

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

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

Intitulé :

Initiation à la recherche sur la formation de biofilms par quelques bactéries cliniques isolées à partir des lésions du pied diabétique.

**Préparé par : ZOUAD Ahlem
SIARI Rim**

Le : 07 /10/2020

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : Dr ABDELAZIZ Ouided (MCB- UFM Constantine 1).

Encadreur : Dr BOUBEKRI Karima (MCA- UFM Constantine 1).

Examinatrice : Mme BOUCHLOUKH Warda (MAA- UFM Constantine 1).

Tutrice : Mme SOUDA Ibtihadj (Doctorante- UFM Constantine 1).

Année universitaire

2019- 2020

Résumé

Le diabète, maladie chronique et métabolique, est connu comme l'un des grands défis sanitaires du siècle. D'une manière progressive, cette maladie peut endommager le cœur, les vaisseaux sanguins, les yeux, les reins combinée à des lésions des pieds qui augmentent le risque d'ulcère du pied. Cette complication grave se caractérise par la formation du biofilm. À l'issu de ce travail, notre objectif est d'étudier la capacité de la formation du biofilm *in vitro* par dix souches bactériennes cliniques pures préalablement isolées des plaies infectées du pied chez des patients diabétiques par la méthode des tubes à essai TM. Les résultats obtenus ont montré que la majorité des souches testés ont donné des résultats positifs par production du biofilm dont une proportion de 70% (*Proteus SP*, *Morganella morganii*, et *Enterobacter cloacae... etc*), à l'opposé de restes des souches qui n'ont pas la capacité de produire du biofilm qui présentent 30% (*E. coli* et *Pseudomonas fluorescens.. etc.*) des souches testées. Cette production varie quantitativement d'une souche à une autre (forte, modéré, faible). La recherche du biofilm par cette méthode reste moins fiable par rapport aux les autres techniques moléculaires basées sur les analyses génomique et protéomique (PCR et électrophorèse). Nous avons besoins d'améliorer nos connaissances sur ces nouvelles moyennes afin de traiter les infections associées aux biofilms.

Mot clés : pied diabétique, plaie infectée, plaie chronique, biofilm, ulcère, méthode TM, bactéries cliniques, *in vitro*.

الملخص

يُعرف مرض السكري بأنه مرض أبيض مزمن، و يعتبر من أحد أكبر التحديات الصحية في هذا القرن. يمكن لهذا المرض أن يتلف تدريجياً القلب والأوعية الدموية والعينين والكلى بالإضافة إلى تلف القدم التي تزيد من خطر الإصابة بقرح القدم، فهذه المضاعفات الخطيرة ناتجة عن تكوّن الغشاء الحيوي. في هذا العمل هدفنا هو دراسة القدرة على تكوين الغشاء الحيوي في المختبر بواسطة عشر سلالات بكتيرية إكلينيكية نقية تم عزلها سابقاً من التهاب القدم لدى مرضى السكري عن طريق تجربة أنابيب الاختبار. أظهرت النتائج المتحصل عليها أن نسبة 70% (*Proteus sp, Morganella morganii*) و *Enterobacter cloacae* ... الخ) من السلالات المختبرة أعطت نتائج إيجابية بقدرتها على إنتاج الغشاء الحيوي، على عكس بقايا السلالات التي ليس لديها القدرة على إنتاج الغشاء الحيوي بنسبة 30% (*E.coli* و *Pseudomonas fluorescens*) من السلالات المختبرة، ويختلف هذا الإنتاج كمياً من سلالة إلى أخرى (قوية، متوسطة، ضعيفة). إن البحث عن الأغشية الحيوية بطريقة أنابيب الاختبار يبقى أقل موثوقية مقارنة بالتقنيات الجزيئية الأخرى القائمة على التحليلات الجينومية والبروتينية والرحلان الكهربائي... الخ. لذلك نحن بحاجة إلى تحسين معرفتنا بهذه الوسائل الجديدة من أجل علاج العدوى المرتبطة بالأغشية الحيوية.

الكلمات المفتاحية: القدم السكرية، الجرح المصاب، الجرح المزمن، الأغشية الحيوية، القرحة، طريقة الأنابيب، البكتيريا السريرية، وسط خارجي.

Abstract

Diabetes, a chronic and metabolic disease, is known as one of the great health challenges of the century. In a progressive way, this disease can damage the heart, blood vessels, eyes, kidneys combined with foot lesions that increase the risk of foot ulcers. This serious complication is characterized by the formation of biofilm. Our objective is to study the capacity of biofilm formation *in vitro* by ten pure clinical bacterial strains previously isolated from infected foot ulcers in diabetic patients using the test tube method (TM). The results obtained showed that the majority of the strains tested gave positive results by biofilm production of which a proportion of 70% (*Proteus* SP, *Morganella morganii*, et *Enterobacter cloacae*....etc.), as opposed to the remnants of the strains that do not have the capacity to produce biofilm which present 30% (*E.coli* et *pseudomonas fluorecsens*) of the strains tested. This production varies quantitatively from one strain to another (strong, moderate, weak). The search for biofilm by this method remains less reliable compared to other molecular techniques based on genomic and proteomic analysis (PCR and electrophoresis). We need to improve our knowledge of these new means in order to treat biofilm-associated infections.

Keywords: diabetic foot, infected wound, chronic wound, biofilm, clinical bacteria, *in vitro*.

Remerciements

Un remerciement spécial pour notre encadreur **Mme Boubekri karima** Maitre de conférences à la Faculté des SNV (Université Frères Mentouri Constantine 1), qui nous a beaucoup aidé et retenue la longue de la rédaction de ce mémoire et qui nous a orienté avec ses conseils et surtout merci pour sa patience. Merci pour votre gentillesse, vos précieux conseils et votre soutien à tous les instants, soyez rassuré de notre profonde gratitude et notre respectueuse considération vos qualités scientifiques et humaines resteront à jamais pour nous l'exemple.

Toutes nos gratitudes doivent aller également à Madame le **Dr ABDLAZIZ Ouided** (MCA) et **Mme BOUCHLOUKH Warda** (MAA) d'avoir accepté de juger ce travail.

Un grand merci va à madame **SOUDA Ibtihadj** pour toute l'aide qu'elle nous a apportée au cours de notre pratique, pour l'accueil et les orientations Pour sa compréhension et son soutien.

Dédicaces

Dès ma première année universitaire, j'ai passé par des moments assez difficiles et des situations pénibles, mais Dieu le tout puissant m'a donné la force de continuer chaque fois que je voulais abandonner en pensant qu'il était impossible d'avancer.

Ce modeste travail est dédié :

À l'homme le plus cher à mes yeux, merci d'être mon héros et un papa exceptionnel. Je ne te remercierai jamais assez.

A **ma mère**, le soleil de ma vie, ma sœur, ma meilleure amie et tout ce que j'ai de plus beau dans ce bas monde aucun mot ne pourrait décrire une créature angélique...merci d'être le pilier de ma vie je t'aime.

A mes **frères** Mohamed, Youcef et Yacine, ma force et le bonheur de tous les jours.

A ma tante zouad hanan pour son amour, son appui et son encouragement

À Ma cousine mouna maamar et ma grande sœur, merci d'avoir été là quand j'avais besoin de toi, merci de m'avoir aidé à choisir cette spécialité, j'apprécie vraiment cela.

A toute la famille ma grande mère mes tantes, mes oncles et mes cousines.

Mes copines, Nour, Hind et les deux sœurs Rania et saoussene et bien d'autres merci les filles d'être là pour moi, merci pour les beaux souvenirs, merci de me faire sourire.

Merci à tous.

ahlem

Je dédie ce travail :

A Dieu

A tout qui m'a donné la force, le courage de réaliser ce précieux travail.

Aux deux personnes les plus chères à mon cœur : ma mère et mon père qui m'ont supportée tout au long de ma vie, ma réussite, mon éducation.

A ma famille, à mes frères, à mes chères copines : Aya, Dounia, Asma, A mes amis et a toutes les personnes qui j'aime.

Rim

Table de matières

Introduction :	1
Chapitre I. Le syndrome du pied diabétique	4
1. Pied diabétique.....	4
1.1.La cellulite	4
1.2.L'ostéomyélite	5
1.3. Ulcération (ulcère du pied diabétique)	5
3. Épidémiologie sur la pathologie du pied diabétique	6
4. Physiopathologie du pied diabétique	7
4.1. la neuropathie	7
4.2. Artériopathie.....	7
4.3. Infection	8
Chapitre II. La microbiologie d'une plaie infectée	9
1. La notion d'une plaie infectée	9
1.1. Classification de l'infection des plaies du pied	9
2. Le microbiote du pied diabétique	9
2.1. Les facteurs influencent la composition d'un microbiote.....	11
Chapitre III. Plaies chroniques et biofilms	13
1. Biofilm	13
2. Formation du biofilm	14
2.1. Première étape adhésion (attachement).....	14
2.2. Deuxième étape l'adhésion irréversible	14
2.3. Troisième étape le développement précoce du biofilm	15
2.4. Quatrième étape maturité.....	15
2.5. Cinquième étape dissémination (phase de dispersion)	15
3.Impact du biofilm sur les plaies	15

Table de matières

Chapitre IV. Diagnostique	17
1.Prélèvement	18
1.1. Les signes d'infection	18
2.Les méthodes de prélèvements.....	19
2.1. La préparation de la plaie	19
2.2. La culture sur écouvillon	19
2.4. L'aspiration à l'aiguille fine	20
2.5. Biopsie tissulaire	21
2.6. Hémodisculture	21
3.Méthodes d'identification des isolats.....	22
3.1. Méthode basée sur la culture	22
3.2. Méthode moléculaire	23
3.2.2. PCR quantitative de l'ARN 16 s	24
Matériel et méthode.....	26
1. Cadre d'étude.....	26
2. Matériel	26
2.1. Souches bactériennes	26
2.2. Milieux de culture	27
3. Méthode	27
3.1. Techniques d'évaluation de la formation de biofilm <i>in vitro</i>	27
3.2. La méthode de tube à essai	28
3.3. Lecture 1	29
3.4. Lecture 2	29
1. Résultats et discussion	31
1.1. Evaluation de la formation du biofilm	31
Conclusion	43

Table de matières

Références bibliographique	44
---	-----------

Liste des abréviations

AOMI : artériopathie oblitérante des membres inférieurs.

BFRT : le Biofilm Ring Test.

CLSI : *Clinical and laboratory standard institut.*

DO : densité optique.

FEP : groupe pathogène fonctionnellement équivalent.

FID : la Fédération internationale de diabète

EPS : exo polysaccharides.

HTA : tabagisme, hypertension artérielle.

ICDF : *International Consensus on the Diabétique foot.*

IPD : les infections du pied diabétique.

IRM : l'examen radiologue.

LB : luria Bertani.

MNT : maladies non-transmissibles.

OMS : organisation mondiale de la santé.

PCR : la polymérase chaîne réaction.

RCA : la culture sur milieu rouge Congo.

TCP : méthode de Plaque de culture de tissus.

TM : la méthode en Tube.

UPD : ulcération du pied diabétique.

Liste des figures

Figure 1 : la cellulite infectieuse	4
Figure 2 : lésion clinique caractéristique d'une infection de pied diabétique : nécrose, lcération et purulence	6
Figure 3 : ulcères plantaires du pied avec une infection profonde de l'espace	8
Figure 4 : espèces bactériennes identifiées chez les patients souffrant d'un ulcère du pied diabétique ou d'une infection par des méthodes basées sur la culture (A) et des méthodes moléculaires (B)	11
Figure 5 : observation d'un biofilm bactérien sur une plaie	13
Figure 6 : les étapes du processus de formation du biofilm, y compris l'imagerie de chaque étape au microscope électronique à balayage	14
Figure 7 : radiographie du pied gauche de profil	17
Figure 8 : prélèvement par écouvillonnage	20
Figure 9 : prélèvement par écouvillonnage	20
Figure 10 : aspiration à l'aiguille	21
Figure 11 : évaluation de la production de biofilm par la méthode des tube (A : modérée, B : Absente, C : forte).....	29

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification de Wagner	9
Tableau 2 : Facteurs de variation du microbiote cutané (pied diabétique)	12
Tableau 3 : les souches bactériennes cliniques testées pour la formation de Biofilm.	26
Tableau 4 : composition du milieu LB.	27
Tableau 5 : Interprétation de la production du biofilm	29
Tableau 6 : Résultats des souches non productrices du biofilm.	32
Tableau 7 : résultats des souche productrices du biofilm modéré.	34
Tableau 8 : Résultats des producteurs forts du biofilm.	36
Tableau 9 : les résultats de la formation du biofilm des témoins.	38
Tableau 10 : les valeurs d'absorbances des isolats (DO 570 nm).	39
Tableau 11 : Les valeurs d'absorbance des témoins.	39
Tableau 12 : Les résultats de la formation du biofilm à partir de DO moyenne.	40

Introduction

Introduction

Introduction

Depuis les années 1990, notre pays connaît une transition épidémiologique accompagnée par une baisse de mortalités associées aux maladies infectieuses, et l'émergence des maladies chroniques non transmissibles (**Zekri, 2016**).

Le diabète, maladie chronique et métabolique, est connu comme l'un des grands défis sanitaires du siècle. Il se caractérise par une concentration accrue de glucose dans le sang. En Algérie, le nombre de personnes diabétiques avoisine les 4 millions (**Gardner, 2014**).

D'une manière progressive, cette maladie peut endommager le cœur, les vaisseaux sanguins, les yeux, les reins et les nerfs. Combinée à une circulation sanguine réduite, la neuropathie (lésion nerveuse) des pieds augmente le risque d'ulcères du pied. En effet, si une plaie s'infecte, l'amputation est une perspective très réelle à la suite de complications graves comme la gangrène (**OMS, 2020**), si les soins médicaux ne sont pas reçus rapidement.

La Fédération internationale de diabète (FID) mentionne qu'environ 5 % des diabétiques présentent une lésion chronique du pied (**Jeffcoate, 2009**).

Plusieurs équipes de recherche ont identifié la présence de biofilms dans les plaies chroniques qui contribuent à retarder la cicatrisation des plaies (**James et al., 2008 ; Malone et al, 2016**). Les résultats d'un examen et d'une méta-analyse systématiques confirment la présence de biofilm dans environ 78 % de toutes les plaies chroniques non cicatrisantes (**Malone et al., 2017**).

La visualisation microscopique combinée avec des approches moléculaires a confirmé l'omniprésence des biofilms polymicrobiens dans les ulcères du pied diabétique infectés et non cicatrisants et qui sont notoirement récalcitrants aux antibiotiques conventionnels (**Johani et al., 2017**).

La capacité de former un biofilm est maintenant reconnue comme une spécificité propre à plusieurs microorganismes. Cela entraîne le besoin d'étudier le biofilm et sa composante microbienne pour bien identifier les agents qui peuvent inhiber son développement et disperser ses agrégats bactériens.

La présente étude vise premièrement à comprendre le phénomène des plaies, à déterminer la microbiologie d'une plaie infectée, à faire le point sur le monde des biofilms bactériens dans

Introduction

les ulcères chroniques et à expliquer les méthodes de prélèvements et d'analyses par une recherche documentaire qui identifie le syndrome du pied chez les sujets diabétiques.

De plus, cette étude porte sur une initiation pratique à la recherche qui cible la formation des biofilms par quelques bactéries cliniques précédemment isolées à partir des lésions chroniques.

Synthèse bibliographique

Chapitre I. Le syndrome du pied diabétique

1. Pied diabétique

Le pied diabétique est défini comme le pied de patients diabétiques présentant une ulcération, une infection et / ou une destruction des tissus profonds, associée à des anomalies neurologiques et à divers degrés de maladie vasculaire périphérique dans le membre inférieur (selon la définition de l'Organisation mondiale de la santé, OMS).

L'expression « plaie du pied diabétique » fait référence à diverses infections comme la cellulite, l'ostéomyélite ou les ulcères. La lésion la plus caractéristique du pied diabétique est une ulcération mal perforante qui constitue par conséquent l'un des principaux facteurs de risque dans l'amputation (**Richard et Schuldiner, 2008; Badri et Tahri, 2016**).

1.1. La cellulite

La cellulite est définie comme étant une infection cutanée provoquée par des agents pathogènes comme le *Staphylococcus aureus*. Le point de départ est une lésion de la surface cutanée (plaie du pied diabétique) puis une colonisation bactérienne de cette dernière, cette infection intéresse surtout les membres inférieurs et supérieurs (**Bassetti et al., 2013**).

Le tableau clinique peut comprendre une douleur ; des signes cutanés ; et des signes généraux comme la fièvre dans ce cas une antibiothérapie peut être efficace pour éviter la dissémination rapide de l'infection (**figure 1**) (**Dhar, 2019**).



Figure 1 : la cellulite infectieuse (Redazione, 2019).

Synthèse bibliographique

1.2. L'ostéomyélite

Une infection de l'Os, due à un germe par voie sanguine (hématogène), cette infection se propage via une blessure, plaie infectée ou par la pénétration d'un corps étranger. L'infection peut s'étendre via les muscles et autres tissus. Imagerie par résonance magnétique (**L'IRM**) est l'examen radiologique le plus utilisé dans la détection des ostéomyélites du pied.

Le diagnostic d'infection se réalise à partir d'un prélèvement de tissu, la mise en culture des germes pour la détection et l'identification des caractéristiques d'un pied (**Donovan, 2010**).

1.3. Ulcération (ulcère du pied diabétique)

Le Consensus International sur le Pied Diabétique (International Consensus on the Diabetic foot, **ICDF**) définit l'ulcère comme toute lésion profonde située en dessous de la cheville, quelle que soit sa durée (**Lushiku, 2006**). Les ulcérations du pied sont fréquentes chez les patients diabétiques, près de 25 % des diabétiques présenteront au cours de leur vie une plaie et dans la majorité des cas, ces plaies vont s'infecter, ce qui conduira souvent à une amputation. (**Lavigne et al., 2011**).

L'ulcère est souvent localisé à la face plantaire de l'avant-pied et aussi aux endroits où il y a un frottement :

- La face dorsale du pied par frottement des chaussures.
- La partie latérale d'un orteil par conflit avec un autre.
- Le côté interne du 1er orteil ou métatarsien et côté externe du 5e orteil ou métatarsien par contact des chaussures.
- La face postérieure du talon par hyperpression surtout chez les patients alités.
- Le côté interne du 1er orteil ou métatarsien et côté externe du 5e orteil ou métatarsien par contact des chaussures.
- La face postérieure du talon par hyperpression surtout chez les patients alités (**Lushiku, 2006**).

Le risque de développer un ulcère du pied est considérablement accru par une diminution de la sensibilité (neuropathie) et une atteinte des vaisseaux sanguins (artériopathie) le pied n'est plus approvisionné correctement en sang, ce qui peut engendrer des nécroses (**Levegine et al., 2011**). Il est essentiel que le patient avec un ulcère du pied diabétique reçoive les meilleurs soins possibles (**figure 2**).



Figure 2 : lésion clinique caractéristique d'une infection de pied diabétique : nécrose, ulcération et purulence (Zanella, 2016).

2. Facteurs déclenchant l'ulcère du pied diabétique

Toutes les personnes atteintes de diabète sont exposées au risque d'ulcères du pied, qui peuvent avoir des causes multiples. Certains facteurs peuvent augmenter le risque d'ulcères du pied, notamment : (Healthline Editorial Team, 2016).

- Des chaussures mal ajustées ou de mauvaises qualités.
- Une mauvaise hygiène (ne pas se laver régulièrement ou complètement).
- La coupe incorrecte des ongles d'orteils.
- La consommation de tabac (qui inhibe la circulation sanguine).
- Les maladies cardiaques.
- Maladie rénale.
- L'obésité.
- La consommation d'alcool.
- Les maladies oculaires dues au diabète.

3. Épidémiologie sur la pathologie du pied diabétique

Le pied diabétique constitue un véritable problème de santé publique dans le monde en général, et dans notre pays en particulier.

Synthèse bibliographique

FID rapporte que la prévalence de cette maladie chronique dans le monde est passée à 9,3%, soit 463 millions de diabétiques en 2019 (**FID, 2019**).

En Algérie, la prévalence de diabète était de 8,9% de la population en 2010, elle montre une augmentation de 80% de taux de cette dernière en 2003 à 2017. En 2019, notre pays mentionne une diminution du taux de prévalence qu'était de 6,7%. Selon FID 4,2 millions de personnes diabétiques sont décédées en 2019. Des études épidémiologiques précédentes en 2010 montrent que les lésions du pied diabétique chez les hommes constituent la cause la plus fréquente d'amputation, ce s'explique la prédominance masculine du pied diabétique dans notre pays par rapport à les femmes. En Algérie, de gros efforts doivent encore développer pour améliorer la prévention, les diagnostics et la qualité des soins pour prévenir les graves complications (**Chabni et al, 2010**).

4. Physiopathologie du pied diabétique

Sur le plan physiopathologique, trois grands mécanismes sont à l'origine ou participent à l'évolution des lésions, ce sont la neuropathie périphérique, l'artériopathie des membres inférieurs, et l'infection.

4.1. La neuropathie

La neuropathie diabétique est une complication grave du diabète de type 1 et de type 2, se développe progressivement après plusieurs années d'un diabète. Elle toucherait en moyenne 30 % des patients. Les chercheurs pensent qu'avec le temps, l'hyperglycémie incontrôlée endommage les nerfs et interfère avec leur capacité à envoyer des signaux, ce qui conduit à la neuropathie diabétique. L'hyperglycémie affaiblit également les parois des petits vaisseaux sanguins (capillaires) qui alimentent les nerfs en oxygène et en nutriments (**Jeffcoate et Harding, 2003 ; Richard et Schuldiner, 2008**).

4.2. Artériopathie

L'artérite des membres inférieurs est aussi appelée artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI). L'AOMI est principalement due à une atteinte obstructive des artères des membres inférieurs souvent consécutive à des lésions athéromateuses. Ces lésions athéromateuses sont causées par un dépôt de lipides (cholestérol) sur la paroi interne des artères. L'artérite des membres inférieurs est fréquente chez le diabétique. On estime le risque d'artérite

Synthèse bibliographique

2 à 5 fois supérieur chez le diabétique par rapport au patient non-diabétique (**Fredenrich et al, 2004**).

L'évolution peut être parfois grave avec risque de gangrène, on estime que le risque d'amputation est présent chez 7 % des patients diabétiques. Cette atteinte est d'évolution lente, mais peut être accélérée par l'accumulation des facteurs de risque : tabagisme, hypertension artérielle (HTA), hypercholestérolémie, surpoids. L'âge est également un facteur de risque favorisant la survenue de lésions artérielles (**Fredenrich et al, 2004 ; Got, 2008**).

4.3. Infection

L'infection du pied diabétique se définit par l'invasion et la multiplication de microorganismes avec ou sans réponse inflammatoire. Les infections du pied sont des complications fréquentes de la maladie diabétique. En effet, l'infection touche un pied ulcéré et conduit fréquemment à une amputation. L'infection est plus fréquente au cours du diabète en raison d'un déficit de fonction des leucocytes. Ce déficit paraît lié à l'hyperglycémie (les glycémies excédant 2 g/l). La prise en charge de ces infections doit se réaliser au sein de centres spécialisés, par une équipe multidisciplinaire afin d'augmenter les chances de succès (**Senneville, 2008**).



Figure 3 : Ulcères plantaires du pied avec une infection profonde de l'espace

(**Besse et al., 2011**).

Synthèse bibliographique

Chapitre II. La microbiologie d'une plaie infectée

1 . La notion d'une plaie infectée

L'infection d'une plaie se caractérise par un phénomène de prolifération bactérienne, les germes sur une plaie se manifestent par l'augmentation de son nombre, c'est-à-dire par la multiplication suite à des divisions binaires (**Actusoins, 2018**). Toutes les plaies peuvent être contaminées par des microorganismes, mais le germe ne se multipliera pas, ni ne persistera, si les conditions nutritives et environnementales ne lui sont pas favorables c'est-à-dire elle ne perturbera pas la cicatrisation de la plaie. L'infection est caractérisée lorsque la prolifération des germes dans les tissus de l'hôte provoque des lésions cellulaires et des réactions immunitaires symptomatiques de l'hôte, ce qui entraîne une interruption de la cicatrisation de la plaie.

L'infection complique l'évolution d'une plaie chronique du pied diabétique, et augmente le risque d'amputation surtout lorsqu'elle est associée à une artérite des membres inférieurs et/ou une ostéite sous-jacente (**Senneville, 2008**).

1.1. Classification de l'infection des plaies du pied

Plusieurs classifications ont été proposées. Celle de Wagner (Tableau 1) est la plus utilisée, elle permet de définir six grades de gravité croissante basée sur l'extension de la lésion en surface et en profondeur.

Tableau 1 : Classification de Wagner (**Wagner, 1987**).

	Classification de WAGNER
Grade	Lésion
0	Pas de lésion, déformation, cellulite possible.
1	Ulcère superficiel.
2	Atteinte tendon ou capsule.
3	Lésion profonde avec infection.
4	Gangrène localisée à un orteil ou à l'avant-pied.
5	Gangrène globale du pied avec des lésions nécrotiques.

2. Le microbiote du pied diabétique

Le corps humain est recouvert de nombreux microorganismes ; on considère que les bactéries sont 10 fois plus nombreuses que nos propres cellules. L'ensemble des communautés bactériennes présentes dans un endroit donné forme le microbiote (ou microbiome). Le

Synthèse bibliographique

microbiote cutané est donc composé d'un ensemble de microorganismes (bactéries, archées, champignons, virus et acariens) résidant dans et sur la peau (**Sotto et al., 2015 ; Jneid et al., 2017**).

Les populations bactériennes de la peau peuvent être classées comme des résidents « transitoires » (infectant), ne faisant pas partie de la flore cutanée « normale », mais pouvant coloniser), et des résidents de la flore cutanée (commensaux), qui sont principalement des *Propionibacterium acnés*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium jeikeium* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Figure 4**).

Le rôle des bactéries commensales de la peau, dont le Staphylocoque à coagulase négative, *Corynebacterium* et *Propionibacterium*, qui sont considérées comme des bactéries apportant des avantages à l'organisme hôte, comme la régulation de la réponse immunitaire adaptative de l'hôte ou l'inhibition de la croissance des organismes pathogènes, peuvent également produire ou participer à des infections chroniques dans certaines conditions. Ont montré que des espèces non pathogènes ordinaires sont capables de collaborer et d'interagir, avec synchronisation, pour créer un « groupe pathogène fonctionnellement équivalent » (**FEP**) responsable de la chronicité de l'infection et du maintien du biofilm pathogène. Selon cette description, certaines espèces bactériennes considérées comme non pathogènes, lorsqu'elles sont seules ou incapables de maintenir une infection chronique par elles-mêmes, peuvent se cogérer en symbiose dans un biofilm pathogène et agir en synergie pour provoquer une infection chronique (**Jneid et al., 2017**).

Il a été démontré que par rapport aux pieds des hommes non-diabétiques, ceux des hommes diabétiques présentaient une diminution des populations de *Staphylococcus* spp., une augmentation des populations de *S. aureus* et une augmentation de la diversité bactérienne les pays occidentaux, les cocciques aérobies Gram positifs sont les principaux microorganismes, mais dans les pays plus chauds (notamment en Asie et en Afrique), les bacilles Gram négatifs sont plus répandus. Cela pourrait influencer la composition bactérienne du microbiote du pied diabétique. Le microbiote profond des plaies du pied diabétique est plus diversifié et plus complexe que le microbiote superficiel de la peau. Il y a une prédominance de bactéries pathogènes localisées dans la partie la plus profonde de la plaie, ce qui confirme la nécessité de collecter des échantillons de tissus profonds pour définir avec précision la microbiologie d'un pied diabétique (**Sotto et al., 2015**). Il a été signalé que les bactéries aérobies, telles que les corynébactéries, sont localisées dans les parties supérieures de la plaie, où la teneur en oxygène est relativement élevée, tandis que les anaérobies sont localisés dans des niches hypoxiques

Synthèse bibliographique

plus profondes créées par la consommation d'oxygène par les aérobies sus-jacents (Jneid *et al.*, 2017) .

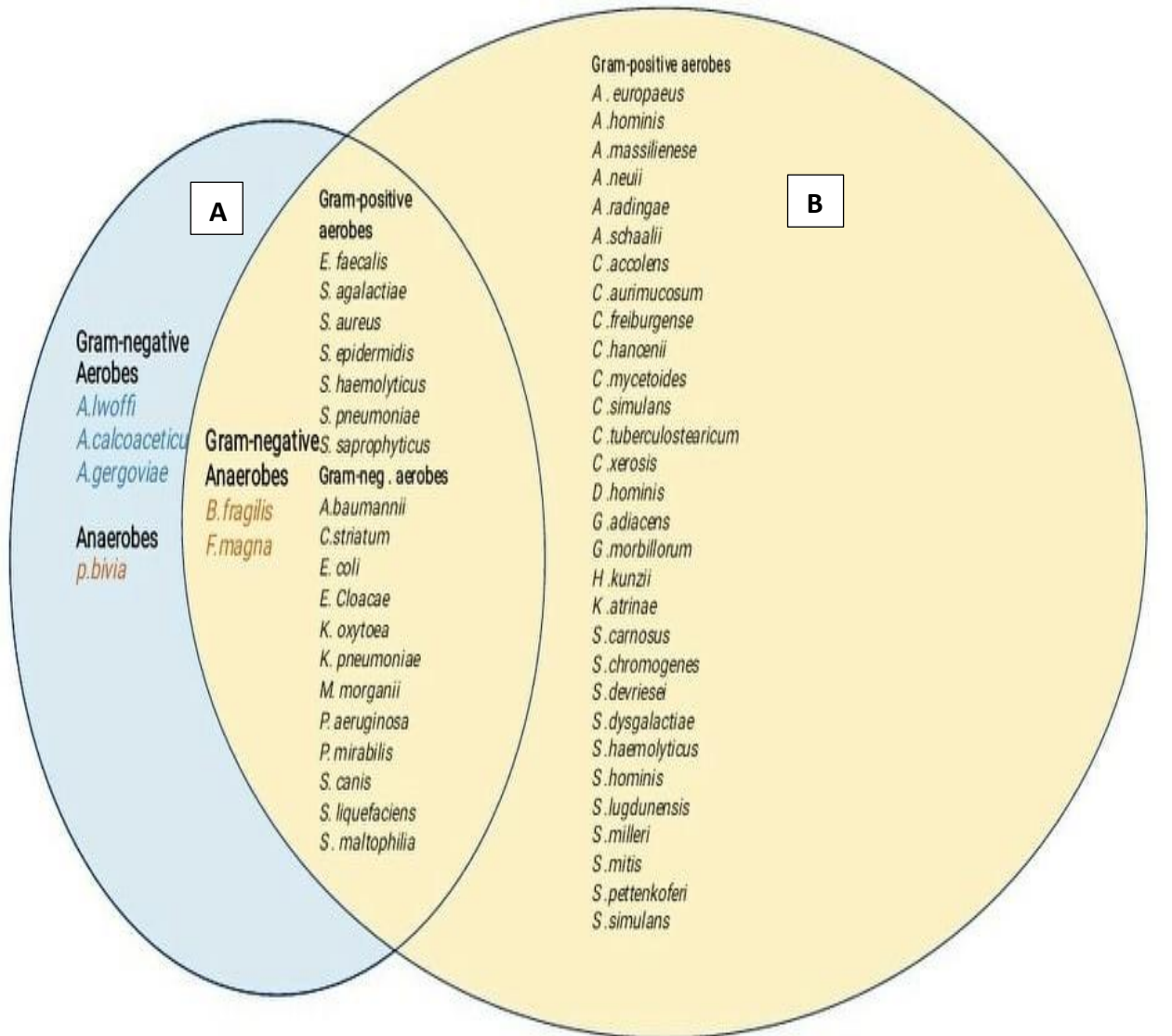


Figure 4 : espèces bactériennes identifiées chez les patients souffrant d'un ulcère du pied diabétique ou d'une infection par des méthodes basées sur la culture (A) et des méthodes moléculaires (B) (Jneid *et al.*, 2017).

2.1. Les facteurs influencent la composition d'un microbiote

Le microbiote du pied diabétique est influencé par plusieurs facteurs tels que : les caractéristiques démographiques telles que l'âge et le sexe, contribuent à la diversité microbienne observée au niveau de la peau. L'âge a un effet important sur le microenvironnement de la peau et, par conséquent, sur le microbiote. Les différences physiologiques et anatomiques entre les environnements cutanés masculins et féminins tels que

Synthèse bibliographique

la sueur, le sébum et la production d'hormones expliquent en partie les différences observées entre les deux sexes. Les facteurs environnementaux spécifiques à l'individu, comme la profession, le choix des vêtements et l'utilisation d'antibiotiques, peuvent moduler la colonisation par la flore microbienne de la peau. Les cosmétiques, savons, produits hydratants et d'hygiène sont également des facteurs pouvant contribuer à la variation du microbiote cutané. Une température élevée et de forts taux d'humidité sont associés à une augmentation des quantités de bactéries sur les pieds. De même, une humidité élevée et une faible température sont associées à un taux plus élevé de bactéries à Gram négatif sur les pieds, parce que les bactéries à Gram négatif nécessitent un environnement suffisamment humide pour survivre et proliférer (**tableau 2**) (**Sotto *et al.*, 2017**).

Le mauvais contrôle de la glycémie était lié à une plus grande abondance de staphylocoques et de streptocoques (**Jneid *et al.*, 2017 ; Sotto *et al.*, 2015**).

Tableau 2 : Facteurs de variation du microbiote cutané (pied diabétique) (**Sotto *et al.*, 2015**).

Généraux	Age, Sexe, Sites anatomiques, Facteurs génétiques
Environnementaux	Climat (température, taux d'humidité), Localisation géographique.
Immunitaires	Expositions antérieures, Inflammation, Statut immunitaire
Style de vie	Activité professionnelle. Hygiène
Autres	Pathologies sous-jacentes (ex : diabète sucré) Médicaments (antibiotiques, corticothérapie...), Cosmétique

Synthèse bibliographique

Chapitre III. Plaies chroniques et biofilms

1. Biofilm

Les plaies qui ne guérissent pas et n'atteignent pas l'intégrité anatomique et fonctionnelle après un mois sont généralement considérées comme des plaies chroniques (Wu *et al.*, 2019). Les principaux types de plaies chroniques sont les plaies diabétiques. Le traitement échoue souvent lorsqu'une infection se développe dans les plaies chroniques malgré des soins diligents, et l'une des principales raisons de l'échec du traitement dans les plaies chroniques est la formation de biofilms. Le biofilm est une organisation bactérienne particulière. Des bactéries initialement circulantes adhèrent au lit de la plaie et se regroupent de façon structurée (Figure 4) grâce à un procédé de communication inter bactérienne appelé quorum sensing (Fromantin *et al.*, 2017). Les bactéries se collent les unes aux autres par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice d'EPS. (Wolcott, 2011).

Dans les plaies chroniques, l'organisation en biofilm est très classique. Elle est notamment observée dans les ostéites du pied, une complication fréquente des plaies chez les patients diabétiques (Sotto *et al.*, 2015). Les infections liées à des biofilms touchent majoritairement les personnes légèrement ou fortement immunodéprimés et impliquent souvent des bactéries commensales comme *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (Roux et Ghigo., 2006). La présence de biofilm reste un facteur difficile qui contribue à retarder la guérison de nombreuses plaies chroniques. La menace principale des biofilms des plaies chroniques est leur protection substantielle contre les immunités de l'hôte et leur extrême tolérance aux agents antimicrobiens (figure 5).



Figure 5 : observation d'un biofilm bactérien sur une plaie (Fromantin *et al.*, 2017).

2. Formation du biofilm

Les processus impliqués dans la formation du biofilm ont été largement étudiés et subdivisés en cinq grandes étapes (l'adhésion, le développement précoce du biofilm, maturité, dissémination). L'adhésion microbienne peut se diviser en deux étapes distinctes : l'adsorption réversible et l'adhésion irréversible (**figure 6**).

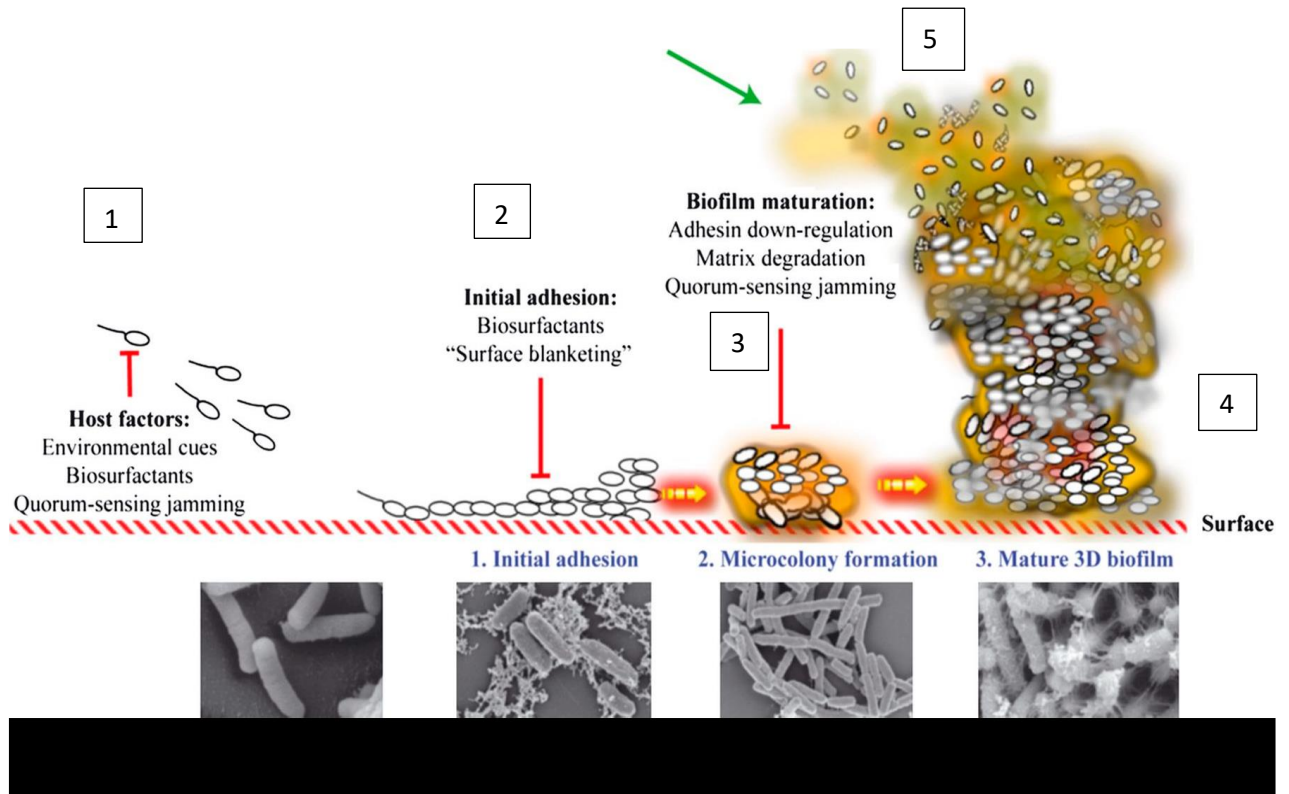


Figure 6 : les étapes du processus de formation du biofilm, y compris l'imagerie de chaque étape au microscope électronique à balayage (**Omar et al., 2017**).

2.1. Première étape adhésion (attachement)

L'adhésion réversible : est le premier contact entre les microorganismes et le support, la plupart des microorganismes planctoniques s'y attachent de manière réversible aux surfaces. L'adhésion est due à des interactions faibles entre surface et bactéries (interaction de type Van DerWaaals et électrostatistique et peuvent se détacher facilement. Ce phénomène est influencé par différentes conditions environnementales telles que : le pH, l'osmolarité du milieu, la température, oxygène, les nutriments et la nature de surface (**Nadji et Mizou, 2015**).

2.2. Deuxième étape l'adhésion irréversible

Une fois attachées, les bactéries débutent la sécrétion d'une matrice extracellulaire protectrice appelée EPS. Cette matrice permet la fixation des bactéries aux surfaces par des liaisons fortes

Synthèse bibliographique

de type hydrophobes, le nombre de cellules augmente et donc la distance entre les cellules est diminuée (Nadji et Mizou, 2015).

2.3. Troisième étape le développement précoce du biofilm

Les bactéries continuent de produire la matrice exo polysaccharide, qui joue un rôle important dans la protection des biofilms contre les agressions extérieures (Ammek *et al.*, 2019). En se divisant, les germes vont recouvrir toute ou une partie de la surface, formant de microcolonies qui sont considérées comme étant les unités fondamentales d'un biofilm. Durant cette phase la densité bactérienne atteint un certain seuil, qui permettra au quorum sensing de participer à la maturation du biofilm (Nadji et Mizou, 2015).

2.4. Quatrième étape maturité

Durant cette étape, Le biofilm atteindra une croissance exponentielle se traduisant par une augmentation importante de son épaisseur, jusqu'à former une structure tridimensionnelle. En condition optimale, il devient macroscopique et mature et se caractérise par la formation des canaux aqueux qui rendent possible l'acheminement d'oxygène et de nutriments dans les parties du biofilm (Ammek *et al.*, 2019).

2.5. Cinquième étape dissémination (phase de dispersion)

Certains microbes peuvent quitter le biofilm et retourner au mode de vie planctonique ce qui leur permet d'aller s'adhérer sur de nouvelles surfaces vivantes ou non. Soit un amas de cellules se détache, soit des cellules individuelles sortent du biofilm et cherchent un nouveau foyer. Ce dernier processus est connu sous le nom de « dispersion des semences » (Tremblay *et al.*, 2014).

3. Impact du biofilm sur les plaies

Au niveau des plaies, le biofilm entretient une :

- Réaction inflammatoire délétère pour la cicatrisation.
- Inactive les produits antimicrobiens (antiseptiques, antibiotiques) : l'EPS peut constituer une barrière physique et/ou chimique empêchant la pénétration des antibiotiques. La modification du microenvironnement peut également altérer l'efficacité des antibiotiques. Par ailleurs, la proximité des bactéries favorise le transfert horizontal des gènes notamment ceux de résistance augmentant donc le nombre de bactéries résistantes au sein du biofilm. Il est également admis que les bactéries sessiles peuvent intervenir :
- Dans la régulation des gènes de résistance notamment en augmentant leur expression. D'autres éléments ont encore été identifiés : comme les biofilms sont polymicrobiens, la sensibilité aux

Synthèse bibliographique

antibiotiques est souvent hétérogène ; certaines espèces étant sensibles à l'antibiotique donné et pas les autres. De plus, comme le biofilm est constitué de bactéries dont la croissance est ralentie, l'efficacité des antibiotiques est donc réduite ; ceci pouvant avoir des conséquences sur l'émergence de bactéries multirésistantes (**Sotto *et al.*, 2015**).

- **La résistance des bactéries aux défenses immunitaires de l'hôte :** le biofilm provoque une diminution de la pénétration des cellules phagocytaires à travers l'EPS, ce mécanisme peut expliquer la sévérité, la chronicité et les récurrences des plaies chroniques. En outre, le détachement des bactéries à partir du biofilm peut faciliter l'extension des infections notamment au niveau de l'os. Donc il y a des biofilms « protecteurs » (colonisation) et d'autres qui sont responsables d'infection (**Sotto *et al.*, 2015**).

Chapitre IV. Diagnostique

La prise en charge des infections associées aux maladies de pied diabétique doit se réaliser au niveau des centres spécialisés, afin de dépister et informer le patient de cette complication.

Le diagnostic de ces infections passe par plusieurs étapes bien déterminé :

- **Evaluation de la présence des signes locaux** telles que : l'inflammation local, la formation d'orifice et drainage, nature d'ulcération (profondeur et diamètre), l'odeur et la crépitation (**Lipsky *et al.*, 2004**).

Ces signes infectieux permettent de surveiller et prévenir le risque que présente le patient (**Chir, 2018**).

- **Evaluation de la présence de signes généraux** qui sont le plus souvent absentes telles que : la fièvre, frissons, etc.
- **Évaluation de l'atteinte vasculaire concomitante** telles que les gangrènes et, ischémie (**Frykber *et al.*, 2003**).

Autres examens complémentaires :

- **Biologiques** : formule sanguine complété FSC, sédimentation, PCR, glycémie.
- **Imagerie** : la réalisation de cette technique est permise d'évaluer la présence d'ostéite ou d'infection profonde, ou pour le suivi en utilisant la radiographie standard qui définit comme l'imagerie de référence pour le diagnostic des lésions ainsi que l'IRM qui est l'examen radiologique le plus utilisé surtout dans le cas d'ostéomyélite (**figure 7**).
- **Hémoculture** : usuelles dans le cas des symptômes et signes généraux.



Figure 7 : radiographie du pied gauche de profil (**Nicodème *et al.*, 2015**)

Synthèse bibliographique

1. Prélèvement

Le prélèvement de plaie permet d'isoler les micro-organismes responsables de l'infection, de les identifier, de déterminer leur sensibilité aux anti-infectieux et d'adapter le traitement. Pour les plaies superficielles, les prélèvements ont été réalisés par curetage-écouvillonnage après débridement mécanique. Pour les plaies profondes, des aspirations à l'aiguille fine, des biopsies tissulaires ou osseuses ont été effectuées (**Senneville, 2008**).

Le prélèvement est effectué par le prescripteur, ou par un biologiste, ou par une personne déléguée (infirmier, technicien, interne).

Le préleveur doit être respecté les règles de soins et d'hygiène, port de gants, blouses, et dans certains cas de masques ou lunettes de protection.

Il est informé des circonstances particulières par l'ordonnance ou la fiche de liaison. Lui-même doit transmettre les indications techniques du prélèvement sur une fiche de renseignements jointe aux échantillons destinés au laboratoire.

L'objectif des spécialistes dans le traitement des plaies est d'éliminer les infections car elles peuvent avoir de nombreuses conséquences négatives telles qu'une extension du temps d'hospitalisation. Une augmentation du risque d'état septique, la perte d'un membre et même le décès du patient (**Ababou et al., 2011**).

La présence d'une plaie infectée est une situation fréquemment rencontrée en maladies infectieuses. Pour la réalisation d'un prélèvement bactériologique des signes de risque locaux et généraux d'infection doivent être recherchés afin d'avancer dans le diagnostic de plaie infectée (**Meaume et Rothschild, 2015**).

1.1. Les signes d'infection

En règle générale, les prélèvements de plaie ne sont indiqués qu'en présence de signes d'accompagnement locaux : un écoulement ou du pus provenant de la blessure, une intensification de la douleur, Retard de la cicatrisation, et/ou des signes généraux clinique ou biologique.

- **Clinique** : Il regroupe :

- La fièvre.
- Des signes cardiaques : le système nerveux autonome augmente la fréquence cardiaque, ce qui entraîne une augmentation du pouls.
- Augmentation de la fréquence respiratoire.

Synthèse bibliographique

- Une anorexie plus ou moins prononcée. On trouve parfois une déshydratation qui peut être grave, Parfois, il y a splénomégalie, et hépatomégalie.
- On peut trouver une peau chaude et rouge et une sensation de chaleur (**Arista et Auch, 2011**).

• **Biologique**

- Augmentation des protéines de l'inflammation due à de l'hyperactivité du foie lors d'une maladie infectieuse.
- Hyperleucocytose.
- On peut trouver des signes d'anémie quand le taux d'hémoglobine dans le sang est inférieur à 12 g/dl parce que Parfois le germe agit directement sur le globule rouge (**Arista et Auch, 2011 ; Lefort et al., 2018**).

2. Les méthodes de prélèvements

Les modalités de prélèvements doivent tenir compte du niveau de l'infection qui peut être superficielle (épidermo-dermique ou touchant les annexes cutanés) ou profonde (dermo-hypodermique, osseux, articulaire ou musculaire) (**Courcol, 2017**).

2.1. La préparation de la plaie

Avant tout prélèvement, la plaie doit être préparée. Son débridement est indispensable au moyen d'une curette ou d'un scalpel stérile. Le débridement diminue la charge bactérienne locale et s'oppose aux conditions locales favorables à la prolifération bactérienne, à l'œdème d'origine inflammatoire et à ses effets délétères sur la perfusion tissulaire. Ensuite, un nettoyage de la plaie se fait à l'aide de compresses stériles imprégnées de sérum physiologique stérile (**Courcol, 2017**).

2.2. La culture sur écouvillon

C'est la technique la plus courante même s'il s'agit de la moins fiable, car elle est pratique, non invasive et économique. L'écouvillonnage consiste à passer un écouvillon de coton sur une surface de 1 cm de la plaie, dans un mouvement en Z combiné à une rotation (**Calhoun et al. 2002**). Ce prélèvement doit être pratiqué lors de plaies superficielles L'inconvénient de cette méthode est qu'elle recueille la totalité de la flore aérobie colonisant, notamment en cas de préparation du lit de la plaie non optimale c'est à dire peu adapté à la mise en évidence des bactéries réellement responsables de l'infection. De plus, les bactéries anaérobies sont

Synthèse bibliographique

difficilement isolables sur ce type de prélèvement (figure 8 et 9) (Arista et Auch, 2011 ; Boucher *et al.*, 2017).

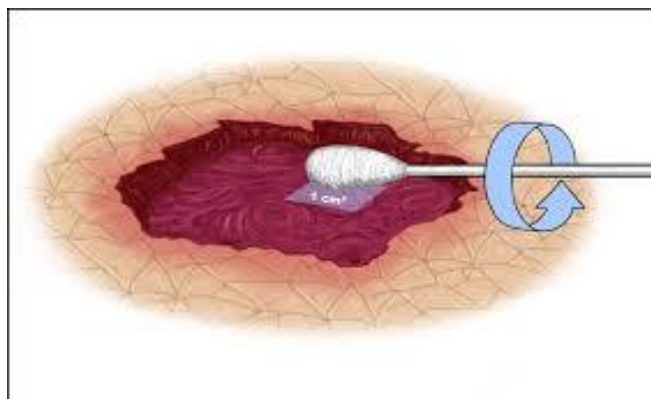


Figure 8 : prélèvement par écouvillonnage (Finge, 2020).

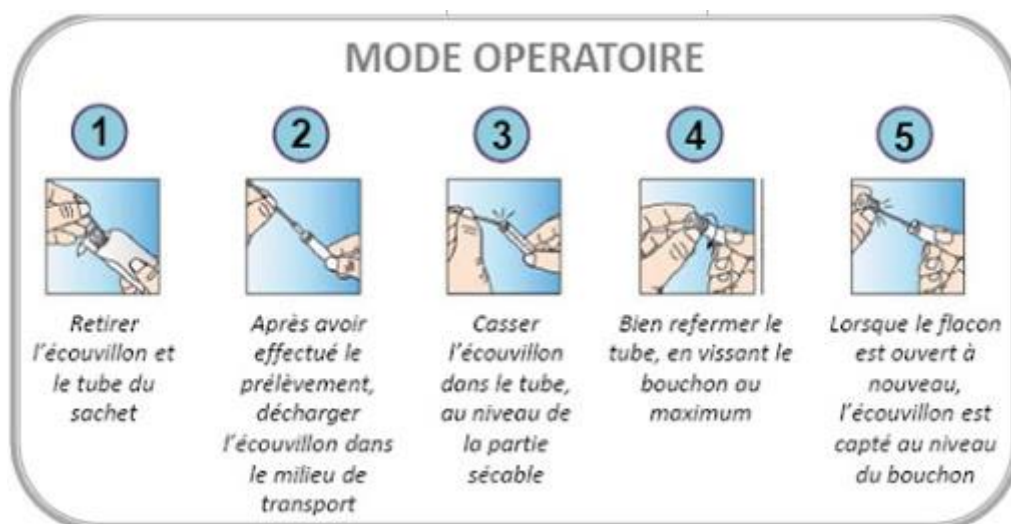


Figure 9 : prélèvement par écouvillonnage (Landis, 2009).

2.3. Le curetage écouvillonnage

Le curetage se fait par grattage du fond de la plaie au moyen d'une curette ou d'un scalpel stérile. Le prélèvement se fait ensuite en frottant avec un écouvillon le fond de la plaie débridée. Cette méthode est plutôt indiquée pour les prélèvements superficiels et les plaies anfractueuses profondes. Elle est plus spécifique qu'un écouvillonnage simple avec moins de bactéries colonisantes identifiées mais impose un débridement de bonne qualité (Boucher *et al.* 2017).

2.4. L'aspiration à l'aiguille fine

Tout liquide purulent, collecté dans un abcès profond, doit être aspiré à l'aide d'une aiguille Fine. La ponction doit être effectuée en passant par une zone cutanée saine bien désinfectée

Synthèse bibliographique

En l'absence d'obtention de liquide, 1 à 2 ml de sérum physiologique stérile peuvent être injectés puis réaspirés à l'aide d'une seconde aiguille immédiatement pour être analysés. La seringue ayant servi au prélèvement est envoyée au laboratoire sans l'aiguille, purgée d'air et bouchée hermétiquement et stérilement (**Boucher et al, 2017**).

Cette méthode est indiquée pour les plaies profondes collectées pour la recherche des bactéries anaérobies (**Boucher et al. 2017**). Les données fournies par l'aspiration à l'aiguille sont exprimées en unités formant colonie par volume de fluide., elle peut être douloureuse et sous-estimer le nombre d'isolats bactériens (**figure 10**).

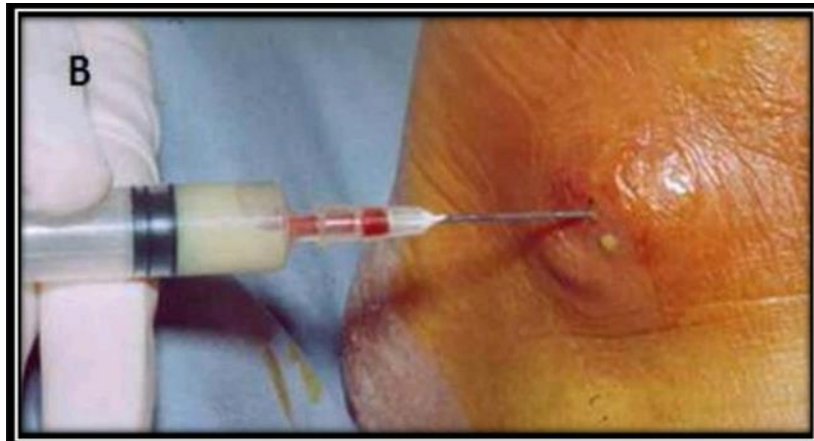


Figure 10 : aspiration à l'aiguille (**kourichi et moussaoui, 2018**).

2.5. Biopsie tissulaire

Deux ou trois fragments de tissus sont obtenus à partir de plusieurs zones : immédiatement déposés dans un tube stérile additionné de quelques gouttes de sérum physiologique stérile pour éviter la dessiccation des prélèvements. Elle n'est pas toujours envisageable et c'est une procédure invasive, douloureuse, coûteuse et complexe qui doit être effectuée par des spécialistes qualifiés et bien formés qui ne sont pas toujours disponibles. La biopsie se fait soit à l'aide d'un scalpel, soit d'un punch à biopsie. Il s'agit de la méthode à privilégier chaque fois que possible devant toute lésion tissulaire profonde (**Boucher et al. 2017**).

2.6. Hémoculture

L'hémoculture est la mise en culture du sang d'un malade pour y rechercher la présence éventuelle de micro-organismes (bactéries) responsables d'une infection et d'identifier ces bactéries.

Synthèse bibliographique

La présence de germes dans le sang du patient signifie qu'il existe chez le patient une bactériémie. Lorsque celle-ci s'accompagne d'un syndrome infectieux, on parle de septicémie. L'hémoculture permet donc de poser un diagnostic de septicémie, d'identifier le(s) germe(s) responsable(s) et de réaliser un antibiogramme pour orienter le médecin dans la prescription d'un traitement antibiotique efficace (**Lavigne et al., 2011**). Les tests sanguins, comme la numération leucocytaire, La vitesse de sédimentation des érythrocytes et le niveau de protéine C-réactive sont généralement demandés pour faciliter le diagnostic. Il a été démontré que les niveaux de protéine C-réactive sont élevés dans l'ulcération du pied diabétique, et d'autres protéines en phase aiguë, telles que la ferritine, l' α 1-antitrypsine et les haptoglobines, sont actuellement à l'étude. Les taux de glucose et d'hémoglobine A1c dans le sang peut augmenter en cas d'infection (**Hilton et al., 2004**).

3. Méthodes d'identification des isolats

La méthode utilisée pour l'identification bactérienne a un impact considérable sur l'analyse du microbiote du pied diabétique. Par exemple, dans une étude récente, le séquençage de l'ARNr 16S a permis de détecter beaucoup plus d'anaérobies que les techniques de culture classiques (86,9 % contre 23,1 %) et plus de bacilles Gram positifs (78,3 % contre 3,8 %) (**Jneid et al., 2017**).

3.1. Méthode basée sur la culture

La gestion optimale des infections du pied diabétique nécessite l'identification des bactéries et des tests de sensibilité aux antibiotiques afin d'ajuster le traitement antibiotique. Cependant, les résultats sont limités par le fait que ces méthodes sélectionnent les espèces qui donnent un rendement plus rapide dans des conditions restreintes. Cela ne tient pas compte de l'incapacité à identifier les organismes à croissance lente, fastidieuse ou anaérobie, et ne reflète pas nécessairement les bactéries les plus abondantes ou cliniquement importantes dans les infections du pied diabétique IPD (**Jneid et al., 2017**).

Ces méthodes ont identifié la plupart des bactéries aérobies à Gram positif, principalement des *Staphylococcus spp.* (24-35 %) et surtout *S. aureus* (47-55 %). Une incidence plus élevée d'aérobies Gram-négatifs (*P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*) et d'anaérobies a été trouvée dans les plaies les plus chroniques (**Jneid et al., 2017**).

Synthèse bibliographique

3.2. Méthode moléculaire

Les technologies microbiologiques moléculaires ont mis en lumière de nouvelles informations concernant les populations bactériennes dans les ulcères du pied diabétique (UPD). Actuellement, la PCR quantitative de l'ARNr 16S est utilisée pour déterminer la diversité bactérienne des plaies et estimer la charge bactérienne.

Les techniques de détermination de la biodiversité comprennent l'amplification ribosomique complète, le clonage et le séquençage de Sanger, l'amplification ribosomique partielle avec identification des bandes de gel et séquençage de Sanger et l'électrophorèse sur gel à gradient de densité.

Des études récentes suggèrent fortement que les techniques moléculaires, telles que l'amplification PCR de l'ARNr 16S, permettent d'identifier une plus grande diversité de bactéries que les méthodes de culture standard. En particulier, elles révèlent des anaérobies et des espèces Gram-négatives plus exigeantes.

De plus, les méthodes d'analyse métagénomique sur des séquences entières du génome ont étendu la capacité d'analyse de microbiomes complexes en permettant également l'identification de virus, de protozoaires et de champignons (Jneid *et al.*, 2017).

3.2.1. Stratégie en métagénomique

La **métagénomique** est la méthode d'étude du microbiote. C'est une technique de séquençage et d'analyse de l'ADN contenu dans un milieu. À l'inverse de la génomique qui consiste à séquencer un unique génome, la métagénomique séquence les génomes de plusieurs individus d'espèces différentes dans un milieu donné. Une analyse typique de métagénomique vous donnera la composition d'un microbiome. C'est à dire quelles espèces sont présentes, leurs abondances et leurs diversités. Il existe deux grandes stratégies de séquençage en métagénomique : la stratégie globale et la stratégie ciblée.

- **La métagénomique globale** consiste à fragmenter **tous** les ADNs présents dans un échantillon en courts fragments et les séquencer à l'aide d'un séquenceur haut débit.
- **La métagénomique ciblée** n'est pas de la métagénomique à proprement parler, mais de la métagénétique. Cette stratégie consiste à séquencer un unique gène au lieu d'un génome complet, ce gène doit être commun à plusieurs espèces tout en présentant des régions suffisamment variables afin de discriminer une espèce. En bactériologie, le gène utilisé est celui de l'ARN 16S. Il s'agit d'un gène présent uniquement chez les bactéries.

Synthèse bibliographique

Depuis 1985, l'utilisation des techniques de biologie moléculaire dans le diagnostic des maladies infectieuses est croissante. Elles permettent d'identifier une bactérie dans un produit pathologique ou une culture. Le principe sur lequel elles reposent consiste à amplifier un gène entier ou non, avec des amorces spécifiques, qui peuvent être ultérieurement révélées par électrophorèse sur gel ou capillaire, par hybridation, ou encore séquencées et comparées avec des séquences déposées dans des banques de données (par exemple, EMBL, NCBI, Bibi, Gene Bank) (Netgen, 2014).

3.2.2. PCR quantitative de l'ARN 16 s

L'ARN 16s est un composant des ribosomes bactériens. Les ribosomes constituent la machinerie de synthèse des protéines. Le gène qui code pour cet ARN 16 s contient des régions identiques chez toutes les bactéries et d'autres régions variables, spécifiques pour une espèce donnée. Il est ainsi possible de regarder la séquence spécifique pour pouvoir déterminer de quelle bactérie il s'agit (Perron, 2015).

Une amorce universelle est choisie, courte chaîne nucléotidique de 15 à 25 nucléotides, complémentaire de la séquence d'ADN connue à amplifier et située juste en amont de la zone à séquencer. Cette amorce est nécessaire à l'accrochage de l'ADN polymérase (Perron, 2015).

*Matériel
&
méthodes*

Matériel et méthode

1. Cadre d'étude

La partie pratique a été réalisée au laboratoire de microbiologie, à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie au niveau de l'Université Frères Mentouri - Constantine 1, à partir du 1er jusqu'au 12 mars 2020.

Notre objectif est d'étudier la capacité de formation de biofilm *in vitro* par dix souches bactériennes cliniques pures préalablement isolées (**tableau 1**) de plaies infectées du pied chez des patients diabétiques, et identifiées par des méthodes phénotypiques et antibiogramme.

2. Matériel

2.1. Souches bactériennes

Tableau 3 : les souches bactériennes cliniques testées pour la formation de Biofilm.

Numéro	Noms
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
2	<i>Escherichia coli</i>
3	<i>Staphylococcus epidemies</i>
4	<i>Raoultella terrigena</i>
5	<i>Serratia marsescens</i>
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>
7	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
8	<i>Morganella morganii</i>
9	<i>Enterobacter cloacae</i>
10	<i>Proteus sp</i>

Souches de référence :

- Souche A : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (témoin négative).
- Souche C : *Escherichia coli* ATCC 25922 (témoin négatif).

Matériel et méthodes

2.2. Milieux de culture

Le milieu Luria-Bertani (LB) a été utilisé sous forme de bouillon et gélose pour la culture des souches testées.

2.2.1 Composition du milieu

LB est un milieu de culture nutritif, servant initialement à la culture bactérienne. La tryptone et l'extrait de levure apportent les nutriments et cofacteurs utiles à une excellente croissance des souches. Le chlorure de sodium est aussi présent. L'agar est généralement ajouté à de la LB liquide pour la solidification du bouillon LB (**tableau :4**)

Tableau 4 : composition du milieu LB.

Tryptone	10 g
Extrait de levures	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g

Le pH à 25°C : 7,0 ±

Test de réadhésion sur tube (TM) :

- Tampon phosphate salin (Phosphate Buffered Saline **PBS**) pH 7,3.
- Crystal violet (CV) à 0,1 %.
- Éthanol (95 %).

3. Méthode

3.1. Techniques d'évaluation de la formation de biofilm *in vitro*

Il existe différentes méthodes pour détecter la production d'un biofilm, parmi lesquelles ; la méthode de culture de tissu *en* plaque (*Tissue Culture Plate méthode*, **TCP**), la méthode en Tube (*Tube Method*, **TM**), la culture sur milieu rouge Congo (*Congo Red Agar*, **CRA**), la *Biofilm Ring Test* (**BFRT**), la microscopie confocale à balayage laser (**MCBL**), la microscopie à fluorescence et la **PCR**.

Le criblage de la production du biofilm par les 10 souches a été réalisé par la méthode de tube à essai.

Matériel et méthode

3.2. La méthode de tube à essai

Cette méthode a été décrite par Christensen et son groupe de recherche en 1985. Le test en tube est la technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm (**Kelmani Chandrakanth *et al.*, 2008**).

Les souches ont été cultivées sur gélose LB et incubées à 37 °C pendant 24 heures. Une colonie de chaque boîte a été transférée dans un tube contenant 10 ml de bouillon LB à l'aide d'une anse de platine, ensuite incubée à 37 °C pendant 24 heures. Après cela, les cultures ont été diluées à 1 :10 dans un milieu fraîchement préparé. Un volume de 500 µl de chaque suspension bactérienne a été ajouté à un tube contenant 4,5 ml de milieu LB, puis incubé à 37 °C pendant 24 h. Trois tubes ont servi de témoins qui contiennent le bouillon uniquement. Des témoins positifs et négatifs de souches de référence ont également été inoculés.

Après 24 heures d'incubation, les tubes ont été décantés en tapotant doucement dans un récipient à déchets. Ensuite, le lavage est considéré comme une étape très importante afin d'éliminer les cellules non adhérentes, les tubes ont été lavés trois fois avec du PBS en utilisant une micropipette appropriée pour éliminer les bactéries planctoniques flottant librement. Puis, ils ont été séchés à l'air en positions inversées.

Chaque tube est ensuite coloré par le cristal violet CV (0.1 %) qui diffuse à travers les membranes bactériennes pendant 30 minutes. Après incubation à 37°C pendant 15min, l'excès de colorant est lavé avec de l'eau distillée stérile.

Les tubes étaient ensuite séchés en position inversée et observée pour la formation du biofilm. Le biofilm a été quantifié en mesurant la **DO** (Densité optique) à 570 nm du surnageant après la solubilisation du CV dans l'éthanol à 95 % pendant 15 minutes

Un spectrophotomètre (**UV-1280, Japan**) a été utilisé pour la mesure de DO à 570nm.

Dans un premier temps un tarage a été effectué à l'aide d'une cuve remplie de solvant.

Ensuite, la cuve a été rempli avec 3/4 de solution coloré à analyser afin de mesurer la valeur de DO. (Toutes les souches ont été testées en triplicata afin de minimiser les erreurs et de fournir une analyse fiable des données).

Remarque : un essuyage de la cuve a été effectué chaque fois pour éviter toutes sortes d'erreurs.

Matériel et méthode

3.3. Lecture 1

Lors de la formation d'un biofilm positif, un film coloré visible à l'œil nu est observé sur la paroi intérieure et le fond du tube (**Figure 11**). Les tubes sont examinés et la formation de biofilms a été notée comme absente (-), modérée (+) et forte (++).

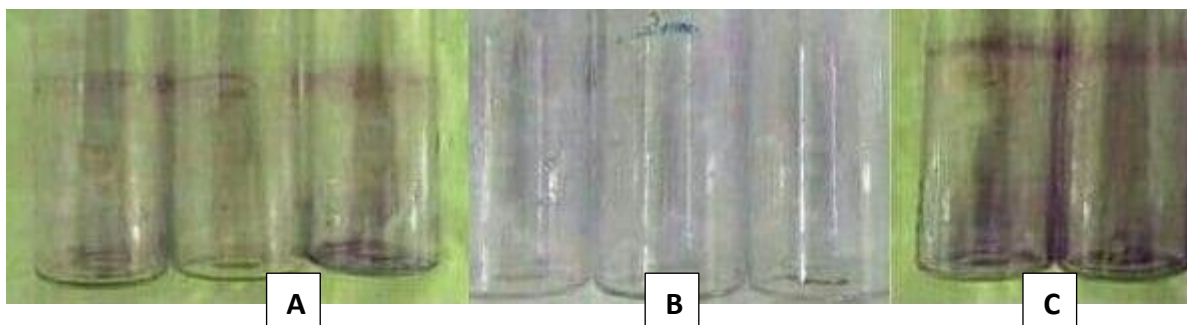


Figure 11 : Evaluation de la production de biofilm par la méthode des tube (A : modérée, B : Absente, C : forte).

3.4. Lecture 2

Le biofilm a été quantifié en mesurant la DO correspondante de la solution coloré contenant dans la cuve à 570 nm qui est l'indice des bactéries qui adhèrent à la surface et forme des biofilms. Pour chaque souche clinique testée, des tests de biofilm ont été effectués en trois exemplaires et la valeur moyenne d'absorbance du biofilm a été déterminée (**Tableau 5**).

Les valeurs moyennes de la DO doivent être calculées pour toutes les souches et pour la souche de contrôle négatif (souche A), puisque tous les tests sont effectués en trois exemplaires et répétés trois fois.

La valeur seuil (DOc) doit être établie. $DOc = DO \text{ moyenne du contrôle négatif} + (3 \times \text{l'écart type du contrôle négatif})$. La valeur finale de la DO d'une souche testée est exprimée en moyenne référence.

Tableau 5 : Interprétation de la production du biofilm (Afreenish *et al.*, 2011).

La valeur moyenne de la DO	Production du biofilm
$DO \text{ isolat} \leq DOc$	Non productrice
$DOc \leq DO \text{ isolat} \leq DOc \times 2$	Faible
$DOc \leq DO \text{ isolat} \leq DOc \times 4$	Modérée
$DO \text{ isolate} \leq DOc \times 4$	Forte

Résultats
&
Discussion

1. Résultats et discussion

1.1. Evaluation de la formation du biofilm

Dans notre étude, les souches isolées ont été testées pour leur capacité à former des biofilms. La méthode en tube TM a été établie par Christensen *et al.*, 1982.

Des méthodes classiques de la détection de la production de biofilm *in vitro* ont été établies, telles que la méthode quantitative de la microplaque 96puits et la méthode qualitative du Rouge Congo (**Mathur *et al.*, 2006**). Dans notre étude la détection de ce biofilm est basée sur la méthode en tube TM (**Christensen *et al.*, 1982**).

Les expériences réalisées dans cette étude nous ont permis de mesurer le taux d'adhésion et formation de biofilms des bactéries testées. Le processus de fixation des bactéries sur une surface disponible peut être biotique (vivant) ou abiotique (**Mathur *et al.*, 2006**) .

L'observation visuelle des tubes montre que parmi les souches étudiées, certaines souches sont capables de former un biofilm alors que certains sont incapable.

La formation d'un biofilm était considérée comme positive lorsqu'un film visible tapissait la paroi et le fond du tube (**Mathur *et al.*, 2006**).

Les tubes ont été examinés et la quantité de formation de biofilm a été notée comme :

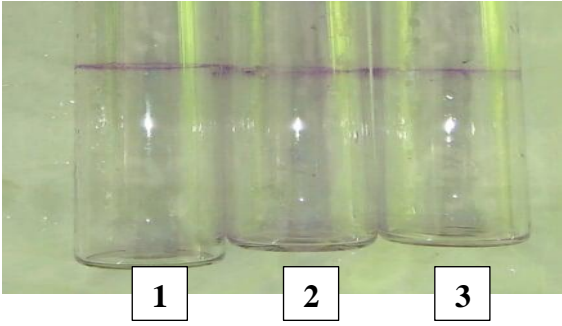
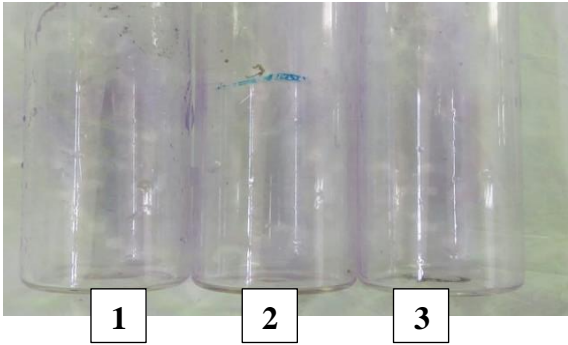
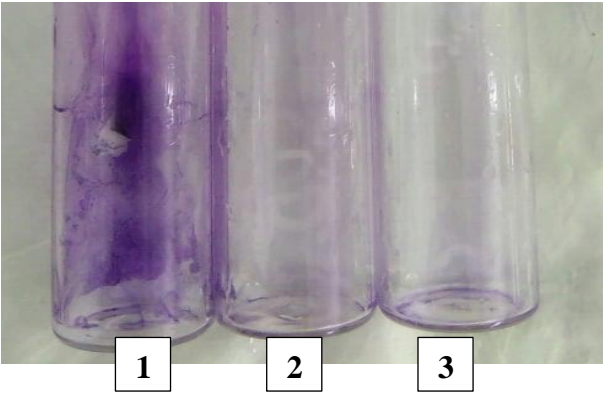
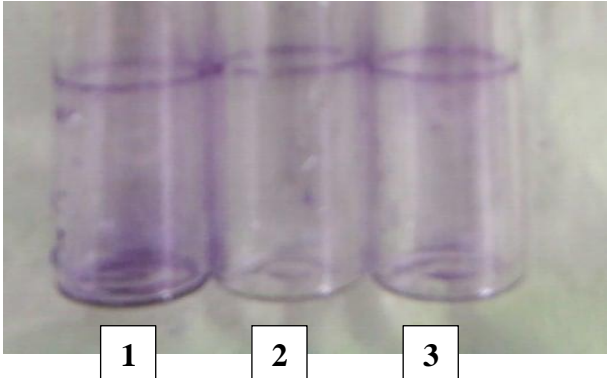
Absent (-), modérée (+) et forte (++). (Les expériences ont été réalisées en trois exemplaires et répétées trois fois).

Parmi les 10 isolats qui ont été utilisés, quatre souches ne sont pas productrices de biofilm (*pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* et *Raoultella terrigena*) trois sont des producteurs modérés (*Serratia marescens*, *Enterobacter aerogenese* et *Pseudomonas fluorescens*) et trois sont des producteurs importants *Morganella morganii*, *Enterobacter cloacae* et *Proteus* sp) (**tableau 5, 6 et 7**).

Les résultats obtenus ont montré que les souches **1, 2,3,4** n'ont pas formé de biofilm (**tableau 6**). D'autre étude de (**Nadji et Mizou, 2015**) ont montré que toutes les souches de *p.aeruginosa* ont la capacité de former de biofilm et leur observation se caractérise, non seulement par la présence d'un anneau, mais également par la présence d'un prolongement de la croissance cellulaire au fond de tube .

Résultat et discussion

Tableau 6 : Résultats des souches non productrices du biofilm.

	Nom de bactérie	Observation	Résultat
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Tube 1 : absence (-). Tube 2 : absence (-). Tube 3 : absence (-).
2	<i>E coli</i>		Tube 1 : absence (-). Tube 2 : absence (-). Tube 3 : absence (-).
3	<i>Staphylococcus aureus</i>		Tube 1 : modérée (+) Tube 2 : absence (-) Tube 3 : absence (-)
4	<i>Raoultella terrigena</i>		Tube 1 : modérée (+) Tube 2 : absence (-) Tube 3 : absence (-)

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène qui s'installe dans les tissus sous forme de biofilm, mais est également capable d'adhérer à des surfaces inertes. Elle existe rarement sous forme planctonique (libre) (Méar, 2014).

Les études de (Coban *et al.*, 2009) et (Banerjee, 2014) ont montré également la capacité des isolats cliniques de *P. aeruginosa* à produire des biofilms.

Comme *E. coli* une espèce cause de nombreuses maladies, elle peut aussi surviennent sous forme divers infections associés aux biofilms.

Des études réalisées antérieurement ont indiqué la formation de biofilm par des isolats cliniques d'*E. coli* dans des tests statistiques (Naves *et al.*, 2008). Des structures cellulaires de la surface telle que les flagelles aident à la formation du biofilm. Les résultats de ces études montrent que *E. coli* forme des biofilms dépendant la souche, la méthode (La méthode du Rouge Congo Agar, Méthode de plaque de culture de tissus (TCP) et la méthode en tubes) en tenant compte les conditions de cultures.

Les infections associées aux biofilms représentent 80% des infections nosocomiales et *S. epidimies* est l'un des agents pathogènes responsables à ces infections (Reffuveille *et al.*, 2017).

Cette pathogène a la capacité d'adhésion ce qui permet d'acquérir des résistances aux antibiotiques ainsi que la multi résistance.

Des études en 2012 montrent que le pouvoir de pathogénicité de cette bactérie est moins fréquent par comparaison avec *S. aureus*, mais la capacité de former du biofilm très mucoïdes lui permet de devenir un pathogène opportuniste. Ces travaux reposent surtout sur la prévalence de *S. epidimies* dans les infections chroniques (Oubekka, 2012).

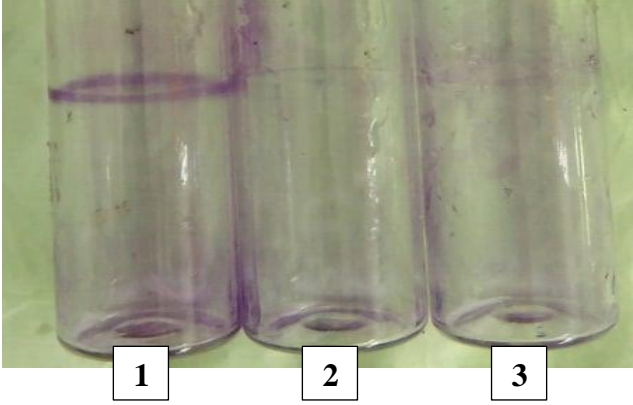
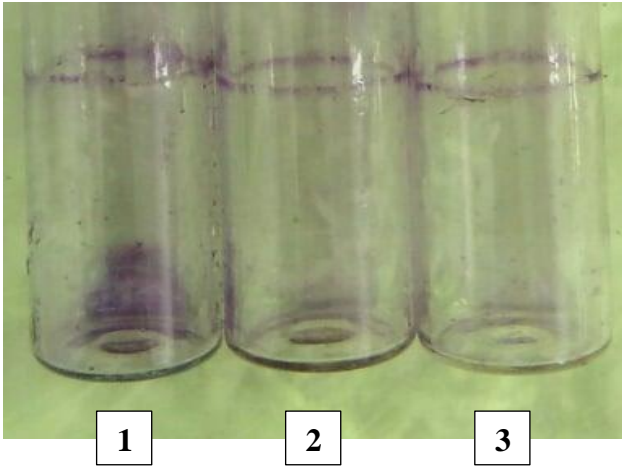
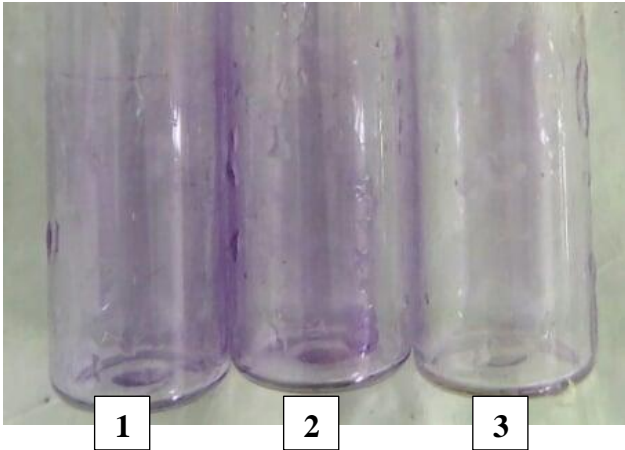
D'autres étude de (Christner *et al.*, 2009) décrivent l'identification des mécanismes de formation de biofilm de *S. epidimies*.

Les études sur l'espèce *Raoutella terrigena* sont très limitées, parce que l'identification correcte de cette bactérie est difficile dans le laboratoire de microbiologie clinique (Mudassar shaikh *et al.*, 2011). Cette bactérie est connue sous le nom de *Klebseilla terrigena* de la famille d'entérobactéries, elle se caractérise par la présence d'une capsule de polysaccharides qu'explique la résistance de nombreux mécanismes de défense de

Résultat et discussion

l'hôte. *Raoultella terrigena* est rarement identifiée dans les échantillons cliniques, n'a pas la capacité de produire des biofilms (Mudassar shaikh *et al.*, 2011).

Tableau 7 : résultats des souche productrices du biofilm modéré.

	Noms	Résultat	Observation
5	<i>Serratia marescens</i>		Tube1 : modérée (+) Tube2 : modérée (+) Tube3 : modérée (+)
6	<i>Enterobacter aerogenese</i>		Tube 1 : modérée (+) Tube 2 : modérée (+) Tube 3 : modérée (+)
7	<i>Pseudomonas fluoresens</i>		Tube 1 : modérée (+) Tube 2 : modérée (+) Tube 3 : modérée (+)

Les résultats nous ont montré que les trois souches *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes* et *pseudomonas fluorescens* ont été classés comme productrices de biofilm modéré (**tableau 7**).

Des études précédentes montrent que l'espèce *S. marcescens* a la capacité de former de biofilm et des exoenzymes qui sont les composants principaux majeurs de leur pathogénicité (**Shanks, 2008**).

Généralement, la majorité des souches d'*Enterobacter sp* se révèlent comme productrice de biofilm d'intensité significative, ce qui permet résistante aux antimicrobiens.

Leur capacité à adhérer est corrélée avec le niveau d'expression de l'ARNm des gènes CSGA et CSGD (**Bras et al, 2016**).

Des études ont indiqué que *Pseudomonas fluorescens* produit des biofilms sous forme des nappes extensives non périodiques extracellulaires de fibres de cellulose fines (**Baum et al., 2009**).

Cette bactérie a la capacité de se fixer à une surface dont le but d'assurer sa survie dans divers environnements.

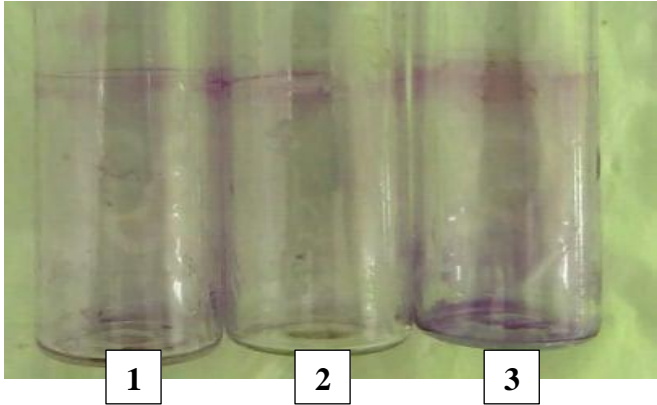
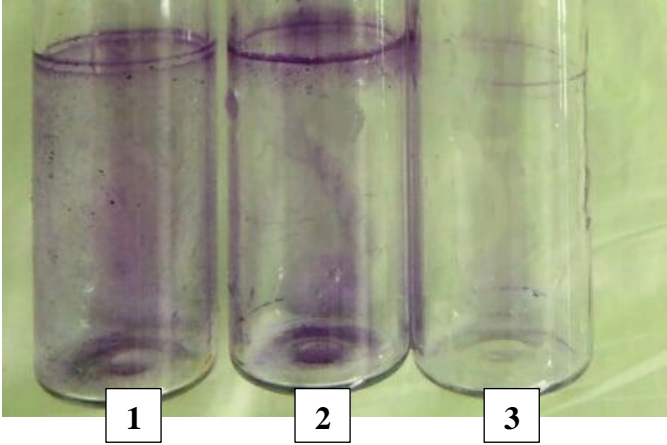
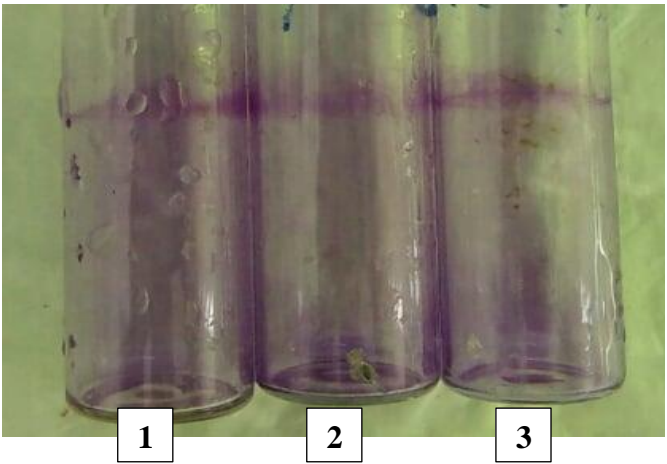
Les études précédentes ont montré que le gène LapD qui située à côté des protéines LapA ont un rôle plus important, en association avec la membrane externe de surface cellulaire dans la formation de biofilm par *Pseudomonas fluorescens* (**Hinsa, 2006**).

Les analyses génétiques ont montré que la formation de biofilm chez *P. fluorescens* peut se faire par de multiples voies de signalisation convergentes qui sont régulées par divers signaux environnementaux (**O'Toole et al, 1998**).

D'après les résultats observés les trois souches *Morganella morganii*, *Enterobacter cloacae* et *Proteus sp* ont la capacité de formé de biofilm (**tableau 8**).

On observe la formation du biofilm dans deux tubes de la souche *Morganella morganii*. *Morganella morganii* est un membre de la famille des *Enterobacteriaceae*, dont l'habitat naturel est le tractus gastro-intestinal humain. Elle provoque rarement une infection par lui-même et généralement rencontrée chez les patients immunodéprimés (**De et al., 2016**). (**Zubair et al., 2011**) ont montré que la souche *morganella morganii* était un producteur de biofilms .

Tableau 8: Résultats des producteurs forts du biofilm.

Noms	Résultat	Observation
<i>Morganella Morganii</i>		Tube 1 : modéré (+) Tube 2 : modéré (+) Tube 3 : forte (++)
<i>Enterobacter cloacae</i>		Tube 1 : forte (++) Tube 2 : forte (++) Tube 3 : modéré (+)
<i>Proteus sp</i>		Tube 1 : forte (++) Tube 2 : forte (++) Tube 3 : forte (++)

Les résultats obtenus dans les trois tubes ont démontré la capacité d'*Enterobacter cloacae* à former des biofilms.

Enterobacter cloacae est une bactérie Gram-négative qui appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Il a été rapporté qu'elle forme des biofilms dans la plupart des

environnements, provoquant des infections opportunistes et colonisant les appareils médicaux, étant l'un des dix pathogènes nosocomiaux les plus isolés (Zurob et al., 2019). L'étude de (Majtan et al., 2014) a été trouvée que *Enterobacter cloacae* est parmi les espèces bactériennes prédominantes dans les biofilms des ulcères de jambe veineux.

(Zurob et al., 2019) ont montré que la souche *Enterobacter cloacae* est une bonne formatrice de biofilm.

Le genre *Proteus* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, il existe plusieurs espèces de *Proteus*: *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. penneri*, *P. hauseri* et *P. myxofaciens*, *P. rettgeri*, et *P. providencia* (Rosalski et al., 2012).

L'étude de (Meriemeche et Nadir, 2016) a démontré la prédominance des biofilms monobactérien, formés par les entérobactéries ; *P. mirabilis*, *P. vulgaris*.

D'après l'étude de (Meriemeche et Nadir, 2016), les biofilms formés au niveau des plaies du pied diabétique ont été composés soit d'une seule espèce ou de plusieurs espèces bactériennes, qualifiés respectivement de biofilms mono-bactérien et biofilms mixtes, et le seul biofilm mixte qui est composé de deux bactéries « bi bactérien » à savoir *P. mirabilis* et *S. aureus*.

Une autre étude a également montré la capacité d'isolats cliniques de *P. aeruginosa* à produire des biofilms (Majtan et al., 2014).

Les souches de référence :

- Souche A : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (témoin négative).
- Souche C : *Escherichia coli* ATCC 25922 (témoin positive).

Les résultats obtenus ont montré que la souche « A » est incapable de former des biofilms. Alors que la souche « C » est capable de former le biofilm.

Lecture 2 : la mesure de DO 570 des isolats.

Les valeurs moyennes de DO obtenues par spectrométrie ont été converties en tableau (tableau 10 et 11). La grande valeur d'absorbance est notée pour les souches *E. coli* (DO=0,643), suivi par *Enterobacter cloacae*, *Proteus* sp et *Enterobacter aerogenes* sont respectivement : 0,639, 0,618 et 0,608. À l'opposé de souches *Pseudomonas aeruginosa* qui ont donné de faibles valeurs.

Résultat et discussion

(DO =0,283). Les valeurs de densités optiques des souches restantes *pseudomonas fluerescens*, *raoutella terigena*, *serratia marescene*, *morganella morganii* sont respectivement : 0,343, 0,464, 0,467 et 0,442.

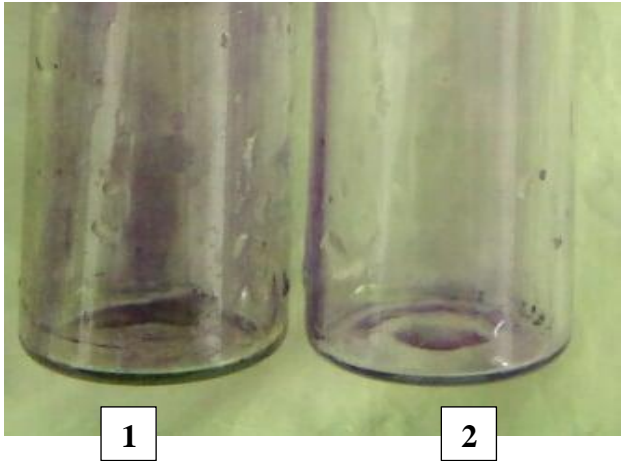
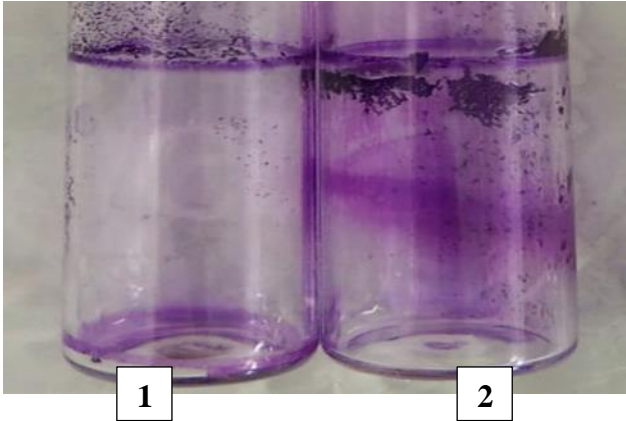
Calculution du DO (contrôle)= DOc.

La valeur moyenne de la souche de contrôle négative +(3 x l'écart type).

L'écart type de notre souche est : 0,009.

Donc : $0,312 + (3 \times 0,009) = 0,339$

Tableau 9 : les résultats de la formation du biofilm des témoins.

Témoin	Résultat	Observation
Souche de référence « A » <i>Staphylococcus aureus</i>		Tube 1 : absence (-) Tube 2 : absence (-)
Souche « C » <i>E. coli</i>		Tube 1 : forte (++) Tube 2 : forte (++)

Résultat et discussion

Tableau 10 : les valeurs d'absorbances des isolats (DO 570 nm).

Isolat	DO1	DO2	DO3	Valeurs moyenne d'absorbance
<i>p. aeruginosa</i>	0,217	0,302	0,331	0,283
<i>E. coli</i>	0,202	0,215	0,226	0,643
<i>Staphylococcus epidemias</i>	1,657	0,474	0,370	0,834
<i>Serrastia Marescene</i>	0,606	0,302	0,494	0,467
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,479	0,412	1,158	0,608
<i>Pseudomonas fluerescens</i>	0,489	0,301	0,240	0,343
<i>R. terrigena</i>	0,630	0,420	0,344	0,464
<i>Morganella Morganii</i>	0,309	0,662	0,356	0,442
<i>Enterobacter Cloacae</i>	0,556	1,045	0, 318	0,639
<i>Proteus sp</i>	0,575	0,637	0,644	0,618

Tableau 11 : Les valeurs d'absorbance des témoins.

Les souches	DO1	DO2	La valeur moyenne
Souche A	0,321	0,303	0,312
Souche C	2,201	1,0708	1,636

Parmi les 10 isolats, la DO a permis de détecter 8 assez fortes (*E. coli*, *Serrastia marscene*, *Enterobacter aerugines*, *Pseudomonas fluerescens*, *R. terrigena*, *Morganella morganii*, *Enterobacter cloacae* et *Proteus sp*). Une seule souche non productrice (*pseudomonas aerogenosa*). Et une seul souche productrice modérée (*Staphylococcus épидémies*) (**tableau 12**).

Tableau 12 : Les résultats de la formation du biofilm à partir de DO moyenne.

Les souches	Valeurs DO moyenne
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.283 ≤ DO c Non productrice
<i>E. coli</i>	DOc ≤ 0.648 ≤ 2x DOc (0.678). Productrice faible
<i>Staphylococcus epidemies</i>	DOc ≤ 0.834 ≤ 4x DOc (1.356). Productrice modérée
<i>Serratia marscene</i>	DOc ≤ 0.467 ≤ 2x DOc (0.678) Productrice faible
<i>Enterobacter aerogenes</i>	DOc ≤ 0.608 ≤ 2x DOc (0.678). Productrice faible
<i>Pseudomonas fluerescens</i>	DOc ≤ 0.343 ≤ 2x DOc (0.678) Productrice faible
<i>R. terrigena</i>	DOc ≤ 0.464 ≤ 2x DOc (0.678) Productrice faible
<i>Morganella morganii</i>	DOc ≤ 0.442 ≤ 2x DOc (0.678) Productrice faible
<i>Enterobacter cloacae</i>	DOc ≤ 0.639 ≤ 2x DOc (0.678) Productrice faible
<i>Proteus sp</i>	DOc ≤ 0.618 ≤ 2x DOc (0.678) Productrice faible

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté que l'utilisation de la souche de contrôle négative (souche A) qu'est la valeur seuil qui permet de séparer les souches productrices du biofilm d'autres non productrices.

La méthode de TM détecte 8 isolats à forte production du biofilm, une seule souche à production modérée et une autre seule souche non productrice.

Généralement, cette méthode était bien corrélée avec la méthode TCP pour identifier la production du biofilm car ces deux méthodes comportent le même principe.

A moment donné, la technique TM était difficile de différencier entre les isolats à forte production, modérée, faible et non productrices du biofilm en raison de la variété des résultats détectés par différents manipulateurs. Dans autres études de (**Afreenish et al,2011**) nous ont montré que la souche *P. aerogenosa* est à forte production contrairement à nos résultats qui indiquent que cette souche non productrice du biofilm. au même temps, nos résultats concordent avec ceux de (**Afreenish et al., 2011**) où ils montrent que la souche *S. epidimies* est à production modérée.

D'après les études précédentes de (**Afreenish et al., 2011**), nous avons constaté que la méthode TM semble plus fiable à celle de CRA Suite à notre étude, et selon plusieurs chercheurs qui ont étudié les techniques et les stratégies pour évaluer la production de biofilm *in vitro*.

Dans cette optique nos résultats montrent que la méthode TM s'agit d'une évaluation qualitative de la formation de biofilm selon (**Christensen et al., 1985**) ainsi que de mesurer le taux d'adhésion chez les souches cliniques.

Cette technique comme toute méthode classique reste moins fiable par rapport aux recherches plus développées basée sur les analyses génomiques et protéomiques (PCR et électrophorèse) dont le but d'identifier les gènes qui régulent la formation de biofilm (**Ouchar et al., 2013**).

Conclusion

Conclusion

L'ulcère du pied diabétique est une complication majeure grave, qui peut se développer chez un nombre important de patients. La difficulté de diagnostic et le nombre de patients atteints par cette maladie rendent la prise en charge de plus en plus inaccessible. L'utilisation excessive des antibiotiques provoque une multirésistance qui oblige les médecins à amputer le pied du malade, car la formation du biofilm empêche le médicament d'irradier les bactéries qui causent les lésions.

L'apparition de biofilm bactérien pose de gros problèmes cliniques, il devient pourtant important d'améliorer nos connaissances sur les techniques impliquées dans la formation du biofilm, afin de trouver de nouveaux moyens de prévenir ou de traiter les infections associées aux biofilms.

Notre étude effectuée sur 10 souches cliniques isolées à partir des lésions du pied diabétique nous a permis d'évaluer la formation de biofilm ainsi que le taux d'adhérence par ces bactéries.

Les résultats obtenus à l'issue de la méthode TM révèlent que la majorité des souches testées ont donné des résultats positifs par production du biofilm, à l'opposé, trois souches n'ont pas la capacité de le produire. Ces tests doivent être confirmés par d'autres méthodes classiques, telles que la méthode quantitative de la microplaque 96 puits et la méthode qualitative du Rouge Congo, ainsi que les techniques microscopiques et moléculaires.

Ces méthodes révolutionnaires nous permettront de connaître le système de régulation du Biofilm (quorum sensing) pour la lutte contre la formation de ce dernier.

Afin de réduire le risque d'apparition des complications au niveau des pieds, il est nécessaire de respecter les règles d'hygiène, de plus la surveillance et le contrôle continu de ces infections associées à la formation du biofilm.

La prévention des plaies du pied est plus difficile à mettre en place parce qu'elle nécessite l'examen adéquat des pieds par le patient lui-même ainsi que par son médecin au moins une fois par ans. Un certain nombre de bonnes pratiques est de mise : hygiène des pieds (des orteils et des ongles), soins et traitement adaptés à la moindre blessure ou anomalie, ils doivent protéger ses pieds des blessures, des variations de la température et des frottements, ils convient d'avoir des chaussures bien adaptés. Tous ces bons réflexes permettent d'empêcher les complications graves de ces infections et de garder les pieds en bonne santé.

*Références
bibliographique*

Références

-A-

Antoni, R., Agnieszka, T., Magdalena, M. 2013. *Proteus* sp. – an opportunistic bacterial pathogen – classification, swarming growth, clinical significance and virulence factors in: *Folia Biological et Ecological*. [en ligne]. Consulté le 20 août 2020.

[https://content.sciendo.com/configurable/contentpage/journals\\$002ffobio\\$002f8\\$002f1\\$002farticle-p1.xml](https://content.sciendo.com/configurable/contentpage/journals$002ffobio$002f8$002f1$002farticle-p1.xml).

Ammek, Mounya, A., Fadhila, B., Nassima, D. 2019. Evaluation de la capacité des souches de *Pseudomonas* spp à former des biofilms. Mémoire de master : microbiologie. Université Djilali Bounaama khemis Miliana .64p.

Auger M. 2012. Formation de biofilm in vitro par des souches cliniques d'*Escherichia coli* : impact de la modification des conditions expérimentales. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Nantes, France.188p.

Arista, D.S., Auch, C., 2011. Indications des prélèvements et de l'antibiothérapie dans la prise en charge des plaies. *Revue Microsoft Academic services for science of science studies*.23p.

Afreenish H, Javaid Fatima K, et am.2011. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *The Brazilian journal of infectious diseases*.15(4),305-311

-B-

Banerjee. 2014. Comparative Study of Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients of Lower Respiratory Tract Infection. *Journal of clinical and diagnostic research*.11p.

Bellifa S. (2014). Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat : microbiologie. Université abou bekr Belkadi, Tlemcen.64p.

Badri.G, Tahri. N. (2016). Aspect bactériologique des infections du pied diabétique. Mémoire de master : microbiologie. Tébessa : Université de Larbi Tébessa. 66p.

Boucher, F., Château, J., Ferry, T., et al., 2017. Diagnostic de l'infection d'une plaie chronique et principes de traitement. *Revue Francophone de Cicatrisation* 1. (2), 15–22p.

Bassetti S, Piso RJ, Itin P.2013. Infections de la peau et des tissus mous : cellulite, érysipèle et fasciite nécrosante. *Forum Medical Suisse*.13(35),672-677.

Besse, J.-L., Leemrijse, T., Deleu, P.-A., 2011. Le pied diabétique : place de la chirurgie

Références

orthopédique. *Revue de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique* 97, 302–319.

Baum M, Kainović A, Welbster P. 2009. Caractérisation of structures in biofilms forms by *P. fluorescens* isolated from soil. *Biomedical Center Microbiology* 9, (103).

Bras J, Patol M. 2016. biofilm production and resistance profile of *Enterobacter sp* strains isolated from pressure ulcers in petrolina, pernambuco, Brazil. 52, (5).

-C-

Chibi .A.(2015). Evaluation de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* isolées de CHU Tlemcen. Mémoire de master : microbiologie. Tlemcen, université aboubeker belkaid, 79p.

Christensen G. D, Simpson W.A, Younger J., et al. (1985). Adherence of coagulase negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology.* 22 :996–1006.

Coban A., Ciftci A., Onuk E. Et al. (2009). Investigation of biofilm formation and relationship with genotype and antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis. *Mikrobiyoloji Bulteni.* 43 : 563-573.

Courcol, R., 2017. Comment obtenir des données microbiologiques fiables devant une plaie infectée ? *JMV-Journal de Médecine Vasculaire* 42. (2), 67p.

Calhoun, JH, Overgaard, KA, Stevens, CM, Dowling, JP, Madert, JT, Diabétique foot ulcers and infections : curent concepts, *Adv. Skin Wound Care,* 2002, 15, 31-42.

Chir M. 2018. Examen clinique du pied diabétique et gradation du risque podologique. *Médecine et chirurgie du pied.* 34, (3) ,62-65.

-D-

De, A, Hirak. J.R, et Prasanta. K. M. 2016. Biofilm in Osteomyelitis caused by a Rare Pathogen, *Morganella morganii*: A Case Report. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR* 10 (6).06-8p.

Donovan A, Schweitzer ME. 2010. Use of MR imaging in diagnosing diabetes relates pedal ostéomyélites. *Journal of diagnostic radiography and imaging.* 30(3),736-723.

-F-

Fredenrich, A, Bouillanne. P. -J, Batt.M. 2004. Artériopathie diabétique des membres inférieurs. *Encyclopédie médico-chirurgicale.* 1 (2). 117-32p.

Fromantin, I. Florence. R, Maxime. C, Marguerite. N, et al. 2017. Biofilm et plaies. *Revue Francophone de Cicatrisation* 1 (2). 10-12p.

Références

FID, 2019. l'atlas du diabète de la FID [en ligne], consulté le 27/09/2020.
https://diabetesatlas.org/upload/resources/material/20200302_133352_2406-IDF-ATLAS-FRENCH-BOOK.pdf

Finge, 2020. Manuel du preleveur [en ligne], consulté le 27/09/2020.
<http://www.chu-nimes.fr/manuel-prelevements/manuel-du-preleveur.html>

Fany Reffuveille, Jérôme Josse, Quentin Vallé, Céline Mongaret et Sophie C. Gangloff (8 mars 2017). Les biofilms de *Staphylococcus aureus* et leur impact sur le domaine médical, la montée de la virulence et de la résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*, Shymaa Enany et Laura E. Crotty Alexander, IntechOpen, DOI : 10.5772 / 66380. Disponible sur : <https://www.intechopen.com/books/the-rise-of-virulence-and-antibiotic-resistance-in-staphylococcus-aureus/staphylococcus-aureus-biofilms-and-their-impact-on-the-domaine-medical>

-G-

Got, I. 2008. Artériopathie et pied diabétique. *La Revue de Médecine Interne*, Le pied diabétique, 29. 249-59 p.

Gardner SE, Haleem A, Jao YL, et al. 2014. Cultures of diabetic foot ulcers without clinical signs of infection do not predict outcomes. *Diabetes Care* 2014; 37:2693-701.

growth, clinical significance and virulence factors in: *Folia Biological et Ecological*. [en ligne]. Consulté le 20 août 2020.
[https://content.sciendo.com/configurable/contentpage/journals\\$002ffobio\\$002f8\\$002f1\\$002farticle-p1.xml](https://content.sciendo.com/configurable/contentpage/journals$002ffobio$002f8$002f1$002farticle-p1.xml)

-H-

Helthline editorial team. Diabetic Foot Pain and Ulcers: Causes and Treatments. [en ligne]. (32/06/2020).
<https://www.healthline.com/health/diabetic-foot-pain-and-ulcers-causes-treatments> (accessed 6.23.20).

Houari A. (2009). Caractérisation de biofilms formés à la surface de membranes de nanofiltration dans un processus de production d'eau potable et stratégies de lutte anti-biofilms. Thèse de doctorat en microbiologie. Université de Cergy- Pontoise, France. 518p.

Hilton, line, D.T., Harding, K.G., (2004). Diagnosing Foot Infection in Diabetes. *Clinical Infectious Diseases*. supplement article. 39. (2). 83–86p.

Hinsa S, O'Toole G A. 2006. biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365: A role for Lap D. *PubMed*. 152(5), 1375-83.

Références

-J-

Jneid. J. Lavigne J.P. La Scola.B., et N. Cassir. 2017. The Diabetic Foot Microbiota: A Review. *Human Microbiome Journal* 5,6 1-6p.

Jeffcoat, William. J., Keith G- H. 2003. Diabetic Foot Ulcers. *The Lancet* 361 (9368): 1545-1551p.

-K-

Kelmani Chandrakanth, R., Raju.S., Patil.S. A. 2008. Aminoglycoside Resistance Mechanisms in Multidrug-Resistant *Staphylococcus Aureus* Clinical Isolates. *Current Microbiology* 56 (6): 558-62p.

Kourichi S, Moussaoui A., 2018. Le pied diabétique, étude prospective sur 21 cas au niveau du CHU de Bejaia. Thèse de doctorat : Médecine. Université Abderrahmane Mira de Bejaia. 135p.

-L-

Lavigne, J-P, Richard. J-L, Sotto. A. 2011. Nouvelles avancées dans les infections des plaies du pied chez le patient diabétique. *Revue Francophone des Laboratoires* 2011 (434) : 57-64 P.

Lipsky BA, Berendt AR, Deery H, et al.2004.Diagnosis and treatment of diabetic foot infection. *clinical infection diseases*.39:885-910.

Lushiku.E.B. Pied diabétique *Revue Med Bruxelles*, 2006. [En ligne]. Consulté le 16 juin 2020.

https://www.ecoledepodologie.com/images/PDF/ETUDIANTS/Publications_scientifiques/Diabete/Pied%20diabetique%20Revue%20Med%20Bruxelles,%202006.pdf.

Lefort, H., Zanker, C., Fromantin, I. Et al, 2018. Prise en charge des plaies en structure d'urgence. *Revue Francophone de Cicatrisation* 2. (1), 47-61.

Landis S. J. (2008). Chronic wound infection and antimicrobial use. *Advances in skin and wound care*, vol. 21, pp. 531-540

-M-

Meriemeche. L. Nadir.F.(2016). Etude de la formation de biofilms associés aux plaies chroniques du pied diabétique. Mémoire de master : microbiologie. Constantine : université frères mentouri. 88p.

Références

Majtan .J., Bohova.J., Miroslava. H., et al 2014. Anti-Biofilm Effects of Honey Against Wound Pathogens Proteus Mirabilis and Enterobacter Cloacae: Honey kills wound biofilm. *Phytotherapy Research* 28 (1): 69-75p.

Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay DJ., Fatma T., Rattan A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Médical Microbiologie*, 24 (1) : 25- 9p.

Méar J-B. (2014). Étude de la modulation de la virulence de Pseudomonas aeruginosa par Candida albicans dans un modèle de pneumonie. Thèse de doctorat. Université Lille nord de France, 84p.

Meaume, D.S., Rothschild, H. Prélèvement de plaie : pourquoi ? quand ? comment ? 15.[en ligne]. Consulté le 29/07/2020.
<http://huep.aphp.fr/wp-content/blogs.dir/146/files/2015/09/02-Pr%C3%A9l%C3%A8vement-de-plaie-Pourquoi-QuandComment.pdf>

-N-

Nadji.N. Mizou. A. (2015). Détection de la formation de biofilms chez les isolats cliniques de Pseudomonas aeruginosa. Mémoire de master : microbiologie. Constantine : Université Frères Mentouri. 73p

Netgen. Génomique et métagénomique bactériennes : applications cliniques et importance médicale.[en ligne]. Consulté le 21 juin 2020.
<https://www.revmed.ch/RMS/2014/RMS-N-450/Genomique-et-metagenomique-bacteriennes-applications-cliniques-et-importance-medicale>.

Nicodème J D, Paulin E, Zingg M, et al.2015. Pied diabétique infecté : du diagnostic à la prise en charge. In : *Revue médicale suisse*, 11, n° 477, p. 1238-41.

-O-

OMS. Programme Diabète de l'OMS [en ligne]. (consulté le 30.10.20)
<https://www.who.int/diabetes/fr/> (accessed 10.30.20).

Omar, A., Wright, J., Schultz, G., Burrell, R., Nadworny, P., 2017. Microbial Biofilms and Chronic Wounds. *Microorganisms* 5 (9).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms5010009>.

Ouchar OM, Tidjani A, Savadogo A, et al. 2013.Isolement et caractérisation des bactéries productrices des biofilms issues des produits alimentaires. *Revue : microbiologie industriel sanitaire et environnement*. 7, (2),187-210.

Références

O'Toole GA, Kotter R.1998.Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS65 procédés via multiple convergent signalling pathways : à généticien analysis. Département of microbiologie and molecular genetics, p :61-449.

-P-

Philippe. Gestion des plaies exsudatives infectées avec les pansements absorbants bactériostatiques.[en ligne] . (10/08/2020).
<https://www.actusoins.com/297965/gestion-des-plaies-exsudatives-infectees-avec-les-pansements-absorbants-bacteriostatiques.html>.

Perron. Qu'est-ce que l'ARN16S ? Que détermine-t-on grâce à lui par rapport aux bactéries ? Comment cela marche-t-il ? [En ligne]. Consulté le 20 août 2020.
<https://www.rts.ch/decouverte/sante-et-medecine/corps-humain/6972114-qu-est-ce-que-l-arn16s-que-determine-t-on-grace-a-lui-par-rapport-aux-bacteries-comment-cela-marche-t-il-.html>.

-R-

Redazione. Cause, sintomi e cura della cellulite infettiva .[en ligne] 17/08/2020.
<https://www.lettera43.it/cellulite-infettiva/>.

Richard, J.-L., Schuldiner.S. 2008. Épidémiologie du pied diabétique. *La Revue de société nationale de Médecine Interne* 29.222-230p.

Roux, A, Ghigo.J-M. 2006. « Les biofilms bactériens ». *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, n° 1 : 261p.

-S-

Sotto.A, Dunyach.R, C, Lavigne.J.P. 2015. Le microbiote cutané : étude de la diversité microbienne et de son rôle dans la pathogénicité. *Revue Francophone des Laboratoires special issues*. 2015 (469). 51-58p.

Sanchez. C Katrin Mende.J., Miriam. L et al .2013. Biofilm Formation by Clinical Isolates and the Implications in Chronic Infections. *Biomédical Center Infectious Diseases* 13 (1) : 47p.

Senneville, E. 2008. Infection et pied diabétique. *La Revue de Médecine Interne* 29 243-248p.

Stepanovic´ S, Vukovic´ D, Hola V, et al.2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. 115, (9) ,891-895.

Shanks R M, Kalivoda E J, Stella N A.2008. *Serratia marcescens* biofilm formation and cytotoxicity is regulated by cAMP. 49, (13).

Références

-T-

Tremblay, Y., Hathroubi.S ., Mario. J. 2014. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research* 78 (2): 110-16p.

-W-

Wagner, F.W., 1987. The Diabetic Foot. *Journal of orthopaedic surgery and research.* 10, 163–172 p.

Wolcott.RD., Phillips. PL. Fletcher.J. et al, Biofilm made easy francais.[en ligne]. Consulté le 08 /06/2020.
https://www.oiiq.org/sites/default/files/uploads/pdf/l_ordre/ordres_regionaux/ORIIM/2012/biofilm_made_easy_francais.pdf.

Wu, Y.-K., Cheng, N.-C., Cheng, C.-M., 2019. Biofilms in Chronic Wounds: Pathogenesis and Diagnosis. *Trends in Biotechnology* 37, 505–517p.

-Z-

Zubair M1, Malik A1, Ahmad J .2011. A study of biofilm production by gram-negative organisms isolated from diabetic foot ulcer patients. *journal of natural science Biology and medicine.* 3 (2).11p.

Zurob, E., Dennett.G., Gentil.D., et al. 2019. Inhibition of Wild Enterobacter cloacae Biofilm Formation by Nanostructured Graphene- and Hexagonal Boron Nitride-Coated Surfaces. *Nanomaterials and Nanotechnology.*9 (1).18p.

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

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Moléculaire des Microorganismes

Titre : Initiation à la recherche sur la formation de biofilms par quelques bactéries cliniques isolées à partir des lésions du pied diabétique.

Résumé

Le diabète, maladie chronique et métabolique, est connu comme l'un des grands défis sanitaires du siècle. D'une manière progressive, cette maladie peut endommager le cœur, les vaisseaux sanguins, les yeux, les reins combinée à des lésions des pieds qui augmentent le risque d'ulcère du pied. Cette complication grave se caractérise par la formation du biofilm. À l'issue de ce travail, notre objectif est d'étudier la capacité de la formation du biofilm *in vitro* par dix souches bactériennes cliniques pures préalablement isolées des plaies infectées du pied chez des patients diabétiques par la méthode des tubes à essai TM. Les résultats obtenus ont montré que la majorité des souches testées ont donné des résultats positifs par production du biofilm dont une proportion de 70% (*Proteus* SP, *Morganella morganii*, et *Enterobacter cloacae*... etc), à l'opposé de restes des souches qui n'ont pas la capacité de produire du biofilm qui présentent 30% (*E.coli* et *Pseudomonas fluorescens*) des souches testées. Cette production varie quantitativement d'une souche à une autre (forte, modéré, faible). La recherche du biofilm par cette méthode reste moins fiable par rapport aux les autres techniques moléculaires basées sur les analyses génomique et protéomique (PCR et électrophorèse). Nous avons besoins d'améliorer nos connaissances sur ces nouvelles moyennes afin de traiter les infections associées aux biofilms.

Mot clés : pied diabétique, plaie infectée, plaie chronique, biofilm, ulcère, méthode TM, bactéries cliniques, *in vitro*.

Membre du jury :

Présidente du jury : Dr ABDDELAZIZ Ouided (MCB- UFM Constantine 1).

Encadreur : Dr BOUBEKRI Karima (MCA- UFM Constantine 1).

Examinatrice : Mme BOUCHLOUKH Warda (MAA- UFM Constantine 1).

Tutrice : Mme SOUDA Ibtihadj (Doctorante- UFM Constantine 1).

Présenté par : ZOUAD Ahlem

SIARI Rim

Année universitaire : 2019-2020

