenne
- Une meilleure prise en charge du patient par l'étude de la sensibilité aux antibiotiques

Les résultats obtenus dans cette étude ouvrent la voie à plusieurs perspectives à considérer :

- Nous envisageons d'étendre notre étude sur une période plus longue, en recueillant davantage de données complètes et précises
- Tester la sensibilité des souches de *C. difficile* envers d'autres familles et classes d'antibiotiques
- Mettre en place un réseau de surveillance des ICDs en Algérie
- Sensibiliser les cliniciens dans les différentes structures hospitalières
- Une perspective prometteuse serait de mener une étude génotypique en utilisant différentes techniques de biologie moléculaire telles que le RFLP, PCR ribotypage et d'autres, afin de mieux comprendre l'épidémiologie des souches circulantes en Algérie
- Les meilleures stratégies pour combattre les ICD restent la prévention et une bonne hygiène

Références bibliographiques

A

- Abdelghani K. B., Gerard-Dran D., Morel J., & Combe B. (2010). Arthrite réactionnelle à *Clostridium difficile*. *Revue De Médecine Interne*.
- Ackermann G., Tang Y. J., Kueper R., Heisig P., Rodloff A. C., Silva J., & Cohen S. H. (2001). Resistance to Moxifloxacin in Toxigenic *Clostridium difficile* Isolates Is Associated with Mutations in *gyrA*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(8), 2348–2353.
- Ackermann G., Degner A., Cohen S. H., Silva J., & Rodloff A. C. (2003). Prevalence and association of macrolide-lincosamide- streptogramin B (MLS_B) resistance with resistance to moxifloxacin in *Clostridium difficile*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(3), 599–603.
- Ackermann G., Thomalla S., Ackermann F., Schaumann R., Rodloff A. C., & Ruf B. (2005). Prevalence and characteristics of bacteria and host factors in an outbreak situation of antibiotic-associated diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology*, 54(2), 149–153.
- Aktories K., Schwan C., & Jank T. (2017). *Clostridium difficile* Toxin Biology. *Annual Review of Microbiology*, 71(1), 281–307.
- Alasmari F. A., Seiler S., Hink T., Burnham C. D., & Dubberke E. R. (2014). Prevalence and Risk Factors for Asymptomatic *Clostridium difficile* Carriage. *Clinical Infectious Diseases*, 59(2), 216–222.
- Aslam S., Hamill R. J., & Musher D. M. (2005). Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapies and new strategies. *Lancet Infectious Diseases*, 5(9), 549–557.

B

- Barbut F., Lalande V., Beaugerie L., Eckert C. (2013). Infections digestives à *Clostridium difficile*. *Hépatogastro Oncol Dig*, 20(2), 22–111.
- Barbut F., Lalande V., & Petit J. (2004). Épidémiologie et prévention des infections digestives à *Clostridium difficile*. *Revue Française Des Laboratoires*, 2004(368), 27–34.
- Barbut F., Ramé L., Petit A. M., Suzon L., De Chevigny A., Eckert C., & Euclid P. L. R. F. (2015). Prévalence des infections à *Clostridium difficile* chez les patients hospitalisés avec une diarrhée : résultats d'une étude française prospective multicentrique. *Presse Medicale*.

- Barc M., Bourlioux F., Rigottier-Gois L., Charrin-Sarnel C., Janoir C., Boureau H., Doré J., & Collignon A. (2004). Effect of Amoxicillin-Clavulanic Acid on Human Fecal Flora in a Gnotobiotic Mouse Model Assessed with Fluorescence Hybridization Using Group-Specific 16S rRNA Probes in Combination with Flow Cytometry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(4), 1365–1368.
- Barketi-Klai, A. (2012). *Clostridium difficile* : étude du processus de colonisation et d'hypervirulence de la souche épidémique 027. Thèse Doctorat Recherche : Microbiologie et thérapeutiques anti-infectieuses. Paris : Paris-Sud 11, 183 p.
- Bartlett J. G. (1996). Management of *Clostridium difficile* infection and other antibiotic-associated diarrhoeas. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 8(11), 1054–1061.
- Bassi R., Prakash P., Oyeteran A., Elsadek R., Loseke I., & Leibach J. R. (2023). A Review on *Clostridioides Difficile* Testing and How to Approach Patients With Multiple Negative Tests: A Case Report. *Cureus*.
- Bauer M., Kuijper E. J., & Van Dissel J. T. (2009). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI). *Clinical Microbiology and Infection*, 15(12), 1067–1079.
- Bélanger S., Boissinot M., Clairoux N., Picard F., & Bergeron M. G. (2003). Rapid Detection of *Clostridium difficile* in Feces by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(2), 730–734.
- Bertolo L., Boncheff A. G., Ma Z., Chen Y., Wakeford T., Friendship R. M., Rosseau J., Weese J. S., Chu M., Mallozzi M., Vedantam G., & Monteiro M. L. R. (2012). *Clostridium difficile* carbohydrates: glucan in spores, PSII common antigen in cells, immunogenicity of PSII in swine and synthesis of a dual *C. difficile*–ETEC conjugate vaccine. *Carbohydrate Research*, 354, 79–86.
- Blanckaert K. J. F., Barbut F., Carbonne A., Pujol, I., Thiolet J. M., Astagneau P., & Coignard B. (2007). Infections à *Clostridium difficile* PCR-ribotype 027 (ICD) : épidémiologie et gestion des risques. *Antibiotiques*, 9(4), 274–277.
- Braun V., Hundsberger T., Leukel P., Sauerborn M., & Von Eichel-Streiber C. (1996). Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene*, 181(1–2), 29–38.

- Brouwer M. S., Roberts A., Hussain H., Williams R., Allan E., & Mullany P. (2013). Horizontal gene transfer converts non-toxicogenic *Clostridium difficile* strains into toxin producers. *Nature Communications*, 4(1).

C

- Carter G. P., Lyras D., Allen D. T., Mackin K. E., Howarth P., O'Connor J., & Rood J. I. (2007). Binary Toxin Production in *Clostridium difficile* Is Regulated by CdtR, a LytTR Family Response Regulator. *Journal of Bacteriology*, 189(20), 7290–7301.
- Carter G. P., Rood J. I., & Lyras D. (2010). The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile*-associated disease. *Gut Microbes*, 1(1), 58–64.
- Chai C., Herschorn S., Imm G. S., Kim Y. H., & Oh W. (2017). Inactivation of *Clostridium difficile* spore outgrowth by synergistic effects of nisin and lysozyme. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(7), 43–638.
- Chapeton Montes, D. J. (2012). Influence de l'environnement sur le protéome de surface de *Clostridium difficile* : analyse globale et caractérisation de la cystéine protéase Cwp84 . Thèse Doctorat Recherche : Microbiologie et thérapeutiques anti infectieuses. France : Paris-Sud 11, 163 p.
- Chen N., & Shih S. (2011). Pseudomembranous Colitis. *The New England Journal of Medicine*, 364(5), e8.
- Chen P., Lam K. H., Liu Z., Mindlin F. A., Chen B., Gutierrez C. B., Huang L., Zhang Y., Hamza T., Feng H., Matsui T., Bowen M. D., Perry K., & Jin R. (2019). Structure of the full-length *Clostridium difficile* toxin B. *Nature Structural & Molecular Biology*, 26(8), 712–719.
- Chrisnanda R. H., & Wardhani P. (2019). The incidence of *Clostridium Difficile* infection in diarrhea patients after receiving antibiotics at Dr. Soetomo Hospital Surabaya. *Bali Medical Journal*, 8(2), 434–438.
- Chumbler N. M., Rutherford S. A., Zhang Z., Farrow M. A., Lisher J. P., Farquhar E. R., Giedroc D. P., Spiller B. W., Melnyk R. A., & Lacy D. B. (2016). Crystal structure of *Clostridium difficile* toxin A. *Nature Microbiology*, 1(1).
- Cohen S. H., Tang Y. J., & Silva J. (2000). Analysis of the Pathogenicity Locus in *Clostridium difficile* Strains. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(2), 659–663.

- Courvalin, P., Leclercq, R., Bingen, E. (2012). *Antibiogramme* 3e édition. Paris : ESKA. 800 p.
- Czepiel J., Drozd M., Pituch H., Kuijper E. J., Perucki W., Mielimonka A., Goldman S., Wultańska D., Garlicki A., & Biesiada G. (2019). *Clostridium difficile* infection: review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38(7), 1211–1221.

D

- Davies K. A., Ashwin H., Longshaw C., Burns D. J., Davis G., & Wilcox M. H. (2016). Diversity of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Europe : results from the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID), 2012 and 2013. *Eurosurveillance*, 21(29).
- Davis K. A., & Weiser J. N. (2011). Modifications to the Peptidoglycan Backbone Help Bacteria To Establish Infection. *Infection and Immunity*, 79(2), 562–570.
- Deshpande A., Pasupuleti V., Rolston D. D. K., Jain A. K., Deshpande N. V., Pant C., & Hernandez A. F. (2011). Diagnostic Accuracy of Real-time Polymerase Chain Reaction in Detection of *Clostridium difficile* in the Stool Samples of Patients With Suspected *Clostridium difficile* Infection: A Meta-Analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 53(7), 81–90.
- Dhalla I. A., Mamdani M., Simor A. E., Kopp A., Rochon P. A., & Juurlink D. N. (2006). Are Broad-Spectrum Fluoroquinolones More Likely To Cause *Clostridium difficile* - Associated Disease? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(9), 3216–3219.
- Drudy D., Fanning S., & Kyne L. (2007). Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. *International Journal of Infectious Diseases*, 11(1), 5–10.
- Dubberke E. R., Reske K. A., Olsen M. A., McMullen K. M., Mayfield J., McDonald L. C., & Fraser V. J. (2007). Evaluation of *Clostridium difficile*–Associated Disease Pressure as a Risk Factor for C difficile–Associated Disease. *Archives of Internal Medicine*, 167(10), 1092.
- Dupuy B., & Sonenshein A. L. (1998). Regulated transcription of *Clostridium difficile* toxin genes. *Molecular Microbiology*, 27(1), 107–120.

- Dupuy B., Govind R., Antunes A. P. M., & Matamouros S. (2008). *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *Journal of Medical Microbiology*, 57(6), 685–689.

E

- Eckert C., Coignard B., Hebert M., Tarnaud C., Tessier C., A L., Burghoffer B., Noël D., & Barbut F. (2013). Clinical and microbiological features of *Clostridium difficile* infections in France: The ICD-RAISIN 2009 national survey. *Médecine Et Maladies Infectieuses*, 43(2), 67–74.

F

- Fagan, R. P., Janoir, C., Collignon, A., Mastrantonio, P., Poxton, I. R., & Fairweather, N. F. (2011). A proposed nomenclature for cell wall proteins of *Clostridium difficile*. *Journal of Medical Microbiology*, 60(8), 1225–1228.
- Freeman J. C., Bauer M., Baines S. D., Corver J., Fawley W. N., Goorhuis B., Kuijper E. J., & Wilcox M. H. (2010). The Changing Epidemiology of *Clostridium difficile* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(3), 529–549.
- Freney, J., Renaud, F., Leclercq, R., Riegel, P. (2019). Collectif. Précis de bactériologie clinique. 3e édition. Paris : Editions Eska.

G

- Ganeshapillai J., Vinogradov E., Rousseau J. D., Weese J. S., & Monteiro M. L. R. (2008). *Clostridium difficile* cell-surface polysaccharides composed of pentaglycosyl and hexaglycosyl phosphate repeating units. *Carbohydrate Research*, 343(4), 703–710.
- Genth H., Dreger S., Huelsenbeck J., & Just I. (2008). *Clostridium difficile* toxins: More than mere inhibitors of Rho proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(4), 592–597.
- Gerding D. N., Johnson S., Rupnik M., & Aktories K. (2014). *Clostridium difficile* binary toxin CDT. *Gut Microbes*, 5(1), 15–27.
- Geric B., Johnson S., Gerding D. N., Grabnar M., & Rupnik M. (2003). Frequency of Binary Toxin Genes among *Clostridium difficile* Strains That Do Not Produce Large Clostridial Toxins. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), 5227–5232.
- Govind R., & Dupuy B. (2012). Secretion of *Clostridium difficile* Toxins A and B Requires the Holin-like Protein TcdE. *PLOS Pathogens*, 8(6).
- Grosjean, J., Clavé, D., Archambaud, M., Pasquier, C. (2017). Bactériologie et virologie pratique 3e édition revue et corrigée. Belgique : De Boeck supérieur. 312 p.
- Gülke I., Pfeifer G., Liese J., Fritz M. C., Hofmann F., Aktories K., & Barth H. (2001). Characterization of the Enzymatic Component of the ADP-Ribosyltransferase Toxin CDTa from *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*, 69(10), 6004–6011.

H

- Hall I. C., & O'Toole E. (1935). Intestinal flora in new-born infants with a description of a new pathogenic anaerobe, bacillus difficilis. *American Journal of Diseases of Children*, 49(2), 390-402
- Halvorson H., Schlett C. D., & Riddle M. A. (2006). Postinfectious Irritable Bowel Syndrome-A Meta-Analysis. *The American Journal of Gastroenterology*, 101(8), 1894–1899.
- Hayashi F., Smith K. M., Ozinsky A., Hawn T. R., Yi E. C., Goodlett D. R., Eng J. K., Akira S., Underhill D. M., & Aderem A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410(6832), 1099–1103.

- He D., Hagen S. J., Pothoulakis C., Chen M., Medina N., Warny M., & Lamont J. T. (2000). *Clostridium difficile* toxin A causes early damage to mitochondria in cultured cells. *Gastroenterology*, 119(1), 139–150.
- Hedge D. D., Strain J., Heins J. R., & Farver D. K. (2008). New advances in the treatment of *Clostridium difficile* infection (CDI). *Therapeutics and Clinical Risk Management, Volume 4*, 949–964.
- Hennequin, C., Janoir, C., Barc, M., Collignon, A., & Karjalainen, T. (2003). Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. *Microbiology*, 149(10), 2779–2787.
- Ho J. C., Greco A., Rupnik M., & Ng K. K. (2005). Crystal structure of receptor-binding C-terminal repeats from *Clostridium difficile* toxin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(51), 18373–18378.
- Hofman P. (2014). What place and what future for the pathology of infectious and tropical diseases in France?. *Annales De Pathologie*.

J

- Jacobs A., Barnard K. E., Fishel R. S., & Gradon J. D. (2001). Extracolonic Manifestations of *Clostridium difficile* Infections. *Medicine*, 80(2), 88–101.
- Janezic S., O'Connor J.R., Cerar T. (2020). Revised *Clostridioides (Clostridium) difficile* taxonomy - Opinion paper of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group for *Clostridioides difficile* (ESGCD). *Clinical Microbiology and Infection*, 26(6), 812-814.
- Jank T., & Aktories K. (2008). Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. *Trends in Microbiology*, 16(5), 222–229.
- Janoir C., Péchiné S., Grosdidier C., & Collignon A. (2007). Cwp84, a Surface-Associated Protein of *Clostridium difficile*, Is a Cysteine Protease with Degrading Activity on Extracellular Matrix Proteins. *Journal of Bacteriology*, 189(20), 7174–7180.
- Jiao Y., Ma Z., Hodgins D., Pequegnat B., Bertolo L., Arroyo L. G., & Monteiro M. L. R. (2013). *Clostridium difficile* PSI polysaccharide : synthesis of pentasaccharide repeating block, conjugation to exotoxin B subunit, and detection of natural anti-PSI IgG antibodies in horse serum. *Carbohydrate Research*, 378, 15–25.

K

- Karachewski N. O., Busch E. L., & Wells C. L. (1985). Comparison of PRAS II, RapID ANA, and API 20A systems for identification of anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 21(1), 122–126.
- Karjalainen T., Waligora-Dupriet A., Cerquetti M., Spigaglia P., Maggioni A., Mauri P., & Mastrantonio P. (2001). Molecular and Genomic Analysis of Genes Encoding Surface-Anchored Proteins from *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*, 69(5), 3442–3446.
- Karlsson S. K. F., Dupuy B., Mukherjee K., Norin E., Burman L. G., & Åkerlund T. (2003). Expression of *Clostridium difficile* Toxins A and B and Their Sigma Factor TcdD Is Controlled by Temperature. *Infection and Immunity*, 71(4), 1784–1793.
- Kaus G. M., Snyder L. F., Müh U., Flores M. J., Popham D. L., & Ellermeier C. D. (2020). Lysozyme Resistance in *Clostridioides difficile* Is Dependent on Two Peptidoglycan Deacetylases. *Journal of Bacteriology*, 202(22).
- Khanna S., & Pardi D. S. (2014). *Clostridium difficile* infection: management strategies for a difficult disease. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 7(2), 72–86.
- Khanna S., Pardi D. S., Aronson S., Kammer P. P., Orenstein R., St Sauver J. L., Harmsen W. S., & Zinsmeister A. R. (2012). The Epidemiology of Community-Acquired *Clostridium difficile* Infection: A Population-Based Study. *The American Journal of Gastroenterology*, 107(1), 89–95.
- Kundrapu S., Sunkesula V. C. K., Jury L. A., Sethi A. K., & Donskey C. J. (2012). Utility of Perirectal Swab Specimens for Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 55(11), 1527-1530.
- Kyne L., Warny M., Qamar A. A., & Kelly C. P. (2000). Asymptomatic Carriage of *Clostridium difficile* and Serum Levels of IgG Antibody against Toxin A. *The New England Journal of Medicine*, 342(6), 390–397.

L

- Lalande V., Barbut F., & Petit J. (2004). Diagnostic bactériologique des infections liées à *Clostridium difficile*. *Revue Française Des Laboratoires*, 2004(368), 57–63.

- Lall S., Nataraj G., & Mehta P. (2017). Use of culture- and ELISA-based toxin assay for detecting *Clostridium difficile*, a neglected pathogen: A single-center study from a tertiary care setting. *Journal of Laboratory Physicians*, 9(4).
- Lawler A. J., Lambert P., & Worthington T. (2020). A Revised Understanding of *Clostridioides difficile* Spore Germination. *Trends in Microbiology*, 28(9), 744–752.
- Lawson P. A., Citron D. M., Tyrrell K. L., & Finegold S. M. (2016). Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*, 40, 95–99.
- Lawson-Ananissoh L., Bouglouga O., Bagny A., Kaaga L., & Redah D. (2014). La fibroscopie digestive haute chez 2795 patients au centre hospitalier universitaire-campus de Lomé: les particularités selon le sexe. *The Pan African Medical Journal*, 19.
- Le Guern R, Wallet F. (2013). Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Annales De Biologie Clinique*, 71(4), 395–400.
- Le Guern, R. (2012). Détection de *Clostridium difficile* toxinogène par biologie moléculaire avec le BD Max CDiff RUO. Thèse Doctorat Recherche : Médecine générale. Lille : Lille 2, 62 p.
- Lemée, L., Bourgeois, I., Ruffin, E., Collignon, A., Lemeland, J., & Pons, J. (2005). Multilocus sequence analysis and comparative evolution of virulence-associated genes and housekeeping genes of *Clostridium difficile*. *Microbiology*, 151(10), 3171–3180.
- Li, C., Harmanus C., Zhu D., Meng X., Wang S., Duan J., Liu S., Fu C., Zhou P., Liu R., Wu A., Kuijper E. J., Smits W. K., & Fu L. (2018). Characterization of the virulence of a non-RT027, non-RT078 and binary toxin-positive *Clostridium difficile* strain associated with severe diarrhea. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1), 1–11.

M

- Mallozzi M., Viswanathan V., & Vedantam G. (2010). Spore-forming Bacilli and Clostridia in human disease. *Future Microbiology*, 5(7), 1109–1123.
- Markovska, R., Dimitrov, G., Gergova, R., & Boyanova, L. (2023). *Clostridioides difficile*, a New “Superbug.” *Microorganisms*, 11(4), 845.
- Maslennikov, R., Ivashkin, V., Ufimtseva, A., Poluektova, E. U., & Ulyanin, A. I. (2022). *Clostridioides difficile* co-infection in patients with COVID-19. *Future Microbiology*, 17(9), 653-663.

- Matamouros S., England P., & Dupuy B. (2007). *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Molecular Microbiology*, 64(5), 1274–1288.
- Matson, R. S. (2023). *ELISA: Methods and Protocols*. Hatfield : Humana Press. 244 p.
- McDonald L. C., Killgore G., Thompson A. M., Owens R. L., Kazakova S., Sambol S. P., Johnson S., & Gerding D. N. (2005). An Epidemic, Toxin Gene-Variant Strain of *Clostridium difficile*. *The New England Journal of Medicine*, 353(23), 2433–2441.
- McFarland L. V., Surawicz C. M., Greenberg R. E., Fekety R., Elmer G. W., Moyer K. A., Melcher S. A., Bowen K. L., Cox J. S., Noorani Z., Harrington G. W., Rubin M., & Greenwald D. A. (1994). A Randomized Placebo-Controlled Trial of *Saccharomyces boulardii* in Combination With Standard Antibiotics for *Clostridium difficile* Disease. *JAMA*, 271(24), 1913.
- Monnier A. L., Duburcq A., Zahar J., Corvec S., Guillard T., Cattoir V., Woerther P., Fihman V., Lalande V., Jacquier H., Mizrahi A., Farfour E., P M., Marcadé G., Coulomb S., Torreton E., Fagnani F., & Barbut F. (2015). Hospital cost of *Clostridium difficile* infection including the contribution of recurrences in French acute-care hospitals. *Journal of Hospital Infection*, 91(2), 117–122.

N

- Na X., Kim H., Moyer M. P., Pothoulakis C., & Lamont J. T. (2008). gp96 Is a Human Colonocyte Plasma Membrane Binding Protein for *Clostridium difficile* Toxin A. *Infection and Immunity*, 76(7), 2862–2871.
- Nakamura S., Nakashio S., Yamakawa K., Tanabe N., & Nishida S. (1982). Carbohydrate fermentation by *Clostridium difficile*. *Microbiology and Immunology*, 26(2), 107–111.
- Noori M., Azimirad M., Eslami G., Looha M. A., Yadegar A., Ghalavand Z., & Zali M. R. (2022). Surface layer protein A from hypervirulent *Clostridioides difficile* ribotypes induce significant changes in the gene expression of tight junctions and inflammatory response in human intestinal epithelial cells. *BMC Microbiology*, 22(1).
- Novakova E., Stofkova Z., Sadlonova V., & Hleba L. (2021). Diagnostic Methods of *Clostridioides difficile* Infection and *Clostridioides difficile* Ribotypes in Studied Sample. *Antibiotics*, 10(9), 1035.

O

- O'Connor J., Johnson S., & Gerding D. N. (2009). *Clostridium difficile* Infection Caused by the Epidemic BI/NAP1/027 Strain. *Gastroenterology*, 136(6), 1913–1924.
- Ortika B. D., Habib M., Dunne E. F., Porter B. J., & Satzke C. (2013). Production of latex agglutination reagents for pneumococcal serotyping. *BMC Research Notes*, 6(1).

P

- Pantaléon, V. (2015). Le biofilm de *Clostridium difficile* : rôle des protéines de surface. Thèse Doctorat Recherche : Microbiologie et thérapeutiques anti infectieuses. Paris : Paris-Sud 11, 198 p.
- Papatheodorou P., Carette J. E., Bell G. W., Schwan C., Guttentberg G., Brummelkamp T. R., & Aktories K. (2011). Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) is the host receptor for the binary toxin *Clostridium difficile* transferase (CDT). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(39), 16422–16427.
- Paredes-Sabja D., Shen A., & Sorg J. A. (2014). *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends in Microbiology*, 22(7), 406–416.
- Parker G. A., Daniel R. C., & Errington J. (1996). Timing and genetic regulation of commitment to sporulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 142(12), 3445–3452.
- Passmore I. J., Letertre M. P., Preston M. A., Bianconi I., Harrison M., Nasher F., Kaur H., Hong H. A., Baines S. D., Cutting S. M., Swann J. R., Wren B. W., & Dawson L. (2018). Para-cresol production by *Clostridium difficile* affects microbial diversity and membrane integrity of Gram-negative bacteria. *PLOS Pathogens*, 14(9).
- Peltier J., Courtin P., Meouche I. E., Lemée L., Chapot-Chartier M., & Pons J. (2011). *Clostridium difficile* Has an Original Peptidoglycan Structure with a High Level of N-Acetylglucosamine Deacetylation and Mainly 3-3 Cross-links. *Journal of Biological Chemistry*, 286(33), 29053–29062.
- Peng Z., Jin D., Kim H. S., Stratton C. W., Wu B., Tang Y., & Sun X. (2017). Update on Antimicrobial Resistance in *Clostridium difficile*: Resistance Mechanisms and

Antimicrobial Susceptibility Testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(7), 1998–2008.
<https://doi.org/10.1128/jcm.02250-16>

- Pépin J., Valiquette L., Alary M., Villemure P., Pelletier A., Forget K., Pépin K., & Chouinard D. (2004). *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *Canadian Medical Association Journal*, 171(5), 466–472.
- Pereira F., Saujet L., Tomé A. M., Serrano M., Monot M., Couture-Tosi E., Martin-Verstraete I., Dupuy B., & Henriques A. O. (2013). The Spore Differentiation Pathway in the Enteric Pathogen *Clostridium difficile*. *PLOS Genetics*, 9(10), e1003782.
- Permpoonpattana P., Tolls E. H., Nadem R., Tan S., Brisson A., & Cutting S. M. (2011). Surface Layers of *Clostridium difficile* Endospores. *Journal of Bacteriology*, 193(23), 6461–6470.
- Peterson L. E., Kelly P., & Nordbrock H. (1996). Role of culture and toxin detection in laboratory testing for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 15(4), 330–336.
- Pothoulakis C., & Lamont J. T. (2001). Microbes and Microbial Toxins: Paradigms for Microbial- Mucosal Interactions II. The integrated response of the intestine to *Clostridium difficile* toxins. *American Journal of Physiology-gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(2), G178–G183.
- Pruitt R. N., & Lacy D. B. (2012). Toward a structural understanding of *Clostridium difficile* toxins A and B. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2.

R

- Ramirez N., Liggins M. C., & Abel-Santos E. (2010). Kinetic Evidence for the Presence of Putative Germination Receptors in *Clostridium difficile* Spores. *Journal of Bacteriology*, 192(16), 4215–4222.
- Rancich M., & Roman C. (2019). Updated guidelines for diagnosing and managing *Clostridium difficile*. *JAAPA*, 32(2), 48–50.
- Razim A., Górska S., & Gamian A. (2023). Non-Toxin-Based *Clostridioides difficile* Vaccination Approaches. *Pathogens*, 12(2), 235.

- Reid C. M., Vinogradov E., Li J., Jarrell H. C., Logan S. K., & Brisson J. (2012). Structural characterization of surface glycans from *Clostridium difficile*. *Carbohydrate Research*, 354, 65–73.
- Rousseau C., Poilane I., Diakité F. L., Feghoul L., Cruaud P., & Collignon A. (2010). Comparaison de trois milieux pour la culture de *Clostridium difficile* : intérêt des milieux favorisant la germination des spores ? *Pathologie Biologie*, 58(1), 58–61.
- Rousseau C., Levenez F., Fouqueray C., Doré J., Collignon A., & Lepage P. (2011). *Clostridium difficile* Colonization in Early Infancy Is Accompanied by Changes in Intestinal Microbiota Composition. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(3), 858–865.
- Rupnik M., Wilcox M. H., & Gerding D. N. (2009). *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 7(7), 526–536.
- Ryan, K. J., & Ray, C. G. (2004). Sherris Medical Microbiology 4th Edition. USA : McGraw-Hill. 979 p.

S

- Sabri, A. (2019). Infections à *Clostridium difficile* : étude rétrospective. Thèse Doctorat Recherche : Pharmacie Hospitalière. Rouen : Rouen Normandie, 93 p.
- Salas, A. (2020). *Clostridioides difficile* et les perturbations du microbiote intestinal. Thèse Doctorat Recherche : Pharmacie Hospitalière. France : Clermont Auvergne, 113 p.
- Sambri V., Gateau C., Zannoli S., Dirani G., Couturier J., Buijs I., Roymans R. J. T. M., Hallet E., Arnold M., Zumoberhaus A., Steiner S., Van De Bovenkamp J. H., Altwegg M., Berlinger L., & Barbut F. (2020). Diagnosing *Clostridioides difficile* infections with molecular diagnostics: multicenter evaluation of revogene *C. difficile* assay. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*.
- Sartelli M., Di Bella S., McFarland L. V., Khanna S., Furuya-Kanamori L., Abuzeid N., Abu-Zidan F. M., Ansaloni L., Augustin G., Bala M., Ben-Ishay O., Biffi W. L., Brecher S. M., Camacho-Ortiz A., Caínzos M. A., Chan S., Cherry-Bukowiec J. R., Clanton J., Coccolini F., . . . Catena F. (2019). 2019 update of the WSES guidelines for management of *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection in surgical patients. *World Journal of Emergency Surgery*, 14(1).

- Scheffers D., & Pinho M. G. (2005). Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(4), 585–607.
- Schwan C., Stecher B., Tzivelekidis T., Van Ham M., Rohde M., Hardt W., Wehland J., & Aktories K. (2009). *Clostridium difficile* Toxin CDT Induces Formation of Microtubule-Based Protrusions and Increases Adherence of Bacteria. *PLOS Pathogens*, 5(10).
- Scott J. R., & Barnett T. C. (2006). Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and How They Get There. *Annual Review of Microbiology*, 60(1), 397–423.
- Sebahia M., Wren B. W., Mullany P., Fairweather N. F., Minton N. P., Stabler R. A., Thomson N. R., Roberts A., Cerdeño-Tárraga A., Wang H., Holden M. T. G., Wright A. L., Churcher C., Quail M. A., Baker S., Bason N., Brooks K., Chillingworth T., Cronin A., . . . Parkhill, J. (2006). The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nature Genetics*, 38(7), 779–786.
- Songer J. G. (2010). Clostridia as agents of zoonotic disease. *Veterinary Microbiology*, 140(3–4), 399–404.
- Stauffer, C.M., Pfeifer, C. (2023). Colonoscopy. États-Unis d'Amérique : Editions StatPearls.

T

- Tasteyre A., Barc M., Karjalainen T., Dodson P., Hyde S., Bourlioux P., & Borriello P. (2000). A *Clostridium difficile* gene encoding flagellin The GenBank accession numbers for the sequences reported in this paper are AF065259 (strain 79-685) and AF077341 (strain VPI 10463). *Microbiology*, 146(4), 957–966.
- Tasteyre A., Karjalainen T., Avesani V., Delmée M., Collignon A., Bourlioux P., & Barc M. (2001). Molecular Characterization of fliD Gene Encoding Flagellar Cap and Its Expression among *Clostridium difficile* Isolates from Different Serogroups. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(3), 1178–1183.
- Tedesco F. J., Barton R. A., & Alpers D. H. (1974). Clindamycin-Associated Colitis. *Annals of Internal Medicine*, 81(4), 429-433.
- Toth M., Stewart N. K., Smith C. A., & Vakulenko S. B. (2018). Intrinsic Class D β -Lactamases of *Clostridium difficile*. *MBio*, 9(6).

- Twine S. M., Reid C. M., Aubry A., McMullin D., Fulton K. M., Austin J. H. M., & Logan S. K. (2009). Motility and Flagellar Glycosylation in *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology*, 191(22), 7050–7062.

V

- Valiente E., Cairns M. D., & Wren B. W. (2014). The *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 lineage: a pathogen on the move. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(5), 396–404.
- Verity P., Wilcox M. H., Fawley W. M., & Parnell P. (2001). Prospective evaluation of environmental contamination by *Clostridium difficile* in isolation side rooms. *Journal of Hospital Infection*, 49(3), 204–209.
- Veyssiere, A. J. (2019). La résistance aux antibiotiques des bactéries les plus communément rencontrées dans les infections communautaires. Thèse Doctorat Recherche : Pharmacie. Bordeaux : Université de bordeaux, 105 p.
- Vollmer W., Blanot D., & De Pedro M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *Fems Microbiology Reviews*, 32(2), 149–167.
- Voth D. E., & Ballard J. D. (2005). *Clostridium difficile* Toxins: Mechanism of Action and Role in Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(2), 247–263.

W

- Wick M. R. (2019). The hematoxylin and eosin stain in anatomic pathology—An often-neglected focus of quality assurance in the laboratory. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 36(5), 303–311.

X

- Xiao Z., Chen H. S., Chen H., Wu L., Yang G., Wu Y., & He N. (2019). Advanced Diagnostic Strategies for *Clostridium difficile* Infection (CDI). *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 15(6), 1113–1134.

Y

- Yang Z., Zhang Y., Huang T., & Feng H. (2015). Glucosyltransferase activity of *Clostridium difficile* Toxin B is essential for disease pathogenesis. *Gut Microbes*, 6(4), 221–224.

Les sites web

- Downes, J., King, A. M. P., Hardie, J., & Phillips, I. (1999). Evaluation of the Rapid ID 32A system for identification of anaerobic Gram-negative bacilli, excluding the *Bacteroides fragilis* group. *Clinical Microbiology and Infection*. [en ligne], (consultée le 04/05/2023) [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)64406-2/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)64406-2/fulltext)
- Perez Bouza, M. A. (2022). *Clostridioides difficile* infection. *AMBOSS*. [en ligne], (page consultée le 24/04/2023) https://www.amboss.com/us/knowledge/Clostridioides_difficile_infection
- Wilcox, M., Miller M. (2015). *Clostridioides difficile* infections from diagnosis to outbreak management. *Biométrieux*. Pdf [en ligne], (consultée le 28/04/2023) <https://www.biomerieux.com/content/dam/biomerieux-com/medical-affairs/educational-booklets/clostridioides-difficile-infections-educational-booklet-offered-by-biomerieux.pdf>

Annexes

Annexe 1 : Fiche de renseignement vierge à remplir pour les suspicions d'ICD

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة الصحة والسكان وإصلاح المستشفيات
Ministère de la Santé de la Population et de la Réforme Hospitalière

Institut Pasteur d'Algerie



معهد باستور بالجزائر

Service des Bactéries Anaérobies et du Botulisme

FICHE D'ACCOMPAGNEMENT DE PRELEVEMENT POUR LA RECHERCHE DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE

Informations patient

Nom.....	Externe.....
Prénom.....	Hospitalisé.....
Sexe.....	Structure hospitalière.....
Age.....	Service.....
	Date d'admission.....

Nom et N° téléphone du médecin à contacter.....

Prélèvement :

Type de prélèvement : Selles

Biopsie

Autres prélèvements (préciser).....

Recueil dans pot pour coproculture propre et sec,
Transport à +4°C

Date de prélèvement :

Informations cliniques :

Date de début des signes...../...../..... Récidive : oui non

Si hospitalisé(e), préciser service occupé lors des premiers signes :

Diarrhées : oui non Nombre de selles/24H/..... Fièvre ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) : oui non

Douleurs abdominales : oui non Iléus : oui non

Hyperleucocytose (≥ 20000) : oui non

Diagnostic endoscopique de colite pseudomembraneuse : oui non

Diagnostic histo-pathologique de colite à *Clostridium difficile* : oui non

Diagnostic clinique suspecté (préciser).....

Traitement : Vancomycine..... oui non Date de début :

Métronidazole..... oui non Durée du traitement :

Autres (préciser)..... oui non

Chirurgie (colectomie par ex)..... oui non

Evolution : Favorable

Transfert en réanimation pour ICD Classification : cas simple

Décès dans les 30 jours cas sévère

Inconnue

Antécédents et facteurs de risque, dans les 30 jours précédant la date de début des signes

Antibiothérapie : oui non Si oui : durée..... quel ATB ?.....

Autres traitements : oui non Si oui : préciser.....

Proximité avec patient porteur de Cd : oui non même service même chambre

Chirurgie gastro-intestinale : oui non Préparation colique : oui non

Maladies associées :

Annexe 2 : Méthode de recherche de *C. difficile* dans les selles

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
 République Algérienne Démocratique et Populaire
 وزارة الصحة والسكان وإصلاح المستشفيات
 Ministère de la Santé de la Population et de la Réforme Hospitalière

Institut Pasteur d'Algerie

معهد باستور بالجزائر

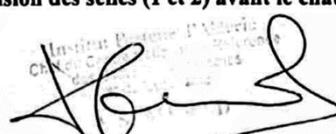
Laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme

FICHE TECHNIQUE

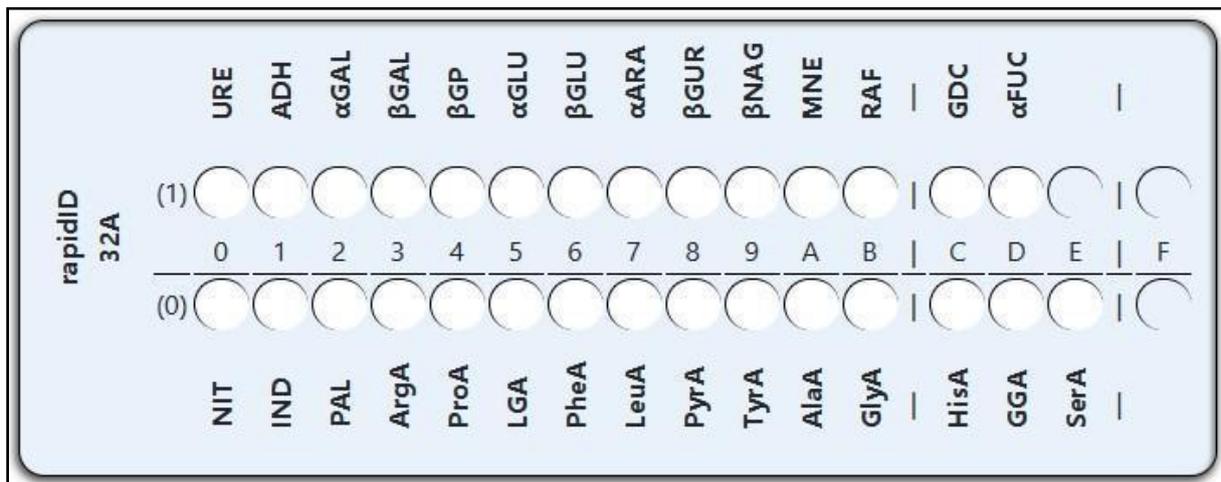
Recherche de Clostridium difficile dans les selles

- 1- Faire une suspension des selles dans l'eau distillée;
- 2- Homogénéiser la suspension au vortex ;
- 3- Chauffer la suspension pendant 10 mn à 80°C ;
- 4- Prendre 0,75 ml de la suspension chauffée et ajouter 0,25 ml de thioglycolate de sodium 1M ;
- 5- Ajuster à PH 10 avec la soude (NAOH) 1N;
- 6- Chauffer pendant 30 mn à 50°C ;
- 7- Isoler sur milieux : - TGY + Lysozyme (2µg/ml)
 - CCFA (Cyclosérine-Céfoxitine-Fructose-Agar)
 - Columbia + 5% de sang de mouton + 1ml de lysozyme

Remarque : isoler également sur milieu CCFA la suspension des selles (1 et 2) avant le chauffage.



Annexe 3 : Fiche de résultats vierge pour la galerie Rapid® ID 32 A



Annexe 4 : Tableau de lecture pour la galerie Rapid® ID 32 A

CUPULE	TEST	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTAT	
					NEGATIF	POSITIF
1.0	URE	urée	0,96	UREase	jaune	rouge
1.1	ADH	L-arginine	0,77	Arginine DiHydrolase		
1.2	αGAL	4-nitrophényl-αD-galactopyranoside	0,026	α-GALactosidase	incoloré	jaune
1.3	βGAL	4-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,052	β-GALactosidase		
1.4	βGP	4-nitrophényl-βD-galactopyranoside-β-phosphate-2CHA	0,034	β-Galactosidase 6 Phosphate		
1.5	αGLU	4-nitrophényl-αD-glucopyranoside	0,026	α-GLUcosidase		
1.6	βGLU	4-nitrophényl-βD-glucopyranoside	0,026	β-GLUcosidase		
1.7	αARA	4-nitrophényl-αL-arabino-furofuranoside	0,024	α-ARABinosidase		
1.8	βGUR	4-nitrophényl-βD-glucuronide	0,026	β-GlucURonidase		
1.9	βNAG	4-nitrophényl-N-acétyl-βD-glucosaminide	0,026	N-Acétyl-β-Glucosaminidase		
1.A	MNE	D-mannose	0,56	Fermentation de MaNnose		
1.B	RAF	D-raffinose	0,56	Fermentation de RAFFinose		
1.C	GDC	acide glutamique	0,056	Ac. Glutamique DéCarboxylase	jaune-vert	bleu
1.D	αFUC	4-nitrophényl-αL-fucopyranoside	0,024	α-FUCosidase	incoloré	jaune
1.E	-	cupule vide	-	cupule vide	-	-
1.F	-	cupule vide	-	cupule vide	-	-
0.0	NIT	potassium nitrate	0,14	Réduction des NITrates	NIT 1 + NIT 2 / 5 min < 10 min incoloré rouge	
0.1	IND	L-tryptophane	0,056	Production d'INDole	JAMES / 5 min < 10 min incoloré rose	
0.2	PAL	2-naphtyl-phosphate	0,04	Phosphatase ALcaline	FB / 5 min < 10 min incoloré pourpre	
0.3	ArgA	L-arginine-β-naphtylamide	0,056	Arginine Arylamidase	FB / 5 min < 10 min (ArgA → SerA) incoloré orange pâle orange	
0.4	ProA	L-proline-β-naphtylamide	0,048	Proline Arylamidase		
0.5	LGA	L-leucyl-L-glycine-β-naphtylamide	0,052	Leucyl Glycine Arylamidase		
0.6	PheA	L-phenylalanine-β-naphtylamide	0,048	Phénylalanine Arylamidase		
0.7	LeuA	L-leucine-β-naphtylamide	0,052	Leucine Arylamidase		
0.8	PyrA	acide pyroglutamique β-naphtylamide	0,044	Ac. Pyroglutamique Arylamidase		
0.9	TyrA	L-tyrosine-β-naphtylamide	0,052	Tyrosine Arylamidase		
0.A	AlaA	L-alanyl-L-alanine-β-naphtylamide	0,048	Alanine Arylamidase		
0.B	GlyA	L-glycine-β-naphtylamide	0,04	Glycine Arylamidase		
0.C	HisA	L-histidine-β-naphtylamide	0,048	Histidine Arylamidase		
0.D	GGA	acide L-glutamyl-L-glutamique β-naphtylamide	0,066	Glutamyl ac. Glutamique Arylamidase		
0.E	SerA	L-sérine-β-naphtylamide	0,04	Sérine Arylamidase		
0.F	-	cupule vide	-	cupule vide		

Annexe 5 : Fiche de résultats vierge pour la Galerie API® 20 A

API® 20 A	CE 07225 B	REF: _____ / ____ / ____ Origine / Source / Herkunft / Origen / Origen / Προέλευση Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :	BIOMÉRIEUX
Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / dra tester / Andre tests / Inne testy :		Ident. / Ταυτοποίηση	

Imprimé en France / Printed in France - Brand 20/01/2018

Annexe 6 : Tableau de lecture pour la galerie api 20 A

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
IND	L-tryptophane	0.98	INDole formation	<u>XYL - mix / 2-3 min + EHR / 5 min</u> yellow red	
URE	urea	0.648	UREase	yellow-orange	red
GLU MAN LAC	D-glucose D-mannitol D-lactose	1.96 1.96 1.96	acidification (GLUcose) acidification (MANnitol) acidification (LACtose)	BCP purple yellow / yellow-green	
SAC	D-saccharose (sucrose)	1.86	acidification (SACcharose)		
MAL	D-maltose	1.96	acidification (MALtose)		
SAL	salicin	1.64	acidification (SALicin)		
XYL	D-xylose	1.64	acidification (XYLose)		
ARA	L-arabinose	1.64	acidification (ARABinose)		
[GEL]	gelatin (bovine origin)	0.6	hydrolysis (protease) (GELatin)	no diffusion of pigment (1) yellow (2)	diffusion of black pigment (1) brown-black (2)
ESC	esculin ferric citrate	0.36 0.11	hydrolysis (β-glucosidase) (ESCuLin)	in UV (365 nm) fluorescence no fluorescence	
GLY CEL MNE MLZ RAF SOR RHA TRE	glycerol D-cellobiose D-mannose D-melezitose D-raffinose D-sorbitol L-rhamnose D-trehalose	1.82 1.86 1.96 1.96 2.18 2.18 1.96 1.96	acidification (GLYcerol) acidification (CELlobiose) acidification (ManNosE) acidification (MeLeZitose) acidification (RAFfinose) acidification (SORbitol) acidification (RHAMnose) acidification (TREhalose)	BCP purple yellow / yellow-green	
CAT		-	CATalase	After 30 min in air H ₂ O ₂ in a positive tube no bubbles bubbles	
SPOR		-	spores	absent	present
GRAM		-	Gram reaction	pink	violet
COCC		-	morphology	rod	coccus

Annexe 7 : Tableau des volumes des réactifs pour préparer un Mix PCR (A) optimisé pour l'amplification du gène *tcdA*, pour 4 réactions de 45 µl chacune

Réactif	Volume / 1 tube	Volume / 4 tubes
Tampon Taq	05 µl	20 µl
dNTPs	01 µl	04 µl
MgCl ₂	1.5 µl	06 µl
Amorce P533	0.5 µl	02 µl
Amorce P534	0.5 µl	02 µl
Taq Polymérase	0.5 µl	02 µl
Eau pure	36 µl	144 µl

Annexe 8 : Tableau des volumes des réactifs pour préparer un Mix PCR (B) optimisé pour l'amplification du gène *tcdB*, pour 4 réactions de 45 µl chacune

Réactif	Volume / 1 tube	Volume / 4 tubes
Tampon Taq	05 µl	20 µl
dNTPs	01 µl	04 µl
MgCl ₂	1.5 µl	06 µl
Amorce P1473	0.5 µl	02 µl
Amorce P1474	0.5 µl	02 µl
Taq Polymérase	0.5 µl	02 µl
Eau pure	36 µl	144 µl

Annexe 9 : Tableau des volumes des réactifs pour préparer un Mix PCR multiplex optimisé pour l'amplification des deux gènes *tcdA* et *tcdB*, pour 4 réactions de 22.5 µl chacune

Réactif	Volume / 1 tube	Volume / 4 tubes
Master Mix	12.5 µl	50 µl
GC enhancer	03 µl	12 µl
Amorce P533	0.5 µl	02 µl
Amorce P534	0.5 µl	02 µl
Amorce P1473	0.5 µl	02 µl
Amorce P1474	0.5 µl	02 µl
Eau pure	05 µl	20 µl

Annexe 10 : Nombre et pourcentage de souches résistantes et sensibles par rapport aux différents antibiotiques testés

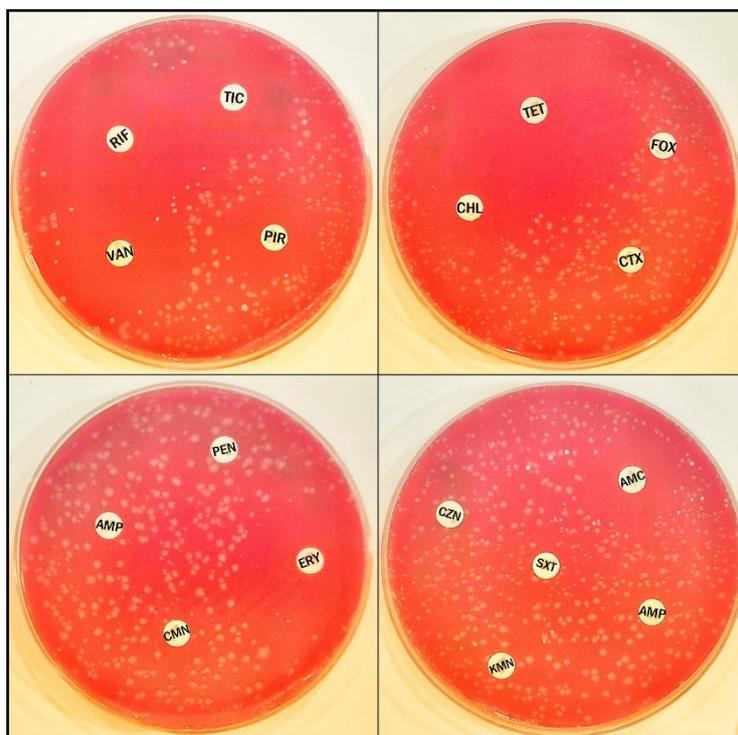
Antibiotique	Nombre de souches résistants	Nombre de souches sensibles	Pourcentage de résistance	Pourcentage de sensibilité
Ampicilline/Amoxicilline	2	10	16.66 %	83.33 %
Amoxicilline/Acide clavulanique	0	14	0 %	100 %
Céfazoline	13	0	100 %	0 %
Céfoxitine	14	0	100 %	0 %
Céfotaxime	13	0	100 %	0 %
Imipénem	8	6	57.14 %	42.84 %
Kanamycine	14	0	100 %	0 %

Clindamycine	11	4	73.33 %	26.66 %
Métronidazole	0	15	0 %	100 %
Vancomycine	0	15	0 %	100 %
Tétracycline	1	12	7.69 %	92.30 %
Sulfaméthoxazole	12	2	85.71 %	14.28 %
Rifampicine	2	11	15.38 %	84.61 %
Chloramphénicol	0	13	0 %	100 %

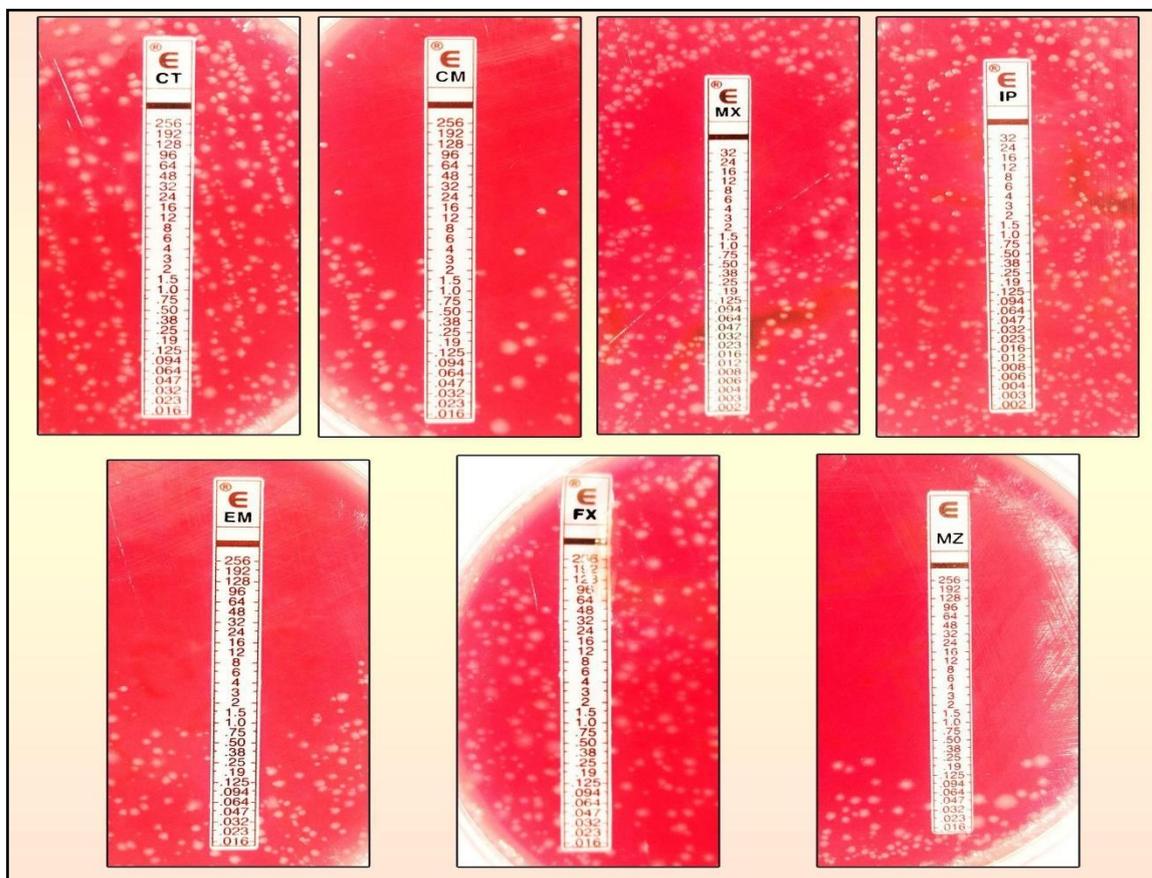
Annexe 11 : Tableau des valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour les bactéries anaérobies stricts à Gram positif (CA-SFM / EUCAST 2020)

Antibiotiques (suite)	Concentrations critiques (mg/L)			Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)			Notes Chiffres arabes pour les commentaires portant sur les concentrations critiques (CMI) Lettres pour les commentaires portant sur les diamètres critiques d'inhibition
	S ≤	R >	ZIT		S ≥	R <	ZIT	
Amoxicilline ^A	4	8		20	21	17		<p>A- La résistance à la pénicilline G, à l'amoxicilline et à la pipéracilline par production de β-lactamases a été décrite pour quelques souches de <i>Clostridium</i> (<i>C. buryricum</i>, <i>C. clostridioforme</i>, <i>C. ramosum</i>, <i>C. innocuum</i>, et de rares souches de <i>C. botulinum</i>). L'action des inhibiteurs de β-lactamase varient selon les espèces. La nitrocéphaline permet de mettre en évidence de ces β-lactamases.</p> <p>1/B. Pour évaluer la sensibilité, la concentration en acide clavulanique est fixée à 2 mg/L.</p> <p>Pour les diamètres compris entre 17 et 20 mm, déterminer la CMI si nécessaire.</p> <p>2/C. Pour évaluer la sensibilité, la concentration en tazobactam est fixée à 4 mg/L. Pour les diamètres compris entre 17 et 20 mm, déterminer la CMI si nécessaire.</p> <p>D. Pour les diamètres compris entre 18mm et 23 mm, déterminer la CMI si nécessaire.</p> <p>3/E. Lecture après 48h d'incubation. Pour les diamètres <15 mm déterminer la CMI si nécessaire.</p> <p>4/F. Interprétation valable pour le tédzolide. Pour les diamètres < 27 mm déterminer la CMI si nécessaire.</p> <p>G. Pour les diamètres < 21 mm déterminer la CMI si nécessaire.</p> <p>H. Pour les diamètres compris entre 14 et 19 mm, déterminer la CMI si nécessaire.</p> <p>J. Un disque à 4 µg est utilisable dans les mêmes conditions. Pour les diamètres < 15 mm déterminer la CMI sauf pour les bacilles non sporulés.</p> <p>Quelques souches résistantes sont décrites parmi les cocci : <i>P. anaerobius</i>, <i>A. prevotii</i>, <i>F. magna</i> et <i>P. micra</i>.</p> <p>Pour les diamètres compris entre 18 et 20 mm, déterminer la CMI si nécessaire</p> <p>La résistance a été décrite chez quelques espèces parmi les <i>Clostridium</i>, <i>C. innocuum</i>, <i>C. lavalense</i>, <i>C. ramosum</i> et chez</p>
Amoxicilline-acide clavulanique	4 ¹	8 ¹		20/10	21 ^B	17 ^B		
Pipéracilline-tazobactam	8 ²	16 ²		30/6	21 ^C	17 ^C		
Ertapénème	0,5	0,5			-	-		
Impénème	2	4		10	24 ^D	18 ^D		
Méropénème	2	8						
Clindamycine ³	4	4		2	-	15 ^E		
Linézolide ⁴	2	4		30	28 ^F	-		
Tigécycline	4	8		15	21 ^G	-		
Rifampicine	4	16		30	19 ^H	14 ^H		
Métronidazole	4	4		5 ^J	15	15		
Chloramphénicol	8	8		30	23	23		
Moxifloxacine	1	2		5	21	18		
Vancomycine		2		30		17		

Annexe 12 : Profil de sensibilité aux antibiotiques de *C. difficile*



Annexe 13 : Profil de sensibilité aux antibiotiques de *C. difficile* par bandelettes E-test



Annexe 14 : Les données des cas d'ICD positifs

N°	Age	Sexe	Lieu	Lieu d'hospitalisation	Manifestations cliniques	Maladies associées	Antibiothérapie	Antibiotiques reçus	Année
1	05 mois	F	Djelfa	Hospitalisé	/	Pneumocystose probable au VIH	/	/	2018
2	58 ans	M	Tizi ouzou	Hospitalisé	Diarrhée + Douleurs abdominales + Colite pseudomembraneuse	Hypertension artérielle + AVC ischémique + Diabète non insulino-dépendant	Oui	Vancomycine + Métronidazole + Amoxicilline/acide clavulanique + Tienam	2018
3	56 ans	F	Alger	Externe	Diarrhée sanglante + Douleurs abdominales	Rectocolite ulcéro-hémorragique	Oui	Amoxicilline/acide clavulanique	2018
4	56 ans	M	Guelma	Hospitalisé	/	/	/	/	2019
5	70 ans	M	Alger	Hospitalisé	Diarrhée post COVID	/	Oui	Ciprofloxacine + Céfotaxime	2020
6	80 ans	M	Alger	Externe	Diarrhée post-antibiotique	/	Oui	Vancomycine + Métronidazole + Ciprofloxacine + Azithromycine	2021
7	88 ans	M	Alger	Hospitalisé	Colite médicamenteuse	La COVID 19 (troubles pulmonaires)	Oui	Ciprofloxacine + Céfotaxime + Amoxicilline/acide clavulanique +	2021
8	65 ans	F	Alger	Hospitalisé	Diarrhée + Douleur abdominales + Fièvre + Hyperleucocytose	La COVID 19	Oui	Vancomycine + Métronidazole + Ciprofloxacine + Céfotaxime + Ceftazidime + Amikacine	2021
9	59 ans	M	Alger	Hospitalisé	Diarrhée + Fièvre + Amaigrissement	COVID 19	/	/	2022

(Suite de l'annexe 14)

10	28 ans	F	Alger	Hospitalisé	diarrhée 9/24 glairo-sanglante+ fièvre 39°C + hyperleucocytose + pancolite infectieuses + syndrome infectieux bio + leucocyte à $15 \cdot 10^3$ + CRP 248 + trouble ionique + hypoalbuminémie	/	Oui	non cité	2022
11	57 ans	M	jijel	Hospitalisé	diarrhée pseudomembraneuse 7/24 + fièvre + douleurs abdominales sévères	COVID 19	oui	Vancomycine + Métronidazole	2022
12	86 ans	M	jijel	Hospitalisé	diarrhée 9/24 + douleur abdo + collite pseudomembraneuse	RAS	Oui	Vancomycine + Métronidazole + C3G	2022
13	80 ans	F	jijel	Hospitalisé	diarrhée 6/24 + douleur abdo	RAS	Oui	Vancomycine + Métronidazole + C3G	2022
14	48 ans	F	jijel	Hospitalisé	diarrhée 6/24 + douleur abdo	RAS	Oui	Vancomycine + Métronidazole + Céfotaxime + Ciprofloxacine	2022
15	69 ans	F	Alger	Hospitalisé	diarrhée + douleur abdo	COVID 19 + IRCH + tuberculose ganglionnaire	Oui	Ciprofloxacine + Amoxicilline/acide clavulanique + Céfotaxime	2022
16	42 ans	M	Alger	Hospitalisé	diarrhée 8/24 + fièvre + douleur abdo	/	Oui	Métronidazole + Azithromycine + Ciprofloxacine	2022
17	74 ans	F	Alger	Hospitalisé	diarrhée 3/24 + fièvre + douleur abdo	RCH	Oui	Métronidazole	2022

Annexe 15 : Liste des antibiotiques à tester sur la bactérie *C. difficile*

Anaérobies stricts à Gram +	
Liste standard (EUCAST)	Liste complémentaire (CA-SFM)
Amoxicilline Amoxicilline-acide Clavulanique Pipéracilline/tazobactam Imipénème Clindamycine Moxifloxacine Métronidazole Vancomycine	Ertapénème Tigécycline Linézolide Rifampicine Chloramphénicol

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

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Moléculaire Des Microorganismes

Identification de *Clostridioides difficile* au laboratoire ; étude rétrospective

Résumé

Ce travail a pour objectif d'explorer les méthodes et les techniques d'isolement et d'identification de la bactérie *Clostridioides difficile* à partir d'échantillons suspects de selles diarrhéiques, caractériser la sensibilité de cette bactérie aux antibiotiques en utilisant l'antibiogramme par diffusion et la CMI par E-test, ainsi qu'à détecter les toxines A et B par PCR classique et duplex pour confirmer sa pathogénicité. *C. difficile* se manifeste par des colonies non hémolytiques de couleur grise, présentant une forme ronde et plate avec un bord irrégulier, une apparence granuleuse, une légère dépression au centre, une surface lisse et une odeur caractéristique de crottin de cheval. L'observation des frottis après coloration au bleu de méthylène et coloration de Gram a révélé la présence de bactéries à Gram positif prenant la forme de bâtonnets avec des extrémités légèrement pointues. Des spores subterminales peu déformantes étaient également présentes. Les tests d'identification biochimique, réalisés à l'aide du logiciel d'identification microbienne en ligne pour la galerie Rapid® ID 32 A et du répertoire analytique pour la galerie API® 20 A, ont confirmé de manière incontestable la présence de *C. difficile*, avec des pourcentages d'identification de 90,5 % et 99,9 % respectivement. Les tests d'identification par PCR classique et duplex ont montré l'apparition de deux bandes correspondant aux gènes *tcdA* et *tcdB*, avec des tailles de 358 pb et 440 pb respectivement. Ces résultats ont confirmé le caractère toxigène de *C. difficile* et son implication dans l'infection. L'étude de sensibilité aux antibiotiques, réalisée par l'antibiogramme standard et E-test, a révélé une résistance naturelle de *C. difficile* vis-à-vis à l'ampicilline/amoxicilline, à l'imipénème et à la kanamycine, confirmant ainsi le diagnostic. Une résistance acquise vis-à-vis au sulfaméthoxazole a également été observée, tandis que le reste des antibiotiques testés s'est révélé efficace (sensible). Enfin, une étude rétrospective multicentrique sur une période de cinq ans (2018-2023) a été menée pour analyser les infections à *C. difficile* dans la région nord de l'Algérie au laboratoire des "Bactéries Anaérobies et du Botulisme" de l'Institut Pasteur d'Alger. Cette étude a permis de recueillir des données précieuses sur cette pathologie bactérienne difficile à traiter. L'analyse des données a identifié les facteurs de risque associés à l'infection à *Clostridioides difficile*, tels que l'âge, le lieu et la durée d'hospitalisation, ainsi que l'antibiothérapie. L'étude a également examiné les méthodes de traitement utilisées, leur efficacité, et a permis d'observer les tendances et les schémas d'infection dans la région.

Mot clés : *Clostridioides difficile*, toxine A et B, toxine binaire, entéropathogènes, colite pseudomembraneuse

Membre du jury :

Présidente du jury :	SAKHRI ARAFA Nedjoua	(MCA - UFM, Constantine 1).
Encadreur :	BOUCHERIH Djahida	(Pharmacienne Microbiologiste - IPA, Alger).
Co-encadreur :	RIAH Nassira	(MCA - UFM, Constantine 1).
Examinatrice :	BOUCHELOUKH warda	(MCB - UFM, Constantine 1).

Présentée par : BENABID Fehd et BENNINI Ikram

Année universitaire : 2022 -2023