



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
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 : *Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes*

Intitulé :

Etude de la formation de biofilms associés aux plaies chroniques du pied diabétique

Présenté et soutenu par : *MERIEMECHE Lamia*
NADIR Fedjria

Le : 23/06/2016

Jury d'évaluation :

Président du jury : ABDELAZIZ Ouided (Maître Assistante « A » - UFM Constantine).

Rapporteur : BOUCHLOUKH Warda (Maître Assistante « A » - UFM Constantine).

Examineur : BELMESSIKH Aicha (Maître Assistante « A » - UFM Constantine).

Année universitaire
2015 - 2016

Remerciements

*En tout premier lieu, nous remercions
le Bon Dieu **ALLAH**, tout Puissant,
de nous avoir donné le courage, la force
et la volonté pour réaliser ce travail et
dépasser toutes les difficultés.*

*En second lieu, nous tenons à remercier notre chère
encadreur Mme **BOUCHLOUKH Warda** pour ses
précieux conseils sa confiance et son aide durant
toute la période du travail.*

*Nos vifs remerciements pour les membres de jury à
commencer par Mme **ABDELAZIZ Ouïded** qui nous
a fait l'honneur de présider notre jury.*

*A Mme **BELMESSIKH Aïcha** d'avoir accepté
d'examiner ce modeste travail.*

*Nos profonds remerciements vont également à tous
les enseignants qui nous ont donné les bases de la
recherche pendant les cinq ans et les personnes qui
nous ont aidé et contribué, de près ou de loin, à la
réalisation de ce travail.*

Dédicaces

Nous dédions ce travail

*À nos chers parents; symboles de sacrifice; tendresse et
d'affection.*

*Nous vous remercions pour tout le soutien et l'amour que vous
nous portez depuis notre enfance et nous espérons que votre
bénédiction nous accompagnera toujours.*

*À nos chères sœurs et chers frères, pour leurs encouragements
et tous les moments inoubliables que nous avons partagés
ensemble.*

*À tous les membres de nos familles. À tous nos amis et nos
collègues, ils trouveront ici le témoignage d'une fidélité et
d'une amitié infinie.*

À la mémoire des gens qui nous ont quittés.

Lamia & Fedjria

Table des matières

INTRODUCTION	1
Partie I. Synthèse bibliographique	2
Chapitre I. Généralité sur les biofilms	2
1. Historique.....	2
2. Définition.....	2
3. Les étapes de la formation d'un biofilm.....	3
3.1. Adhésion réversible.....	4
3.2. Adhésion irréversible.....	4
3.3. Formation de micro-colonies.....	4
3.4. Maturation de biofilm.....	4
3.5. Dispersion du biofilm.....	5
4. Structure et composition du biofilm.....	5
4.1. Les différentes formes d'un biofilm.....	5
4.2. La diversité des biofilms.....	5
4.3. Composition d'un biofilm.....	6
5. Les facteurs favorisant la formation d'un biofilm.....	6
5.1. Caractérisation de la surface.....	6
5.2. Facteurs environnementaux.....	6
5.3. Propriétés des cellules.....	7
6. Quorum sensing.....	7
7. Les effets bénéfiques et néfastes de biofilms.....	7
7.1. Les effets bénéfiques.....	7
7.2. Les effets néfastes.....	8
8. Importance des biofilms dans le domaine médicale.....	9
8.1. Les biofilms et la peau.....	10
Chapitre II. Les plaies du pied diabétique	12
1. Définition du diabète.....	12
2. Les deux grands types de diabète.....	12
2.1. Diabète de type 1.....	12
2.2. Diabète de type 2.....	13
3. Le pied diabétique.....	13
4. Les plaies du pied diabétique.....	13
4.1. Diagnostic.....	13
4.1.1. Colonisation bactérienne.....	14

Table des matières

4.1.2. L'infection.....	14
4.2. Les facteurs déclenchant.....	15
4.2.1. Les chaussures inadaptées (50%).....	15
4.2.2. Les gestes inadaptés (25%).....	15
4.2.3. L'hygiène ou comportement inadapté (25%).....	15
4.3. Physiopathologie.....	16
4.3.1. Artériopathie.....	16
4.3.2. Neuropathie.....	16
4.4. Microbiologie des infections du pied diabétique.....	16
4.4.1. Les mycoses.....	16
4.4.2. Les infections bactériennes.....	17
4.5. Traitement du pied.....	19
4.5.1. La mise en décharge.....	19
4.5.2. Le débridement médical.....	19
4.5.3. Antibiothérapie des infections du pied diabétique.....	20
4.5.4. Pansements.....	21
4.6. Prévention des plaies du pied chez le diabétique.....	22
Partie II. Matériel et méthodes.....	24
1. Cadre de l'étude.....	24
2. Echantillonnage.....	24
3. Traitement des échantillons.....	25
4. Examen microscopique (examen direct entre lame et lamelle).....	25
5. Isolement bactérien.....	26
6. Identification.....	27
6.1. Examen macroscopique.....	27
6.2. La galerie biochimique.....	28
7. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques.....	30
Partie III. Résultats et discussions.....	32
1. Isolement et identification des souches bactériennes.....	32
2. Présentation des résultats.....	35
2.1. Résultats de culture.....	35
2.2. Souches bactériennes isolées à partir des plaies.....	36
2.3. Formation de biofilm.....	39
2.4. Répartition des bactéries isolées selon le type du diabète.....	41
2.4.1. Répartition des Entérobactéries selon le type du diabète.....	41
2.4.2. Répartition des Cocci à Gram positif selon le type du diabète.....	42
2.5. Répartition des bactéries selon le sexe.....	42
2.5.1. Répartition des Entérobactéries selon le sexe.....	42
2.5.2. Répartition des Cocci à Gram positif selon le sexe.....	43

Table des matières

2.6. Taux de résistance.....	44
2.6.1. Taux de résistance des Entérobactéries.....	44
2.6.2. Taux de résistance de <i>Staphylococcus aureus</i>	48
CONCLUSION.....	51
Références bibliographiques.....	53
Annexes	
Résumés	

Liste des abréviations

EPS : Exo-Polysaccharides

MEB : Microscope Electronique à Balayage

QS : Quorum Sensing

BN : Bouillon Nutritif

TSI : Triple Sugar Iron Agar

ONPG :Otho-Nitrophényl-Galacto-Pyrannoside

Liste des Figures

Figure 1. Observation d'un biofilm bactérien par microscope électronique à balayage (MEB)	3
Figure 2. Différentes étapes de développement d'un biofilm	4
Figure 3. Observation, MEB, d'un biofilm de Staphylocoque formé sur la face interne d'un dispositif médical	9
Figure 4. (a) et (b) représentent des biofilms de Staphylococcus aureus présents à la surface de la peau obtenues par microscope électronique à balayage (MEB)	11
Figure 5. Infection du pied diabétique	14
Figure 6. Onychomycose avec dystrophie totale.....	17
Figure 7. L'intertrigo.....	17
Figure 8. Excision des parties dévitalisées	20
Figure 9. Photo d'un prélèvement d'une plaie infectée.....	25
Figure 10. Répartition des prélèvements selon leur culture	36
Figure 11. Pourcentage de souches bactériennes isolées et identifiées à partir des plaies.....	38
Figure 12. Pourcentage de bactéries associées aux biofilms.....	40
Figure 13. Répartition des entérobactéries selon le type de diabète.....	41
Figure 14. Répartition des entérobactéries selon le sexe.....	43
Figure 15. Les taux de résistance de <i>P. mirabilis</i> à partir des plaies.....	45
Figure 16. Les taux de résistance de <i>P. vulgaris</i> à partir des plaies	46
Figure 17. Les taux de résistance de <i>E. coli</i> à partir des plaies	47
Figure 18. Les taux de résistance de <i>Klebsiella spp</i> à partir des plaies	47
Figure 19. Les taux de résistance de <i>S. aureus</i> à partir des plaies	50

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste partielle d'infections humaines impliquant des biofilms	10
Tableau 2. Corrélation clinico- biologique entre les types de plaies et les germes impliqués et identifiés	18
Tableau 3. Principe et intérêt de chaque milieu utilisé	27
Tableau 4. Identification biochimique à l'aide de la galerie classique	29
Tableau 5. Liste des antibiotiques testés	31
Tableau 6. Résultats de l'examen cytologique.....	33
Tableau 7. Aspect macroscopique des coques à GRAM positif et des Entérobactéries identifiées	34
Tableau 8. Caractères biochimiques des Entérobactéries.....	35
Tableau 9. Répartition des prélèvements selon leur culture	36
Tableau 10. Souches bactériennes isolées et identifiées à partir des plaies	37
Tableau 11. Pourcentage de bactéries associées aux biofilms	39
Tableau 12. Répartition des Entérobactéries selon le type de diabète	41
Tableau 13. Répartition des cocci à GRAM positif selon le type de diabète.....	42
Tableau 14. Répartition des Entérobactéries selon le sexe	42
Tableau 15. Répartition des cocci à GRAM positif selon le sexe.....	43
Tableau 16. Les taux de résistance des Entérobactéries isolées à partir des plaies.....	45
Tableau 17. Les taux de résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> isolées à partir des plaies	49

Introduction

Introduction

Dans l'environnement naturel, les micro-organismes sont attachés à une surface, organisés en communautés structurées, et englobés dans une matrice d'exopolymères. Ce mode de développement, appelé biofilm, a pris une importance toute particulière lorsqu'il a été établi qu'il était impliqué dans un grand nombre d'infections bactériennes (**Khalilzadeh, 2009**).

Les biofilms bactériens, lors d'infections chroniques, constituent des réservoirs de pathogènes à l'origine de nombreuses infections (**Lebeaux, 2012**). La présence supposée de biofilm est de plus en plus évoquée ces dernières années. Elle concernerait plus de 60% des plaies chroniques et serait plus occasionnelle sur les plaies aiguës (**Fromantin, 2012**).

Cliniquement, le biofilm n'est pas visible, sauf s'il est très épais. Il est alors souvent décrit comme un enduit visqueux à la surface d'une plaie dont le processus de cicatrisation est ralenti, et serait associé à des exsudats abondants et une prolongation de la phase inflammatoire sans signes infectieux francs (**Fromantin, 2012**).

Les plaies chroniques sont un environnement idéal pour la formation de biofilm microbien. Les tissus nécrosés et les débris permettent l'attachement des bactéries et les plaies sont vulnérables à l'infection en raison de la réponse immunitaire (**Zhao et al., 2013**).

Le diabète représente un problème majeur de santé publique. Les complications du diabète au niveau des pieds contribuent largement à son impact non seulement sur le plan économique, mais surtout sur celui de la qualité de vie des patients. Les lésions des pieds (chez le patient diabétique) sont fréquentes, graves et coûteuses. Une amputation toutes les 30 secondes est effectuée chez les patients diabétiques quelque part dans le monde (**Moty-Monnereau, 2007 ; Pataky et al., 2014**).

Le présent travail a pour objectif d'identifier les bactéries formant des biofilms au niveau des plaies chroniques, chez les patients diabétiques, admis dans le service de médecine interne durant la période allant du 6 Mars au 6 Avril 2016.

Les profils de résistance des bactéries isolées, vis-à-vis de nombreux antibiotiques communément prescrits, ont été également déterminés.

Synthèse
Bibliographique

CHAPITRE I : Généralités sur les biofilms

1. Historique

La découverte des biofilms est attribuée à l'inventeur du microscope, Antoni Van Leeuwenhoek, qui observa vers 1683 des communautés microbiennes à la surface des dents.

En 1933, lors d'expériences visant à observer la croissance d'algues sur des lames de verre placées dans un aquarium, Henri ci observa des communautés bactériennes fixées sur ces lames. Le concept de « biofilm » est né, mais le terme en lui-même n'est pas encore utilisé (Djalloul Daoudji, 2010).

En 1943, Claude Zobella montré que, dans un récipient rempli de liquide, les bactéries colonisant les parois sont plus nombreuses que celles en suspension.

Enfin, dans les années 1980, les travaux de William Costerton mettent en évidence que l'essentiel de la biomasse microbienne est fixé sur des surfaces, et constitué des populations hétérogènes englobées dans une matrice extracellulaire présentes dans tous les environnements, elles sont appelées « **biofilms** » (Ghigo et Roux, 2006).

Plus récemment, les études sur les biofilms étaient développées dans divers domaines industriel, environnementale et médicale. Beaucoup de travaux dans les deux dernières décennies ont compté sur les outils tels que : la microscopie électronique à balayage (MEB) ou les techniques de cultures microbiologiques standards pour la caractérisation des biofilms (Donlan, 2002).

2. Définition

Les biofilms sont des communautés microbiennes complexes, contenant des bactéries et des champignons, fixées à un support et engluées dans leurs propres exo-polymères. Ces agrégats peuvent se développer sur toutes les surfaces (vivantes ou inertes) (Meddour, 2012) exposés (même occasionnellement) à l'humidité et aux éléments nutritifs (Branger *et al.*, 2007).

Les microorganismes sont capables de se développer sur n'importe quels types de surface naturelle ou artificielle. Qu'elle soit minérale (roches) ou organique (peau, tube digestif des

animaux, racines et feuilles des plantes), industrielle (canalisation, surfaces alimentaires, coques des navires) ou médical (prothèses, cathéters, valves cardiaques)(**Brangeret *al.*, 2007**).

La **Figure 1** représente un biofilm constitué de bactéries de forme bacillaire.

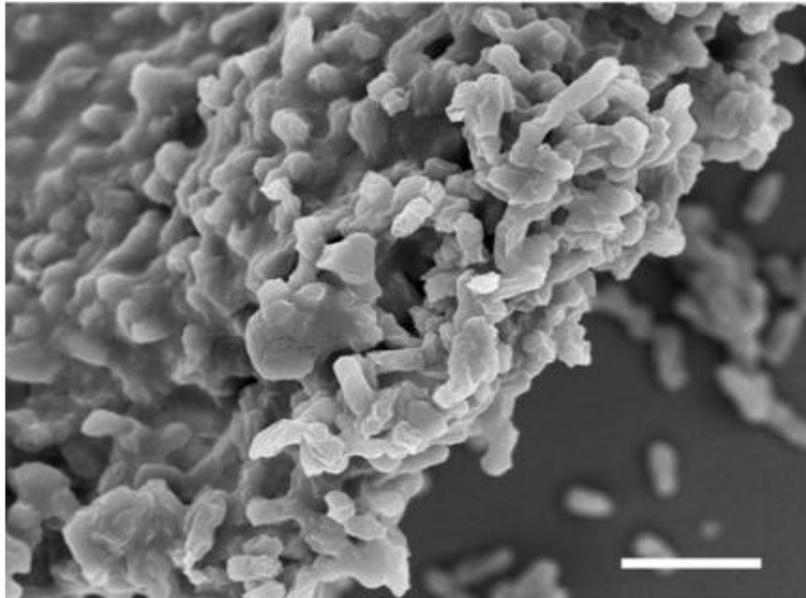


Figure 1. Observation d'un biofilm bactérien par microscope électronique à balayage (MEB)(**Hawari, 2009**).

Ce mode de vie permet à des colonies de bactéries de persister à un endroit donné, Il confère à la communauté bactérienne une véritable protection contre un certain nombre de stress environnementaux(**Chalvet de Rochementeix, 2009**).

3. Les étapes de la formation d'un biofilm

Le cycle de développement ou de vie du biofilm (**Figure 2**) comporte cinq grandes étapes qui peuvent se reproduire indéfiniment. (**Saint-Cyr, 2011**).

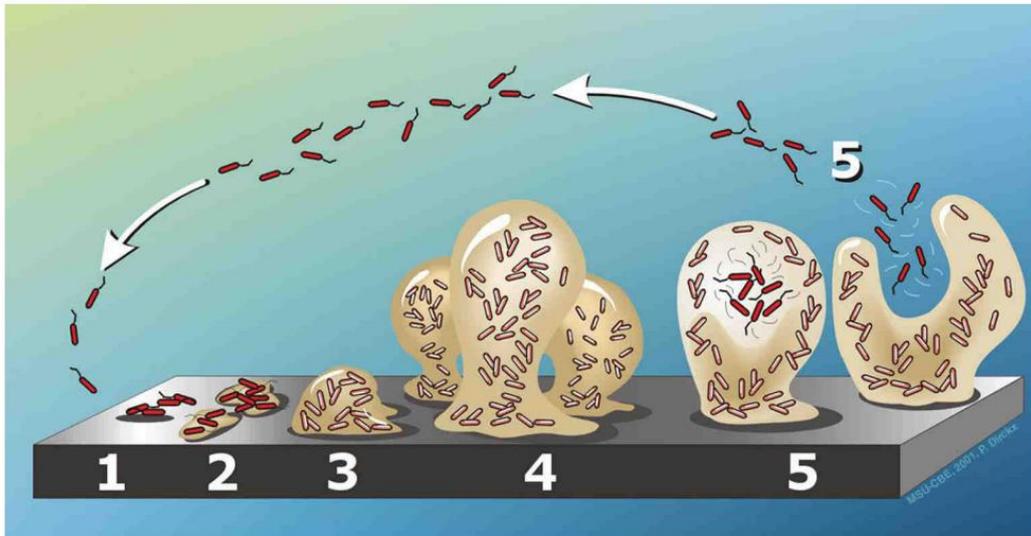


Figure 2. Différentes étapes de développement d'un biofilm(Auger, 2012).

3.1. Adhésion réversible

Dans un premier temps l'adhésion est due à des interactions faibles entre surface et bactéries (interaction de type Van Der Waals et électrostatique). Les bactéries subissent toujours des mouvements ou les cellules s'adsorbent sur une surface pendant un temps mais peuvent se détacher facilement (Brangeret *al.*, 2007 ; Parot, 2007; Pecastaings, 2010).

3.2. Adhésion irréversible

Dans un deuxième temps, l'adhésion devient irréversible grâce à la sécrétion d'exopolymères par les bactéries permettant de consolider leur fixation au support avec des liaisons fortes de type hydrophobes (Brangeret *al.*, 2007 et Bellifa, 2014). Le nombre de cellules microbiennes augmente et donc la distance entre deux cellules diminue (Alnasouri, 2010).

3.3. Formation de micro-colonies

Les bactéries croissent et se divisent, formant des micro-colonies qui sont considérées comme étant les unités organisationnelles fondamentales d'un biofilm (Shunmugaperumal, 2010). Les bactéries vont recouvrir toute ou une partie de la surface (Bellifa, 2014).

3.4. Maturation de biofilm

Dans cette étape le biofilm a une croissance exponentielle se traduisant par une augmentation importante de son épaisseur jusqu'à former un film hétérogène tridimensionnel(**Parot,2007**). Le biofilm grandit et mature, s'épaississant jusqu'à devenir macroscopique en condition optimales(**Brangeret al.,2007**).

3.5. Dispersion du biofilm

Les microorganismes peuvent se séparer sous effets du vieillissement du biofilm, certains stress ou carence et ils retournent à l'état dit « planctonique » ou ils peuvent coloniser de nouvelles surfaces plus favorables (**Brangeret al.,2007**). Ce phénomène n'est pas restreint au dernier stade du développement du biofilm mais peut avoir lieu, soit par lyse cellulaire soit par le départ de cellules viables, tout au long de la formation du biofilm et en réponse à un changement d'environnement(**Parot, 2007**).

4. Structure et composition du biofilm

4.1. Les différentes formes d'un biofilm

Dans les conditions naturelles, les bactéries existent sous deux formes : une forme libre ou planctonique, et une forme sessile ou attachée en biofilm. Les transitions entre ces modes de vie mettent en jeu des processus dynamiques et complexes(**Clutterbuck, 2007**).

Un mode de vie planctonique permet aux microorganismes de se proliférer et de coloniser de nouvelles niches environnementales. Puis, en s'attachant à une surface de façon irréversible, les micro-organismes peuvent alors adopter une forme de vie sessile, qui est le mode de vie majoritaire des bactéries. Une fois attachées entre elles et à une interface, les bactéries se développent formant une matrice (**Chalvet de Rochemonteix, 2009 et Klein, 2011**).

Le choix de ce mode de vie implique des changements majeurs dans l'utilisation de l'information génétique et de l'énergie cellulaire et à des conséquences profondes pour la physiologie bactérienne (**Romeo,2008**).

4.2. La diversité des biofilms

Les biofilms sont très hétérogènes, dans le temps et dans l'espace. Ils sont constamment remodelés, suite à l'influence permanente de facteurs endogènes et exogènes.

Ils présentent une grande diversité aussi bien au niveau structural. Un biofilm peut être constitué d'une ou de plusieurs espèces de micro-organismes : on parle respectivement de biofilms homogènes ou de biofilms hétérogènes (Tolker-Nielson *et al.*, 2000).

La diversité des biofilms constituerait l'un des éléments clés dans leur robustesse face aux agents antimicrobiens et autres agressions (Singh *et al.*, 2002).

4.3. Composition d'un biofilm

La composante bactérienne représente 10 à 25% du biofilm, les 75 à 90% autres étant principalement composés par la matrice (Meddour, 2012).

Les biofilms sont une communauté microbienne dans laquelle les microbes produisent une substance polymérique extracellulaire (EPS) tels que protéines (< 1-2 %) y compris les enzymes), ADN (< 1 %), polysaccharides (1-2 %) et l'ARN (< 1 %) et en plus de ces éléments, l'eau constitue la plus grande partie du biofilm, qui permet la circulation des éléments nutritifs à l'intérieur de la matrice du biofilm (Jamalet *al.*, 2015). et des déchets du métabolisme cellulaire, débris issus des matières en contact avec les surfaces (produits alimentaires) (Brangeret *al.*, 2007 et Bellifa, 2014).

5. Les facteurs favorisant la formation d'un biofilm

5.1. Caractéristiques de la surface

Le contact d'un matériau avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm.

- a) Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des micro colonies est importante.
- b) Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le Téflon et le plastique.
- c) La présence d'un film protéique comme le sang, les larmes, l'urine, la salive, et les sécrétions respiratoires influence l'attachement de bactéries à cette surface, et favorise la formation de biofilms (Bellifa, 2014).

5.2. Facteurs environnementaux

Le développement des biofilms dépendent fortement des conditions environnementales dans lesquelles ils sont formés, c'est-à-dire des différents paramètres auxquels ils sont soumis. Tout changement de l'un de ces paramètres est en général perçu comme un stress et peut déclencher une réponse particulière au sein d'un biofilm(Jamal, 2015).

Comprenant les conditions environnementales telles que : la disponibilité de nutriments (excès ou carence) et les différents stress physico-chimiques (pH, température, présence de composés bactéricides, etc.) (Chalvet de Rochementeix, 2009 ; Meddour, 2012).

5.3. Propriétés des cellules

- a) La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Cette hydrophobicité influence l'attachement des bactéries sur une surface ; moins les surfaces sont polarisées plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes.
- b) Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les fimbriae, certaines protéines, et les acides mycoliques (composants de certaines bactéries Gram positives) semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes.
- c) Les exo-polysaccharides et les lipo-polysaccharides sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles (Donlan, 2002).

6. Quorum Sensing

C'est le phénomène de comportement communautaire « Biofilm » où les bactéries communiquent entre elles, en permettant de coordonner leur comportement et ainsi de fonctionner comme un organisme multicellulaire(Kukavica-Ibrulj, 2007 ; Chalvet de Rochemonteix, 2009 ;DjalloulDaoudji, 2010 ;Pecastaings, 2010).

Le Quorum sensing (QS) c'est un processus par lequel les bactéries produisent de molécules chimiques en réponse à la densité de population cellulaire pour contrôler l'expression des différents gènes liés aux différentes fonctions bactériennes (Ali, 2011). Ceci conduit à l'augmentation de la concentration d'une molécule signal Auto-inducteur (AI) dans l'environnement extracellulaire jusqu'à atteindre le seuil ou il y a une activation de la

production des gènes cibles, cela induit la réponse correspondante aux signaux, comme la production d'Exo-polysaccharides (EPS)(**Allnasouri, 2010 et Pecastaings, 2010**).

7. Les effets bénéfiques et néfastes de biofilms

7.1. Les effets bénéfiques

- a) Les biofilms jouent un rôle positif pour notre santé. La surface de notre peau est recouverte d'un biofilm dont la présence engendre une compétition microbienne rendant plus difficile la colonisation par des organismes pathogènes (**Percivalet al., 2012**). Les biofilms gastro-intestinaux assurent également un rôle de protection et participent au processus de digestion (**Macfarlane et al., 2011**).
- b) De plus peuvent s'avérer être des outils biotechnologiques d'un intérêt majeur comme les procédés de bio-remédiation permettant la décontamination in-situ de l'environnement (eaux usées, métaux et metalloïde), et pour le traitement des eaux usées par exemple (auto-épuration des lacs, système de boues activées dans certaines stations d'épuration) (**Klein, 2011, Thibaut, 2014**).
- c) Ils jouent aussi un rôle clé dans la production et la dégradation de la matière organique, dans les cycles d'azote, de soufre, ainsi dans la dégradation des polluants (**Marchall, 2010**).
- d) Les biofilms peuvent se révéler très utiles dans le domaine agroalimentaire. La production d'éthanol dans des réacteurs dans lesquels des levures *Saccharomyces cerevisiae* sont immobilisées sous forme de biofilm, sont utilisés également dans la production du vinaigre (acide acétique) (**Allnasouri, 2010**).

7.2. Les effets néfastes

- a) Dans le domaine médical, de nombreuses infections persistantes sont liées au développement de biofilms(**Figure 3**). Les biofilms sont en effet difficiles à éliminer, en raison de leur extrême résistance aux agents antibactériens (**Marchall, 2010**). Leurs conséquences peuvent être fatales pour les patients touchés (**Thibaut, 2014**).
- b) L'implantation des biofilms dans les réseaux de distribution d'eau est également un des problèmes importants rencontrés dans le maintien de la qualité de l'eau potable (contamination, mauvais goût)(**Allnasouri, 2010**).
- c) Dans les milieux industriels, un développement de biofilm peut engendrer des pertes de performance de procédés et perturbe le fonctionnement du système(**Thibaut, 2014**).

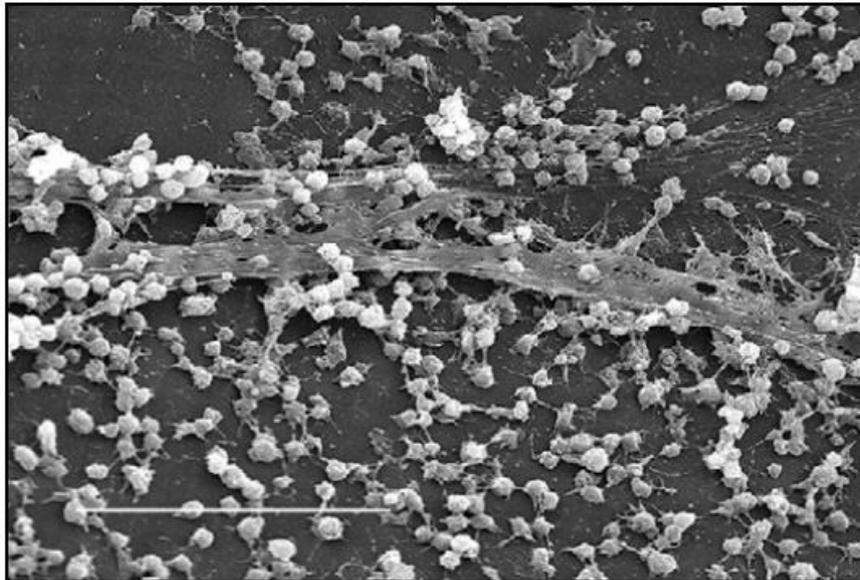


Figure3. Observation, MEB, d'un biofilm de Staphylocoque formé sur la face interne d'un dispositif médical (**Donlan, 2002**).

8. Importance des biofilms dans le domaine médicale

Dans le domaine médical, les biofilms sont responsables d'infections et posent de nombreux problèmes. Les infections liées à des biofilms touchent majoritairement les personnes immunodéprimés (**Ghigo et Roux, 2006**). En effet, 65% des infections sont dues à des biofilms. Plus de 80% des infections bactériennes chroniques sont associées à la présence de biofilms (**Chalvet de Rochementeix, 2009**).

La formation des communautés sessiles et leurs résistances inhérentes aux agents antimicrobiens sont la base de plusieurs infections bactériennes persistantes et chroniques. Ces infections peuvent être causées par une seule espèce ou d'espèces mixtes de bactéries ou de moisissures (**Costerton *et al.*, 1999**).

Le **tableau 1** ci-dessous expose certains exemples d'infections associées aux biofilms.

Tableau 1. Liste partielle d'infections humaines impliquant des biofilms
(Costerton *et al.*, 1999).

Infections	Espèces bactériennes communément impliquées
➤ Caries dentaires	➤ Cocci à Gram positif acidogènes (<i>Streptococcus</i> spp.)
➤ Périodonties	➤ Bactéries anaérobies orales, à Gram négatif
➤ Otites moyennes	➤ Souches d' <i>Haemophilus influenzae</i>
➤ Mucoviscidose pulmonaire	➤ <i>P. aeruginosa</i> et <i>Burkholderia cepacia</i>
➤ Endocardites	➤ <i>Streptococcus</i> sp. et <i>Staphylococcus</i> spp.
➤ Ostéomyélites	➤ Plusieurs espèces bactériennes et fongiques souvent mixés
➤ Infections de tractus biliaire	➤ Bactéries Entériques (<i>Escherichia coli</i>)
➤ Prostatites bactériennes	➤ <i>Escherichia coli</i> et autres bactéries à Gram négatif

8.1. Les biofilms et la peau

La peau est importante dans le maintien de la santé humaine et aussi pour l'invasion des agents microbiens qui peuvent être pathogènes. La peau est considérée comme une source d'infection causée par des microorganismes présents dans la peau qui sont aptes à former un biofilm (Percival *et al.*, 2012) (Figure 4).

Lors de l'infection d'un organisme par des biofilms les bactéries pénètrent dans l'organisme sous forme planctonique cette dernière stimule une réponse immunitaire de l'hôte, elle adhère à une surface au sein de l'organisme et forme un biofilm (bactéries sessiles) qui sont protégées par la structure de biofilm lui-même (la matrice), donc les anticorps ne peuvent pas détruire les bactéries du biofilm attaché et endommagent les tissus (Chalvet de Rochemonteix, 2009).

Les biofilms sont retrouvés dans les plaies et sont suspectés de retarder la cicatrisation de certaines plaies. L'analyse par microscopie électronique de biopsies provenant de plaies chroniques a révélé que 60 % des échantillons contenaient des structures de biofilms, ils constituaient un facteur majeur contribuant à de multiples maladies inflammatoires chroniques (Phillips *et al.*, 2010).

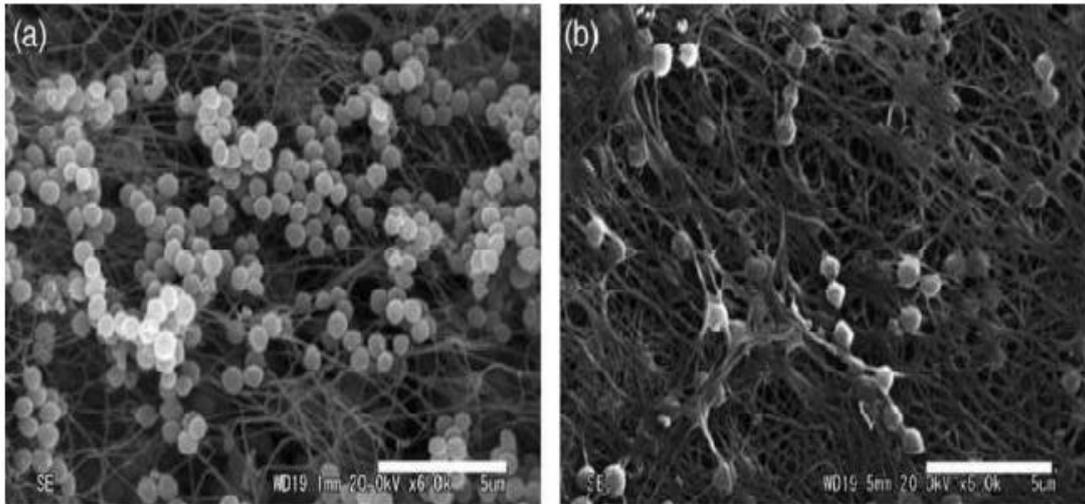


Figure 4.(a) et (b) représentent des biofilms de *Staphylococcus aureus* présents à la surface de la peau obtenues par microscope électronique à balayage (MEB) (Chalvet de Rochementeix, 2009).

CHAPITRE 2 : Les plaies du pied diabétique

1. Définition du diabète

Le diabète sucré est un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie chronique résultant d'un défaut de la sécrétion de l'insuline ou de l'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées. L'hyperglycémie chronique est associée à terme avec des complications organiques spécifiques touchant particulièrement les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux(Drouin *et al.*,1999).

Le diabète estdu soit à une insuffisance génétique ou acquise de la production d'insuline par le pancréas, soit au fait que cette insuline n'est pas assez active. Cette insuffisance provoque une augmentation de la glycémie (Concentration de glucose dans le sang) qui conduit à son tour à des lésions affectant plusieurs appareils ou systèmes (Tagougui, 2014).

Une hypoglycémie est une baisse du taux de sucre (la glycémie) dans le sang en deçà de la normale. Celle-ci est considérée comme iatrogène si elle est causée par la prise d'un médicament, comme ce peut être le cas chez les patients diabétiques. En effet, le diabète étant une hausse de la glycémie au-delà des valeurs normales, les hypoglycémies chez ces patients sont dues aux médicaments hypoglycémiant qui leur sont administrés(Sacareau, 2012).

2. Les deux grands types de diabète

Il existe essentiellement deux types de diabète :

2.1.Diabète de type 1

Le diabète de type 1 (type 1A) résulte d'une destruction sélective des cellules B des ilots de Langerhans. Les données expérimentales et celles des observations cliniques concordent pour faire de cette maladie une pathologie auto-immune exemplaire, déclenchée, chez un sujet génétiquement prédisposé, par des facteurs d'environnement(Buysschaert, 2006).

2.2. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 est une maladie hétérogène, non auto-immune, dont le diagnostic est posé à l'occasion de l'apparition de symptômes caractéristiques ou, dans près d'un tiers des cas, par la découverte fortuite d'une glycosurie ou d'une hyperglycémie (Buyschaert, 2006).

3. Le pied diabétique

Le « pied diabétique » est un vrai problème de santé publique, par son poids économique et son retentissement grave sur les patients qui en sont atteints, entraînant une dégradation marquée de la qualité de la vie. Ce pronostic est dominé par la récurrence et la survenue d'une amputation des membres inférieurs (Seghrouchni, 2011 ; Martini, 2015).

4. Les plaies du pied diabétique

La plaie est une solution de continuité des téguments produite par un agent mécanique; la plaie peut être avec ou sans perte de substance cutanée, elle peut être compliquée de lésion d'éléments sous-jacents. Ses risques sont l'infection et ses séquelles sont l'inévitable cicatrice (Goudote, 2006).

Une plaie chronique est une plaie dont le délai de cicatrisation est allongé au-delà de quatre à six semaines d'évolution (Guérin *et al.*, 2012). Elle correspond à une perte significative des couches superficielles de la peau : derme et épiderme. Toute la difficulté est de déterminer les étiologies de la prise en charge de ces plaies chroniques pour permettre d'adapter au mieux les thérapeutiques et d'obtenir une cicatrisation souvent longue et retardée par de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques qu'il faut rechercher et tenter de maîtriser (Baritaud *et al.*, 2013).

4.1. Diagnostic

Le diagnostic est clinique et non microbiologique puisque la plaie est obligatoirement colonisée par la flore commensale du patient ou par des espèces bactériennes provenant de l'environnement ou des flores endogènes du patient : la présence de bactéries sur une plaie ne signifie donc pas qu'elle soit infectée. L'infection doit ainsi être distinguée de la colonisation bactérienne (Bernard *et al.*, 2007).

4.1.1. Colonisation bactérienne

La colonisation est un phénomène physiologique développé sur toute la peau. Elle est liée à des espèces bactériennes provenant de la flore commensale cutanée, des flores endogènes ou de l'environnement.

La flore colonisante est composée de bactéries aérobies et anaérobies peu virulentes. Elle peut être modifiée en cas de diabète, devenant plus polymorphe avec apparition de cocci à Gram positif plus virulents comme *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pyogenes* (Bernard *et al.*, 2007).

4.1.2. L'infection

L'infection est définie par une invasion tissulaire avec multiplication de micro-organismes entraînant des dégâts tissulaires avec ou sans réponse inflammatoire de l'organisme (Bernard *et al.*, 2007) (Figure 5).

Dans le cas du pied diabétique, cette infection est en règle secondaire à une plaie cutanée. (Bernard *et al.*, 2007).



Figure 5.Infection du pied diabétique

(<http://www.allodocteurs.fr>).

4.2. Les facteurs déclenchant

Les facteurs déclenchants souvent impliqués sont explicités ci-après :

4.2.1. Les chaussures inadaptées (50 %)

- Les chaussures étroites, neuves ou trop usées, la présence des corps étrangers dans les chaussures sont les principaux facteurs qui blessent le pied.
- Les supports plantaires telles les semelles orthopédiques peuvent aussi être la cause des lésions lorsqu'elles sont déformées et durcies, ou pliées.
- Les chaussettes synthétiques avec d'épaisses coutures au niveau des orteils peuvent également léser le pied (Lushiku, 2006).

4.2.2. Les gestes inadaptés (25 %)

- Les soins de pied mal faits par le patient lui-même ou par le pédicure peuvent être responsables des blessures.
- Lors de l'usage d'un instrument tranchant, c'est la vue qui doit guider le geste et non la perception de la douleur. Lorsque la douleur apparaît, la plaie est déjà provoquée (Lushiku, 2006).

4.2.3. L'hygiène ou comportement inadapté (25 %)

- La mycose interdigitale sur une peau qui est déjà fragilisée peut entraîner une infection profonde.
- Lorsque les ongles poussent de façon anarchique (ongles incarnés, onychogryphose), ils peuvent léser l'orteil impliqué ou l'orteil voisin.
- Les bains de pieds prolongés (de plus de cinq minutes) dans le but de ramollir les callosités, créent une macération des callosités qui sont souvent fissurées, ceci favorise la pénétration profonde des germes présents dans les fissures.
- L'utilisation des bouillottes peut causer des plaies par action directe sur un pied dont la sensibilité thermique est diminuée.
- La marche pieds nus ainsi que le traumatisme par chute d'objet sur le pied peuvent également être impliqués dans les facteurs déclenchant (Lushiku, 2006).

4.3. Physiopathologie

4.3.1. Artériopathie

La macro angiopathie est extrêmement fréquente, d'autant plus qu'existent d'autres facteurs de risques associés. Il faut la rechercher à tous les étages(Vexiauet *al.*, 2008).

La micro angiopathie, spécifique du diabète, atteint les petits vaisseaux, les capillaires, avec une particularité liée à la neuropathie associée(Vexiauet *al.*, 2008).

4.3.2. Neuropathie

La neuropathie joue un rôle majeur dans la survenue des lésions des membres inférieurs. Son origine est essentiellement métabolique par accumulation de sorbitol dans l'nerf, responsable d'un œdème, puis d'une destruction axonale(Vexiauet *al.*, 2008).

Sur le plan physiopathologique, le mal perforant plantaire est la manifestation la plus typique de la complication neuropathique du diabète(Vexiauet *al.*, 2008).

4.4. Microbiologie des infections du pied diabétique

Les infections des pieds chez les diabétiques sont multiples. Il faut différencier les infections cutanées superficielles, en particulier les mycoses, des complications bactériennes, responsables des surinfections voire de cellulites qui entraînent des infections profondes avec un risque général majeur(Vexiauet *al.*, 2008).

4.4.1. Les mycoses

Les mycoses des pieds sont fréquentes et dominées par les dermatophyties. On rencontre aussi des atteintes par levures et plus rarement par moisissures. Le diabète mal équilibré peut favoriser leur développement et leur extension rapide. L'intertrigo et onychomycose sont habituels(Vexiauet *al.*, 2008).

L'onychomyco-dystrophie responsable des complications trophiques et infectieuses, est liée en grande part aux caractéristiques biomécaniques du pied et des orteils dans la chaussure (Figure 6)(Vexiauet *al.*, 2008). L'intertrigo se présente comme une petite desquamation se compliquant d'une fissure du fond des espaces interdigitaux, particulièrement le quatrième.

Il peut s'étendre sur le dos du pied, sur la plante, ses bords latéraux et jusqu'à la cheville (Figure 7)(Vexiau *et al.*, 2008).



Figure 6. Onychomycose avec dystrophie totale (Chaida et Bettahar, 2015)



Figure 7. L'intertrigo (<http://www.docteurclic.com>).

4.4.2. Les infections bactériennes

Les maux perforants plantaires sont souvent surinfectés. L'existence d'une inflammation locale avec écoulement purulent et signes de lymphangite, témoigne de cette infection. La sévérité est variable, allant de l'infection localisée à la possibilité de processus nécrotique avec fasciite ou de lymphangite remontant dans les gaines des tendons (Vexiau *et al.*, 2008). Les infections sont le plus souvent causées par des agents aérobies, cocci à Gram positif, en particulier le

Synthèse Bibliographique

staphylocoque doré ou le streptocoque. L'existence de germes à Gram négatif est fréquent aussi, *Escherichia coli*, *Klebsiellas*, et *Proteus*(**Tableau 2**).

Les germes anaérobies sont classiques mais ils sont rares, ils peuvent être responsables des lésions extensives graves comme la gangrène gazeuse.

Les complications sont le fait de surinfections à staphylocoques (cellulite, diffusion en profondeur vers les articulations et les gaines synoviales), streptocoques (érysipèle), *Proteus*, *Escherichia coli* et d'infections virales (verruques mosaïques sur intertrigo interdigital) (**Vexiau et al., 2008**).

Tableau 2. Corrélation clinico-biologique entre les types de plaies et les germes impliqués et identifiés
(**Toumiet et al., 2011**).

Type de plaie	Bactéries
Plaie superficielle récente sans antibiothérapie récente	<i>S. aureus</i> , streptocoques β -hémolytiques.
Plaie chronique (≥ 1 mois) ou antérieurement traitée par des antibiotiques	<i>S. aureus</i> , streptocoques β -hémolytiques, entérobactéries.
Plaie traitée par céphalosporines d'évolution défavorable	Entérocoques.
Lésion macérée	<i>Pseudomonas spp.</i> (en association avec d'autres micro-organismes).
Plaie de longue durée (ulcère ≥ 6 mois), traitement antérieur par des antibiotiques à large spectre	Polymicrobisme : cocci à Gram positif aérobies (<i>S.aureus</i> , streptocoques β -hémolytiques, SCN, entérocoques), corynébactéries, entérobactéries, <i>Pseudomonas spp.</i> , bacilles à Gram négatif non fermentatifs \pm agents fongiques.
Odeur nauséabonde, nécrose, gangrène	Cocci à Gram positif aérobies, entérobactéries, <i>Pseudomonas spp</i> , bacilles à Gram négatif non fermentatifs, anaérobies stricts.

4.5. Traitement du pied diabétique infecté

4.5.1. La mise en décharge

La mise en décharge est une partie essentielle et nécessaire au traitement médical des plaies du pied diabétique. Elle est valable pour tous les types de pied à risque, en cas d'infection aiguë et jusqu'à la guérison totale de l'ulcération (**Boursier et al., 2006 ; Qassimi, 2015**).

Plusieurs moyens et techniques de décharge peuvent être proposés allant de l'orthèse plantaire au fauteuil roulant ou l'alitement en passant par le chaussage temporaire, les orthèses standard et la botte en plâtre, les cannes, béquilles et les coussins de décharge. (**Qassimi, 2015**).

4.5.2. Le débridement médical

Le débridement est, en général, recommandé chez le diabétique. Il consiste à exciser au moyen de ciseaux, scalpels et curettes les parties molles nécrosées, les tissus dévitalisés et contaminés et les tissus fibreux pour ne laisser en place que du tissu sain et ainsi faciliter la cicatrisation (**Falang, 2005 ; Bernard et al., 2007**).

Le débridement diminue la charge bactérienne in situ 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. Il permet en outre la visualisation complète de la plaie, la mise à plat d'éventuels prolongements, un meilleur drainage des exsudats, une diminution de la production d'odeurs nauséabondes et la réalisation de prélèvements bactériologiques profonds. Le débridement aide la cicatrisation en transformant une plaie chronique « gelée » en une plaie aiguë beaucoup plus active (**Bernard et al., 2007**).

La première phase de lutte contre les biofilms est donc le débridement large des plaies avec retrait des tissus dévitalisés et des zones fistulisées, puis une irrigation abondante (nettoyage).

Après débridement d'une plaie, la rupture du biofilm n'est que temporaire, puisqu'il peut se reformer en 24 heures environ. Il existe donc une "fenêtre thérapeutique" (24 heures) pendant laquelle les bactéries seront plus sensibles aux divers traitements antimicrobiens (**Muller et al., 2014**).

La figure 8 Représente un mal perforant plantaire infecté.

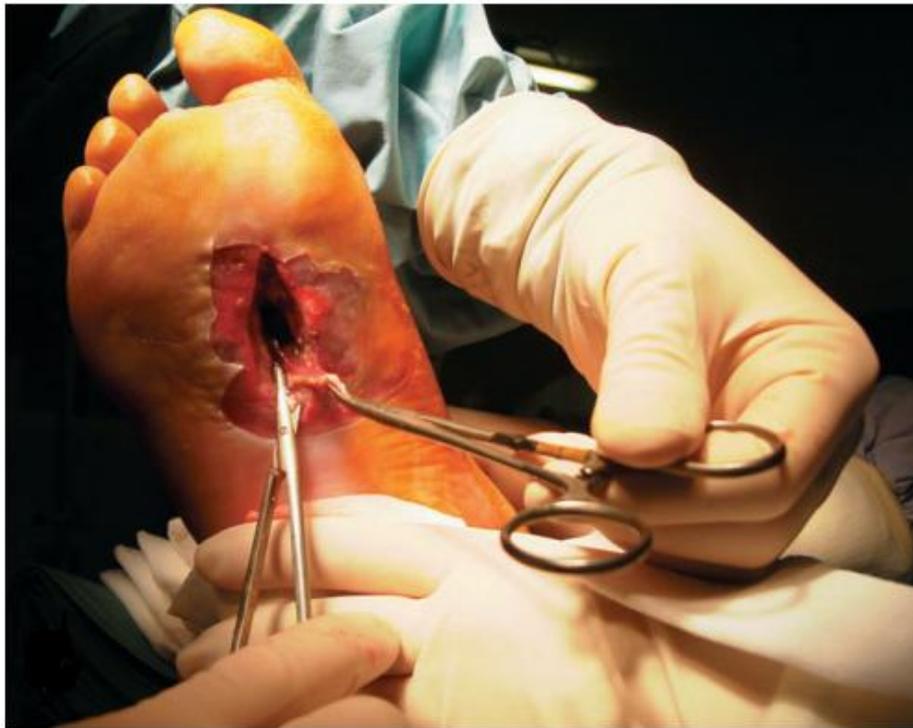


Figure 8. Excision des parties dévitalisées (Van Damme *et al.*, 2005).

4.5.3. Antibiothérapie des infections du pied diabétique

L'antibiothérapie repose sur la connaissance des principales bactéries responsables et leurs profils de sensibilité aux antibiotiques (Chakroun, 2007). Le choix des antibiotiques doit se faire selon l'efficacité vis-à-vis du ou des germes pathogènes et la capacité à éviter la sélection de bactéries multi résistantes (Hartemann-heurtier *et al.*, 2000).

L'antibiotique doit couvrir les bactéries les plus fréquemment impliquées dans ces infections. L'antibiothérapie initiale est empirique, mais certaines règles doivent être respectées. Une infection cliniquement sévère doit bénéficier d'une antibiothérapie à large spectre.

D'autre part, on doit toujours tenir compte des bactéries aérobies à Gram positif, particulièrement *S. aureus*. Enfin, les bactéries aérobies à Gram négatif doivent être considérées en cas d'infection chronique. Par ailleurs, des antibiotiques couvrant les germes anaérobies doivent être prescrits devant la constatation d'une nécrose ou d'une gangrène en présence d'artériopathie du membre (**Edmonds, 2009**).

En cas d'infection ancienne ou profonde ou ayant fait l'objet d'une antibiothérapie ou en cas d'hospitalisations antérieures. L'antibiothérapie doit comporter des molécules à spectre large du fait de la fréquence des infections poly microbiennes (**Lipsky, 2004 ; Lipsky et al., 2004**).

La présence d'un sepsis sévère ou d'un choc septique est une indication à la prescription d'une antibiothérapie à large spectre à base de bêta-lactamines ayant une activité sur *P. aeruginosa* et les anaérobies, associée à un anti-staphylococcique. A côté de l'imipénème, les associations ticarcilline-acide clavulanique et pipéracilline-tazobactam se sont révélées efficaces dans le traitement des infections sévères du pied diabétique, notamment à *P. aeruginosa*. L'adjonction d'un aminoglycoside, pendant 5 à 7 jours, permet d'obtenir une synergie d'action avec les bêta-lactamines en augmentant la vitesse de bactéricide. Elle est indispensable dans les infections à *P. aeruginosa*(**Lipsky, 2004 ; Toumiet et al., 2011**).

La présence d'une atteinte osseuse, l'ostéite du pied diabétique, est une infection pratiquement toujours chronique. Son traitement est difficile, en raison d'une réduction du flux sanguin au niveau de l'os, aggravée par l'artériopathie des membres inférieurs. Il est donc recommandé d'utiliser des molécules à bonne diffusion osseuse. Les antibiotiques privilégiés sont les fluoroquinolones, en cas d'infection à bacilles à Gram négatif, et la rifampicine ou la clindamycine, en cas d'infection à cocci à Gram positif. Ces molécules doivent être utilisées en association pour éviter la sélection de résistance bactérienne. Les bêta-lactamines à large spectre à fortes doses sont également recommandées. Leur choix serait justifié en cas d'infection poly microbienne et en cas de difficulté à documenter l'infection (**Brends et al., 2008 ; Hartemann-heurtier et al., 2008 ; Toumiet et al., 2011**).

4.5.4. Pansements

Dans les plaies infectées, les pansements adhésifs ou occlusifs sont à proscrire. Le pansement doit être adapté en fonction du volume des exsudats(**Bernard et al., 2007 et Ibo Issa Maman, 2013**).

Après le nettoyage, l'application d'un pansement sur la plaie la protège contre la contamination microbienne exogène. Les pansements antimicrobiens suppriment les bactéries à la phase planctonique, c'est-à-dire avant la formation du biofilm(**Saint-Cyr, 2011**).

Les pansements contenant du charbon ont l'avantage d'absorber les odeurs désagréables se dégageant de la multiplication bactérienne. Ceux contenant de l'argent, cation à propriété bactéricide, restent encore à évaluer.

Quel que soit le pansement appliqué, il est nécessaire d'établir des protocoles de soins précis et de documenter l'évolution de façon objective par la mesure régulière de la plaie associée à la prise de clichés photographiques(**Bernard *et al*, 2007 ; Ibo Issa Maman, 2013**).

4.6.Prévention des plaies du pied chez le diabétique

L'inspection des pieds chez les patients diabétiques doit être systématique à chaque consultation. Une fois les patients à risque dépistés, ces patients doivent bénéficier d'une surveillance ciblée doit commencer avant l'apparition de facteurs de risque et un contrôle régulier destiné à prévenir l'apparition de nouvelles lésions (mycoses, hyperkératoses,...) (**Pinet *al.*, 2003**).

En fonction du niveau de risque podologique, une stratégie de prévention des lésions ulcérées du pied est proposée(**Provost, 2005**).

- La prévention de l'apparition d'une neuropathie par l'obtention d'un équilibre glycémique optimal(**Husson, 2003**).
- Lutte contre les facteurs de risque vasculaire associés : tabac, dyslipidémie, hypertension artérielle (**Husson, 2003**).
- L'administration d'insuline, alimentation, inspection quotidienne des pieds(**Frykberget *al.*, 2006**).
- Les soins de pédicurie sont indispensables et ont pour but de réduire les risques que fait courir la survenue d'hyperkératoses et d'onychopathies(**Van Damme *et al.*, 2005**).
- Revascularisation interventionnelle si nécessaire pour restaurer un état circulatoire fonctionnel (**Husson, 2003**).

- Une hygiène rigoureuse des ongles et des espaces interdigitaux, l'application d'une crème hydratante pour lutter contre le dessèchement cutané plantaire (**Van Damme *et al.*, 2005**).
- Formation des services médicaux sont tout aussi important dans la prévention. En outre, la formation des services sont efficaces pour le renforcement des pratiques de soins des pieds diabétique, entraînant des réductions des ulcérations des membres inférieurs(**Frykberget *al.*, 2006**).
- L'éducation du patient vise à modifier ses comportements(**Husson, 2003**).

Matériel et Méthodes

1. Cadre de l'étude

Cette étude a été menée au laboratoire d'analyses médicales Lina (Casbah) à Constantine, durant la période allant de 6 Mars au 6 Avril 2016. Elle s'intéresse à l'analyse cyto bactériologique des prélèvements de plaies du pied chez des patients diabétiques (**Annexe 1**), hospitalisés au niveau de service de la médecine interne du Centre Hospitalo Universitaire (CHU) Ben Badis à Constantine.

2. Echantillonnage

Avant tout prélèvement, un nettoyage a été réalisé avec une gaze imbibée de sérum physiologique stérile. L'élimination de la flore bactérienne commensale a été assurée en utilisant d'antiseptiques doux.

L'écouvillonnage de la plaie c'est la méthode la plus utilisée (**Lavigne et al., 2007**). Elle consiste à faire passer une tige de coton au sein de la plaie, dans un mouvement en Z combiné à une rotation. Il est préférable de ne pas prélever sur les bords de la plaie.

Les écouvillons, contenant les échantillons à analyser, sont immédiatement acheminés au laboratoire (**Figure 9**). (Il faut que le temps du transport des prélèvements ne dépasse pas 2 heures dans une température ambiante).

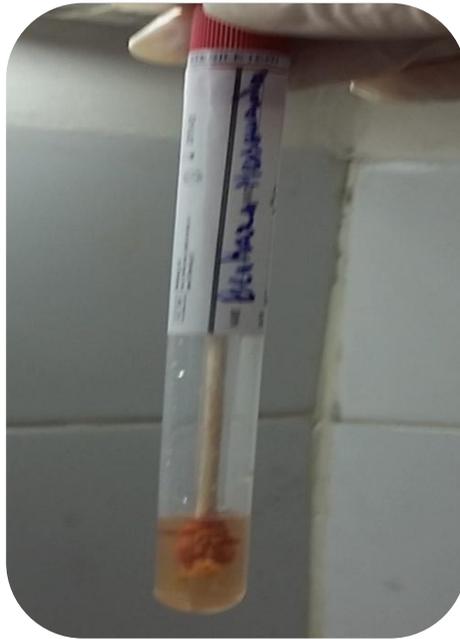


Figure 9.Photo d'un prélèvement d'une plaie infectée.

3. Traitement des échantillons

La détection de la population bactérienne des plaies nécessite l'application d'un protocole pour le traitement de ces échantillons. Le traitement de ces derniers a été basé sur un enrichissement à fin de favoriser la croissance des bactéries présentes et augmenter leur nombre pour une meilleure détection.

Une quantité suffisante de bouillon nutritif (BN) est ajoutée, à chaque prélèvement, de façon à ce que les échantillons soient complètement immergés. Par la suite, l'incubation se fait dans une étuve à 37°C pendant 1 à 2 h.

4. Examen microscopique (examen direct entre lame et lamelle)

C'est un examen de mise en œuvre très simple et qui a lieu au microscope optique à l'objectif X 40. Il permet d'apprécier la morphologie des bactéries, leur mode de regroupement, leur abondance et leur mobilité et aussi la présence de leucocytes, des cellules épithéliales et les hématies.

L'examen direct a été réalisé en déposant une goutte de l'échantillon de pus à l'aide d'une pipette Pasteur sur une lame de verre bien propre, recouverte par une lamelle en partant d'une position inclinée à 45°, le liquide ne doit pas déborder.

L'observation par la suite a été faite au grossissement 10 x 40.

5. Isolement bactérien

L'isolement, de diverses espèces bactériennes présentes, est réalisé sur trois milieux gélosés préalablement coulés en boîte de Pétri (à trois compartiments) à savoir : le milieu Chapman, le milieu Mac Conkey et la gélose au sang cuit « gélose au Chocolat » (**Tableau 3**).

Les tubes récupérés, après enrichissement, sont par la suite soumis à un vortexage. Après homogénéisation, l'ensemencement des milieux cités, est effectué en surface, en stries serres, avec une goutte de la suspension. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Tableau 3.Principe et intérêt de chaque milieu utilisé.

Milieu	Principe	Intérêt
Chapman	Milieu rendu inhibiteur par la forte concentration en chlorure de sodium (75 g/l). Mise en évidence de l'aptitude des staphylocoques à dégrader le mannitol grâce à la présence de rouge de phénol.	Milieu sélectif pour les bactéries du genre <i>Staphylococcus</i> .
Mac Conkey	L'inhibition des bactéries à Gram positif est due à la présence des sels biliaires et de cristal violet. La fermentation du lactose est révélée en présence de rouge neutre.	Milieu sélectif pour l'isolement des entérobactéries.
Gélose au chocolat	L'hémoglobine du milieu permet la culture de bactéries exigeantes.	Milieu richenon sélectif pour l'isolement des bactéries exigeantes.

6. Identification

L'identification des bactéries s'effectue sur la colonie pure, isolée sur les milieux déjà cités en appliquant les tests suivants :

6.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. Cet examen permet de déterminer la forme, la couleur, l'aspect de surface, l'aspect des bords de colonies, la consistance le relief, et l'aspect des colonies sur boîte de Pétri.

Dans le cas de la présence de plusieurs types de colonies, celles-ci sont soigneusement prélevées, et repiquées séparément sur les milieux d'origine en vue de leurs identifications.

6.2. La galerie biochimique

L'identification, à l'aide de la galerie biochimique classique en tube, permet de déterminer le genre et l'espèce au sein des entérobactéries.

L'inoculum est préparé comme suit : à l'aide d'une anse de platine, 2 à 3 colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées et puis déposées dans un tube contenant 1 à 2 ml du bouillon nutritif. Cette préparation est homogénéisée et sert pour l'ensemencement des milieux ci-dessous.

La série des milieux utilisés est détaillée dans **le tableau 4** avec leurs modes d'ensemencement ainsi que les résultats attendus.

Tableau 4. Identification biochimique à l'aide de 3 tests de la galerie classique.

Milieu de culture /Réactif	Technique	Caractère recherché	Résultats	
Urée indole	Ajout de 2 à 3 gouttes de la suspension bactérienne dans le milieu urée indole Incubation à 37C° pendant 24h.	Uréase	Coloration rouge : Uréase +	Coloration jaune : Uréase -
		Tryptophanase	Après addition du réactif du Kovacs : Formation d'un anneau rouge : Indole +	Après addition du réactif du Kovacs : Absence d'anneau rouge : Indole -
TSI(Triple SugarIron Agar)	Ensemencement de la surface par des stries serrées, puis le culot par simple piqûre centrale.	La fermentation du lactose, du glucose, du saccharose	Pente inclinée jaune : Saccharose et /ou Lactose + Culot jaune : Glucose +	Pente inclinée rouge : Saccharose et Lactose - Culot rouge : Glucose -
		La production de sulfure d'hydrogène (H ₂ S).	Noircissement : H₂S +	Absence de noircissement : H₂S -
		La production du gaz.	Présence de bulles dans le culot : Gaz +	Absence de bulles dans le culot: Gaz +
L'ortho-nitrophényl-galactopyrannoside(ONPG)	Ajout de 2 à 3 gouttes de la suspension bactérienne dans l'eau distillée. Un disque d'ONPG est déposé dans cette suspension. Incubation 30 min à 37°C.	Bêta-galactosidase	Milieu jaune : ONPG +	Milieu incolore : ONPG-

7. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité de toutes les souches, vis-à-vis différentes familles d'antibiotiques, est testée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du *CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute)* recommandées par l'OMS (**La standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale, avec collaboration de l'OMS 6ème édition, 2011**).

L'inoculum est préparé à partir d'une culture jeune de 24 heures. Quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont raclées à l'aide d'une anse de platine, et déchargées dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0,9 %. La suspension bactérienne ainsi préparée est bien homogénéisée.

Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension, essoré en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum, puis frotté sur la totalité de la surface de milieu Mueller-Hinton (MH), de haut en bas, en stries serrées. L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

À l'aide d'une pince préalablement flambée, les disques d'antibiotiques sont appliqués sur la surface de la gélose. Les boîtes sont, ensuite, incubées pendant 24 heures à 37 °C.

Les différents diamètres des zones d'inhibition, obtenus autour des disques d'antibiotiques, sont mesurés. L'interprétation en sensible (**S**),intermédiaire (**I**) ou résistante (**R**) est effectuée selon les critères définis par les recommandations de CLSI(**Annexe 4.6. et Annexe 4.7.**)

Les antibiotiques testés sont définies selon le groupe bactérien recherché. Ainsi, les ATB testés pour chaque groupe sont rapportés dans le **Tableau 5**.

Tableau 5. Liste des antibiotiques testés.

Bactéries	ATB	Sigle	Charge (µg)	Famille
Entérobactéries	Amoxicilline	AMX	30	Bêta - Lactamines
	Augmentin	AMC	30	
	Imipenème	IPM	10	
	Céfotaxine	CTX	30	
	Céfoxitine	FOX	30	
	Bactrim	SXT	25	Sulfamides
	Colistine	CS	10	Polymyxine
	Chloramphénicol	C	30	Phénicolés
	Gentamicine	GM	10	Aminosides
	Amikacine	AN	30	
	Tétracycline	TE	30	Tétracycline
Ciprofloxacine	CIP	5	Fluoroquinolones	
Cocci à Gram positif	Pénicilline G	P	10	Bêta- Lactamines
	Oxacilline	OX1	1	
	Céfazoline	CZ	30	
	Imipenème	IPM	10	
	Erythromycine	E	15	Macrolides
	Bactrim	STX	25	Sulfamides
	Pristinamycine	PT	15	Synergistines
	Rifampicine	RA	5	Rifamycines
	Clindamycine	CD	2	Lincosamides
	Lincomycine	L	15	
	Streptomycine	S	10	Aminosides
	Optochin	OP	5	Optochin

Résultats et Discussion

1. Isolement et identification des souches bactériennes

L'examen cyto bactériologique des plaies vise à faire le diagnostic d'une infection de plaie du pied chez des patients diabétiques. Il permet de déterminer s'il ya une infection associée à la présence de bactéries, et si oui d'identifier la bactérie responsable et d'évaluer l'importance de l'inflammation. Ainsi, cette analyse comporte un examen direct de plaie au microscope et une mise en culture afin de rechercher et d'identifier la présence de bactéries associées au biofilm.

L'examen microscopique du prélèvement entre lame et lamelle est fondamental. Il permet d'orienter le diagnostic dans tous les cas, il permet d'envisager la suite des examens à effectuer. Au cours de l'examen cytologique, le nombre de différents éléments contenus a été déterminé dans chaque échantillon de plaie, à savoir ; les leucocytes, les hématies et les cellules épithéliales.

En effet, en cas d'infection sur plaies du pied diabétiques, les leucocytes (globules blancs) sont très souvent rencontrés en grande nombre, car la multiplication bactérienne s'accompagne d'une levée des défenses immunitaires. Le nombre d'hématies (globules rouges) élevé peut avoir une indication en cas de troubles anormaux. La présence des cellules épithéliales correspond à la perte tout à fait normale des cellules superficielles du tissu de la peau.

Selon le **tableau 6**, le nombre de leucocytes, hématies et des cellules épithéliales est variable d'un prélèvement à l'autre.

Tableau 6. Résultats de l'examen cytologique.

Prélèvement	Leucocytes	Hématies	Cellules épithéliales
1	Absence	Absence	Quelques
2	Quelques	Présence	Quelques
3	Absence	Absence	Absence
4	Nombreux	Nombreux	Nombreuses
5	Absence	Nombreux	Quelques
6	Nombreux	Présence	Nombreuses
7	Absence	Présence	Quelques
8	Nombreux	Présence	Quelques
9	Quelques	Présence	Rare
10	Absence	Absence	Quelques
11	Quelques	Quelques	Quelques

(Rare : 1 cellule par champs, Quelques : 3 à 5 cellules par champs, Nombreux (ses) : plus de 300 cellules par champs, Présence : d'une façon générale, Absence : pas de cellules).

En effet, l'examen microscopique permet l'observation des cellules de défense (Leucocytes) due à une réponse du système immunitaire lors d'une infection microbienne sur les plaies du pied diabétique. Selon les dénombrements effectués, les taux les plus élevés de leucocytes ont été enregistrées chez les patients 4, 6 et 8, accompagnés d'un nombre significatif d'hématies et de cellules épithéliales. Par opposé, les cellules de défense sont absents chez les patients suivants : 1, 3, 5,7 et 10.

Une plaie se forme lorsque le revêtement cutané ou muqueux est altéré sur une plus ou moins grande surface. Cette altération constitue déjà en elle-même un facteur favorisant l'infection. Ainsi, les conditions de milieu sont, cependant propices au développement de bactéries. Le développement microbien ne sera pourtant durable que si les défenses de l'organisme sont diminuées.

La technique pratiquée, dans notre travail, afin de caractériser les biofilms associés aux plaies, consiste à recueillir des échantillons à l'aide de la technique de l'écouvillonnage, enrichissement en milieu liquide et par la suite mise en culture sur milieux de culture sélectifs (Lavigne *et al.*, 2007).

Résultats et discussion

En plus, les plaies sont toujours colonisées par la flore commensale de proximité. Donc, il faut l'éliminer par un nettoyage doux de la région infectée.

Durant la période de notre étude, diverses espèces bactériennes ont été identifiées, à partir des plaies du pied chez des patients diabétiques, à l'aide des méthodes conventionnelles d'identification bactérienne.

Les espèces bactériennes identifiées appartiennent à différents genres bactériens principalement ; les entérobactéries (Bacilles à Gram négatif) et les coques à Gram positif. Ainsi, les aspects macroscopiques de ces bactéries sont répertoriés dans le **Tableau 7** ci-dessous.

Tableau 7. Aspect macroscopique des coques à Gram positif et des Entérobactéries identifiées.

Groupe	Espèce bactérienne	Aspect macroscopique	
Coques à Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sur Chapman (Annexe ?)	
		Colonies jaunes sur fond jaune, rondes, lisses, opaques, bombées, crémeuses.	
Entérobactéries	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i>	Sur Mac Conkey (Annexe ?)	Sur gélose au chocolat (Annexe ?)
		Colonies incolores (ne fermentent pas le lactose) opaques, lisses, plates, envahissante, avec une odeur désagréable.	Colonies blanchâtres, envahissante de la gélose en voile.
	<i>Escherichia coli</i>	Colonies rouges (fermente le lactose), rondes et lisses.	Colonies blanchâtres, rondes et lisses.
	<i>Klebsiella spp.</i>	Colonies roses, rondes, bombées et muqueuses.	Colonies crémeées, rondes, bombées et muqueuses.

L'identification biochimique à l'aide de la galerie biochimique classique permet de différencier entre les espèces bactériennes au sein des entérobactéries. Ainsi, les caractéristiques biochimiques des entérobactéries sont résumées respectivement dans le **Tableau 8** ci-dessous.

Tableau 8. Caractères biochimiques des entérobactéries.

Caractères	(1) (Annexe ?)	(2) (Annexe ?)	(3) (Annexe ?)	(4) (Annexe ?)
Urèase	+	+	+	-
Indole	-	+	+	-
Sac / Lac	(+/-)	-	-	+
Glucose	+	+	+	+
H ₂ S	+	+	-	-
Gaz	+	-	+	+
ONPG	-	-	+	+

Bactéries : (1) : *Proteus mirabilis*, (2) : *Proteus vulgaris*, (3) : *Escherichia coli*,
(4) : *Klebsiella spp.*

(+ : positif, - : négatif et +/- : variable).

2. Présentation des résultats

Cette présente étude a concerné 11 patients des 2 sexes et de différentes catégories d'âge (de 36 à 80 ans) avec une moyenne de 55,45, hospitalisés au niveau du service de la médecine interne.

Concernant la classification du diabète, il s'agissait du diabète de type 1 chez 5 patients, soit 45,45 % des cas, et du diabète de type 2 chez 6 patients, soit 54,54 % des cas. Le taux d'amputation chez les patients concernés est de 36,36 % (4 patients).

2.1. Résultats de la culture

Sur 11 prélèvements de plaies analysés, 10 se sont révélés de culture positive (CP), soit un taux d'environ 91 %, alors que pour seulement 9 % la culture est négative (CN). Les prélèvements considérés comme positifs ont montrés, après culture sur les différents milieux de culture, un développement bactérien remarquable (**Tableau 9 et Figure 10**).

Tableau 9. Répartition des prélèvements selon leur culture.

Culture	Nombre	Pourcentage (%)
CP	10	90,91
CN	1	9,09
Total	11	100

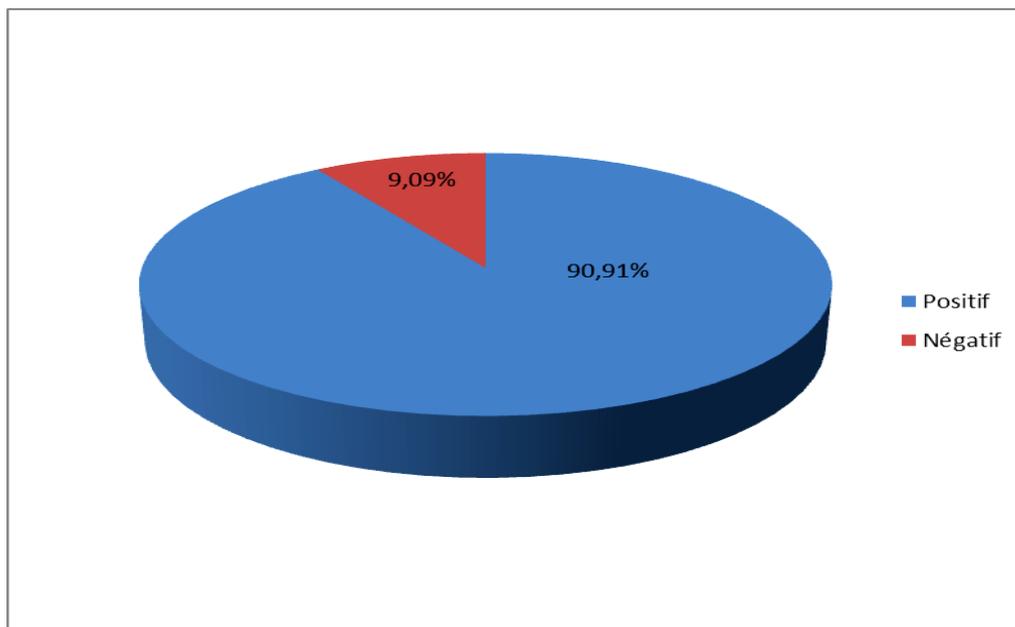


Figure 10. Répartition des prélèvements selon leur culture.

Ces résultats, concernant le taux élevé de positivité, sont proches de ceux rapportés par une étude à Ouagadougou sur écologie bactérienne, facteurs déterminants le profil bactériologique du pied diabétique. Donc, sur les 71 échantillons 62, soit 87,32 % des cultures étaient positive et 9, soit 12,67 % des cultures étaient négative (**Guira *et al.*, 2015**).

2.2. Souches bactériennes isolées à partir des plaies

D'après les résultats obtenus, les entérobactéries sont les germes prédominants avec un pourcentage d'environ 90,91 %.

Les souches de *Proteus mirabilis*, vient en tête de liste, au sein de ce groupe, avec un taux d'isolement élevé de 63,64 %. Elles sont suivies par *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* et *Klebsiella spp.* Avec un pourcentage de 9,09 % pour chacune des bactéries.

Les cocci à Gram positif prennent la deuxième position avec un pourcentage de 9,09 %. Par ailleurs, *Staphylococcus aureus* prédomine ce groupe.

Les résultats obtenus sont illustrés dans le **tableau 10** et **figure 11**.

Tableau 10. Souches bactériennes isolées et identifiées à partir des plaies.

Groupe	Souches	Nombre	Pourcentage (%)	Pourcentage global (%)
Entérobactéries	<i>Proteus mirabilis</i>	7	63,64	90,91
	<i>Proteus vulgaris</i>	1	9,09	
	<i>Escherichia coli</i>	1	9,09	
	<i>Klebsiella spp.</i>	1	9,09	
Coques à Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	9,09	9,09
Total		11	100	100

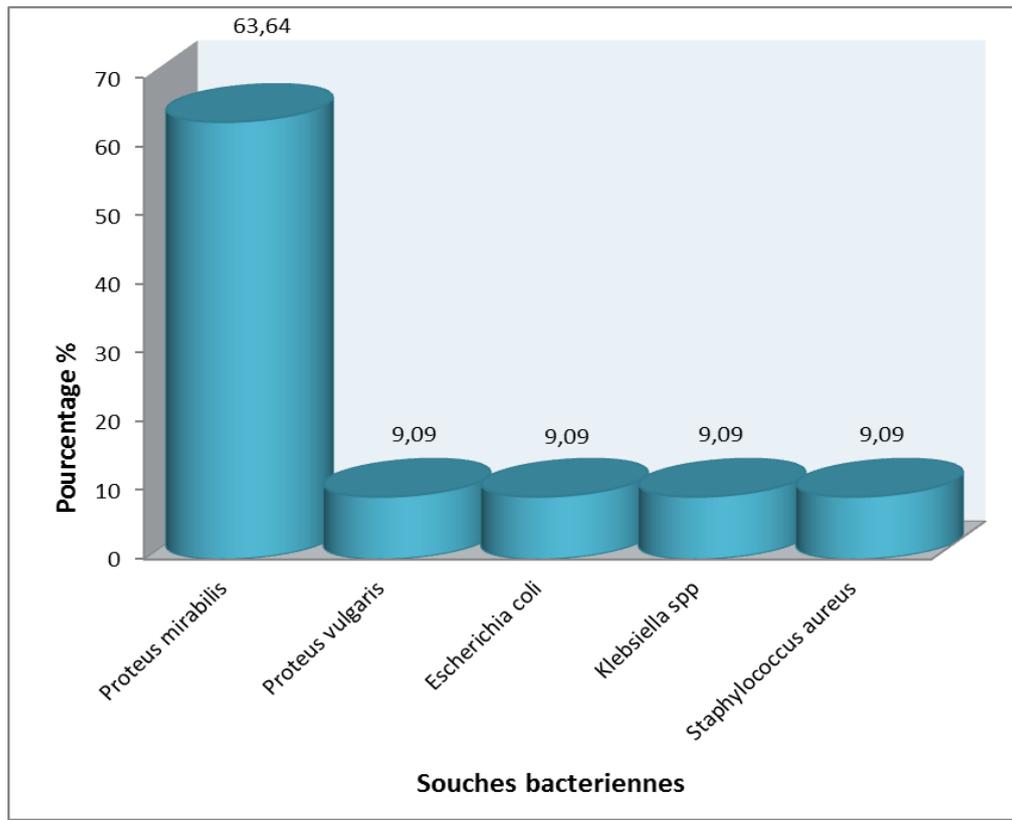


Figure 11. Pourcentage de souches bactériennes isolées et identifiées à partir des plaies.

Différentes études ont présenté plusieurs résultats avec une variété de souches bactériennes isolées à partir des plaies infectées du pied diabétique. Les germes le plus fréquemment en causes étaient les staphylocoques dorés et les streptocoques (**Boursier et al., 2006**).

Dans une étude, *S. aureus* prédominait avec 40,82 % versus 32,65 % d'entérobactéries, présentaient par deux souches de *P. mirabilis* (12,25 %), et *Pseudomonas aeruginosa* (20,4 %) (**Qassimi, 2015**).

Par ailleurs, d'autres travaux antérieurs ont révélé que les entérobactéries étaient présents dans 46 % des prélèvements réalisés : *E. coli* (20 %), *Enterobacter* (4 %), *P. vulgaris* (1 %), *Klebsiella* (10 %), *Morganella morganii* (7 %), *Serratia marccereus* (2 %), 2 % chez *Citrobacter freundii* et 16 % chez d'autres bacilles à Gram négatif. Les cocci à Gram positif étaient présents dans 56 % des prélèvements ; 34 % des prélèvements contenaient les staphylocoques (**Ibo Issa Maman, 2013**).

D'autres auteurs ont également suggéré que les cocci à Gram positif étaient les microorganismes prédominants qui colonisent et infectent la peau d'une façon aigue. Ainsi, *S. aureus* et les streptocoques β -hémolytique étaient les pathogènes les plus fréquemment isolés à partir des plaies chroniques (Lipsky *et al.*, 2004).

A la lumière de ces résultats, obtenus par plusieurs études, les bactéries à Gram positif étaient le plus souvent présentes, au niveau des plaies infectées, avec une prédominance de *S. aureus*. D'après nos résultats, au contraire, les entérobactéries étaient les plus dominants avec une fréquence d'isolement élevé enregistré pour *P. mirabilis*. Cette dernière est à l'origine d'infections grave des plaies du pied diabétique.

2.3. Formation de biofilm

Dans cette présente étude, les biofilms formés au niveau des plaies ont été composés soit d'une seule espèce ou de plusieurs espèces bactériennes, qualifiés respectivement de biofilms mono-bactérien et biofilms mixtes. Les premiers étaient les prédominants dans la majorité des cas, avec un nombre de 9 (soit 90 %). Le seul biofilm mixte est composé de deux bactéries « bi bactérien » à savoir *P. mirabilis* et *S. aureus* (10 %). Ces résultats sont récapitulés dans le **tableau 11** et la **figure 12**.

Tableau 11. Pourcentages de bactéries associées aux biofilms.

Biofilm	Nombre	Pourcentage (%)
Monobactérien	9	90
Mixte	1	10
Total	10	100

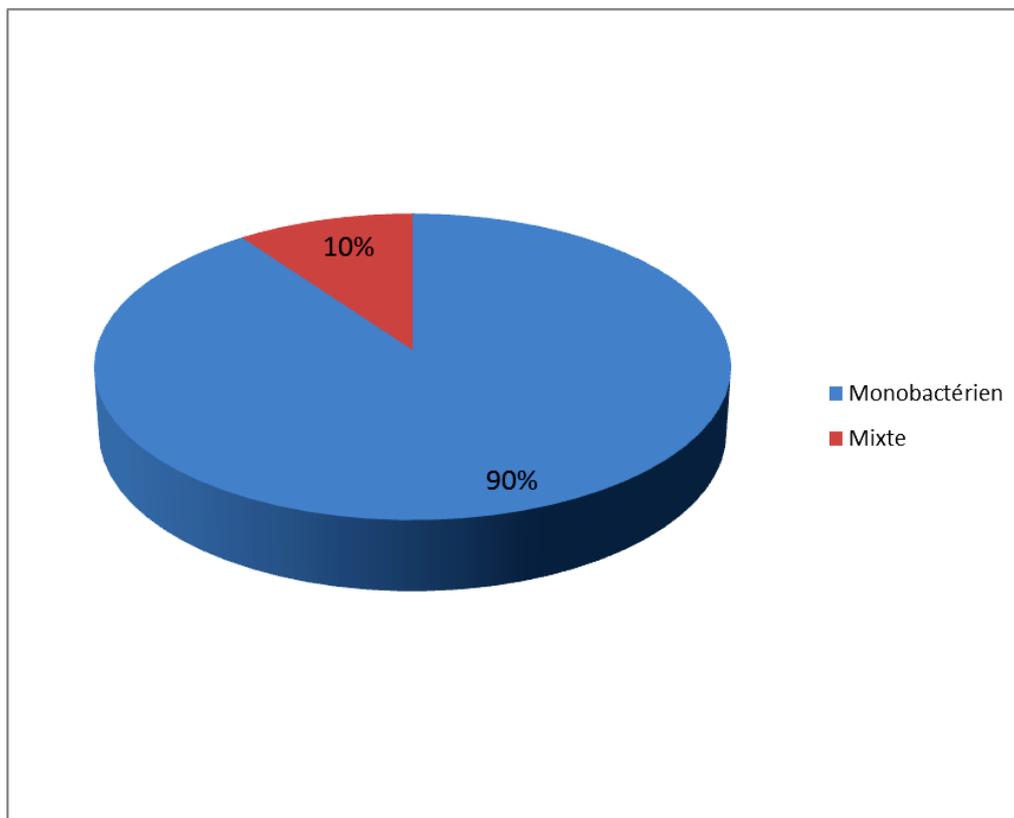


Figure 12. Pourcentages de bactéries associées aux biofilms.

L'examen bactériologique, effectué dans une étude chez 67 patients, a montré le plus souvent la présence de biofilm polybactériens avec prédominance de staphylocoque doré suivi du streptocoque, mais aussi des germes anaérobies (**Monabeka et Nsakala-Kibangou, 2001**). D'autres travaux ont également révélé la prépondérance de biofilms polybactériens avec notamment présence de prélèvements « bi bactériens », « tri bactériens » et « quadri bactériens » (**Ibo Issa Manman, 2013**). Différemment, notre étude décèle la prédominance des biofilms monobactérien, formés par les entérobactéries ; *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *Escherichia coli* et *Klebsiella spp.*

De plus, les associations bi bactériennes ont été présentes, dans la majorité des cas, entre les entérobactéries et les cocci à Gram positif à titre d'exemple : *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae* (**Qassimi, 2015**). Ces dernières observations sont semblables à celles

Rapportés dans cette étude qui montrent que *P. mirabilis* et *S. aureus* sont associées à un biofilm « bi bactérien ».

2.4. Répartition des bactéries isolées selon le type du diabète

2.4.1. Répartition des entérobactéries selon le type de diabète

Les 10 souches d'entérobactéries se répartissent en 4 souches isolées chez les patients diabétiques de type 1 soit un taux de 40 % et 6 souches chez les sujets atteints de diabète de type 2 soit un taux de 60 %. Ces résultats sont récapitulés dans le **tableau 12** et représentés dans la **figure 13**.

Tableau 12. Répartition des entérobactéries selon le type de diabète.

Type de diabète	Nombre	Pourcentage (%)
1	4	40
2	6	60
Total	10	100

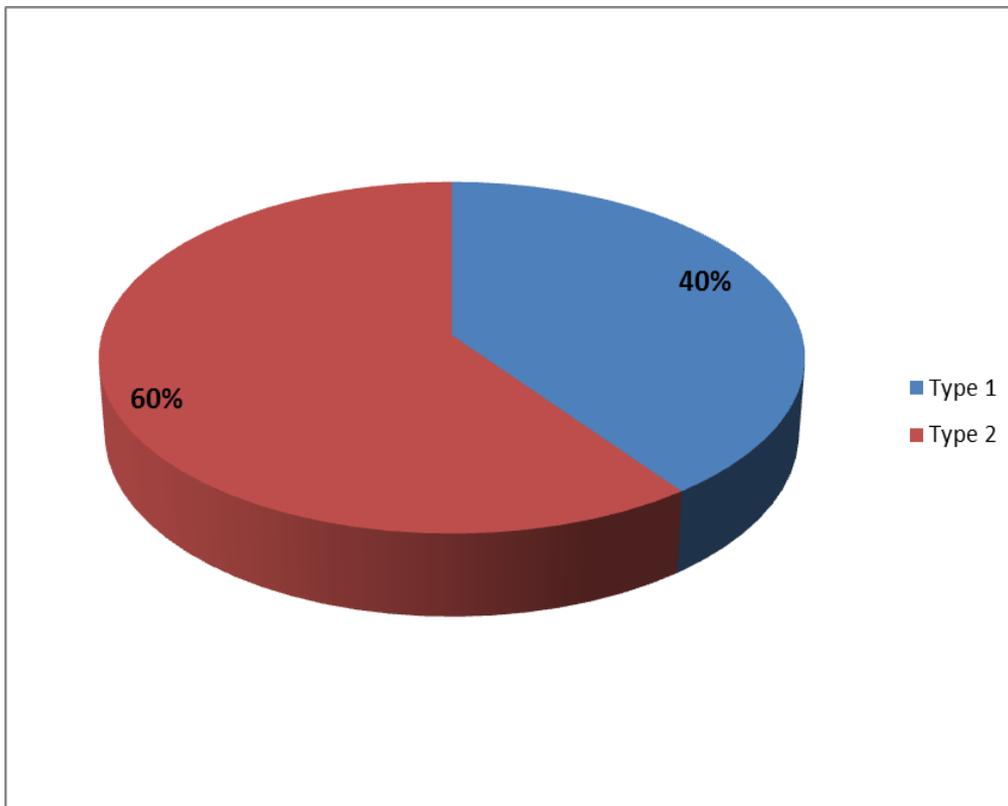


Figure 13. Répartition des entérobactéries selon le type de diabète.

2.4.2. Répartition des cocci à Gram positif selon le type de diabète

La seule souche de *S. aureus* a été isolée à partir d'une plaie présente chez un sujet atteint de diabète de type 2 (100 %) et aucun cocci à Gram positif n'a été isolé chez le type 1 (0 %). Ces résultats sont récapitulés dans le **tableau 13**.

Tableau 13. Répartition des cocci à Gram positif selon le type de diabète.

Type de diabète	Nombre	Pourcentage (%)
1	0	0
2	1	100
Total	1	100

2.5. Répartition des bactéries isolées selon le sexe

2.5.1. Répartition des entérobactéries selon le sexe

Les 10 souches d'entérobactéries se répartissent en 6 souches isolées chez le sexe masculin soit un taux de 60 % et 4 chez le sexe féminin soit un taux de 40 % (**Tableau 14 et Figure 14**). Ce qui montre la prédominance des entérobactéries chez les hommes par rapport aux femmes.

Tableau 14. Répartition des entérobactéries selon le sexe.

Sexe	Nombre	Pourcentage (%)
Homme	6	60
Femme	4	40
Total	10	100

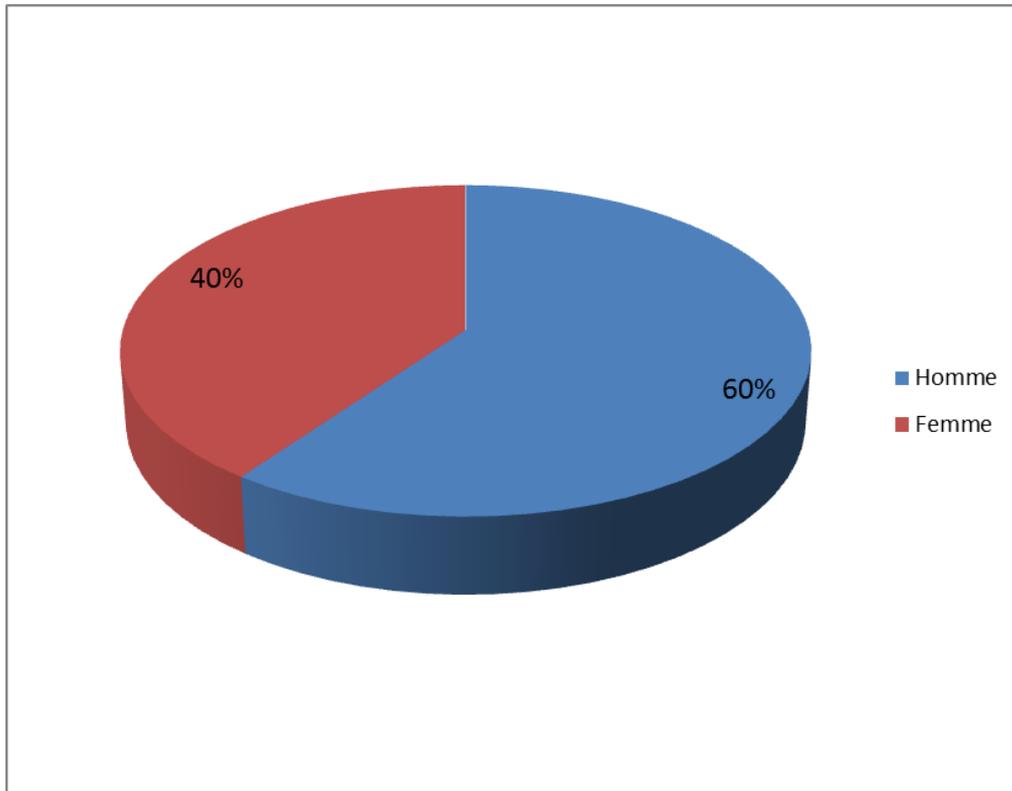


Figure 14. Répartition des entérobactéries selon le sexe.

2.5.2. Répartition des cocci à Gram positif selon le sexe

La seule souche de *S. aureus* a été isolée chez une femme (**Tableau 15**).

Tableau 15. Répartition des Cocci à Gram positif selon le sexe

Sexe	Nombre	Pourcentage (%)
Homme	0	0
Femme	1	100
Total	1	100

De même, la prédominance de sexe masculin, en ce qui concerne l'isolement des entérobactéries, a été préalablement mentionnée dans une étude africaine au Tchad chez 81

patients diabétiques hospitalisés pour ulcère du pied, 51 étaient des hommes, soit 62,9 % et 30 étaient des femmes, soit 37 % (Dionadji *et al.*, 2010).

2.6. Taux de résistance des espèces isolées

La détection des phénotypes de résistance, des souches bactériennes isolées, a été réalisée en pratiquant la méthode conventionnelle de diffusion des disques en milieu gélosé et les critères de lecture et d'interprétation sont ceux du CLSI.

2.6.1. Taux de résistance des entérobactéries

Les profils de résistance des 4 espèces isolées, constituant le groupe des entérobactéries, ont montré une variabilité de comportements vis à vis les 12 ATB testés (Tableau 16).

Au total, les taux de résistance des souches, les plus élevés, ont été enregistrés pour les ATB de la famille des béta-lactamines (AMX, AMC), et (TE) de la famille de Tétracycline ensuite (CS) de la famille Polymyxine.

Contrairement aux autres espèces, les souches de *P. mirabilis*, apparaissent comme les souches les plus résistantes à l'ensemble des ATB testés (Annexe 4.1). Presque la moitié de souches sont résistantes à (AN) (57, 14 %). En plus, les taux de résistance les plus faibles ont été enregistrés pour la (CIP) (Figure 15). En effet, 14,28 % seulement de souches sont résistantes à cet ATB.

Effectivement, l'ensemble des ATB suivants ; SXT (famille des sulfamides), IPM, CTX, FOX (famille des béta-lactamines), C (famille des phénicolés), GM (famille des aminosides) garde une bonne activité sur les souches de *P. vulgaris*, *E. coli* et *Klebsiella spp.* (Annexe 4.2, Annexe 4.3, Annexe 4.4) (Figure 16, Figure 17 et Figure 18).

Tableau 16. Les Taux de résistance des entérobactéries isolées à partir des plaies.

ATB	<i>P. mirabilis</i> (7)	<i>P. vulgaris</i> (1)	<i>E. coli</i> (1)	<i>K. spp.</i> (1)
AMX	100 %	100 %	100 %	100 %
AMC	100 %	100 %	100 %	100 %
SXT	100 %	0 %	0 %	0 %
IPM	28.57 %	0 %	0 %	0 %
CTX	28.57 %	0 %	0 %	0 %
CS	100 %	100 %	0 %	100 %
C	71.43 %	0 %	0 %	0 %
GM	42.86 %	0 %	0 %	0 %
AN	57.14 %	0 %	100 %	0 %
FOX	42.86 %	0 %	0 %	0 %
TE	100 %	100 %	100 %	100 %
CIP	14.28 %	0 %	100 %	0 %

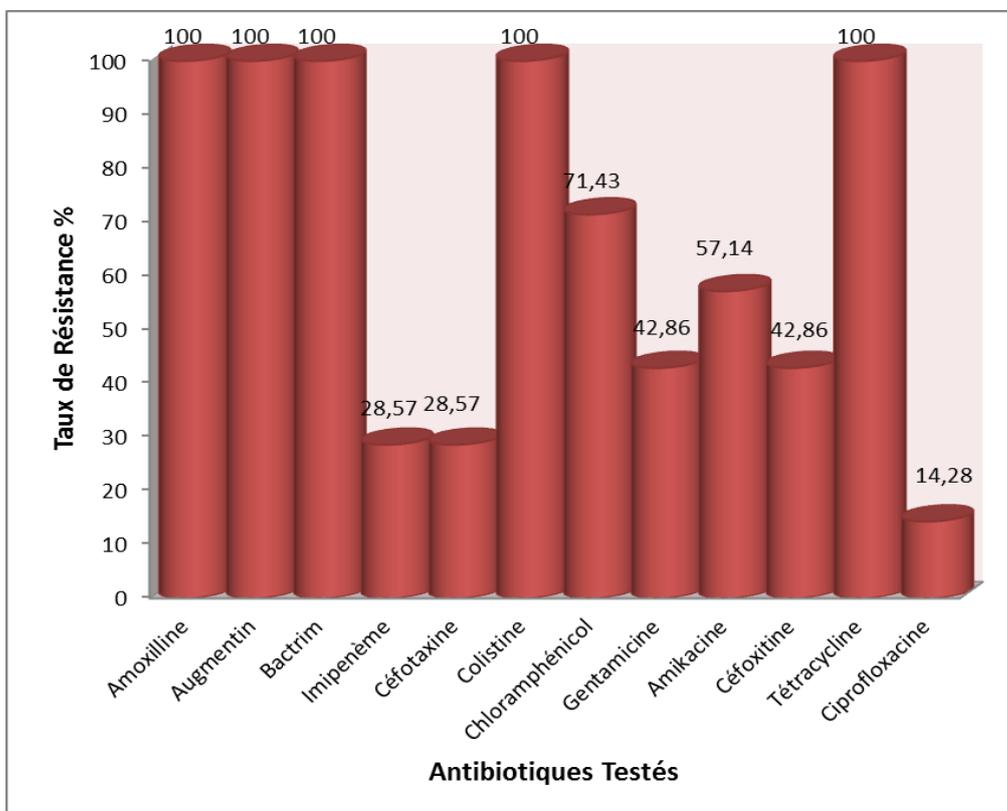


Figure 15. Les taux de résistance de *P. mirabilis* isolées à partir des plaies.

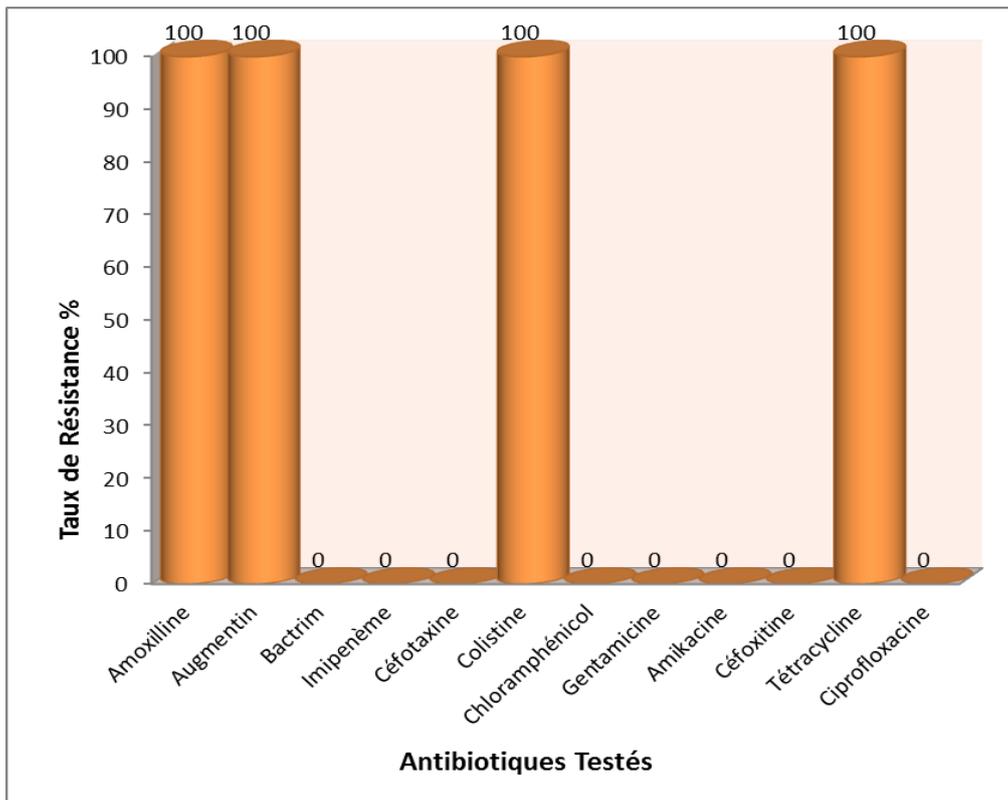


Figure 16. Les taux de résistance de *P. vulgaris* isolée à partir des plaies.

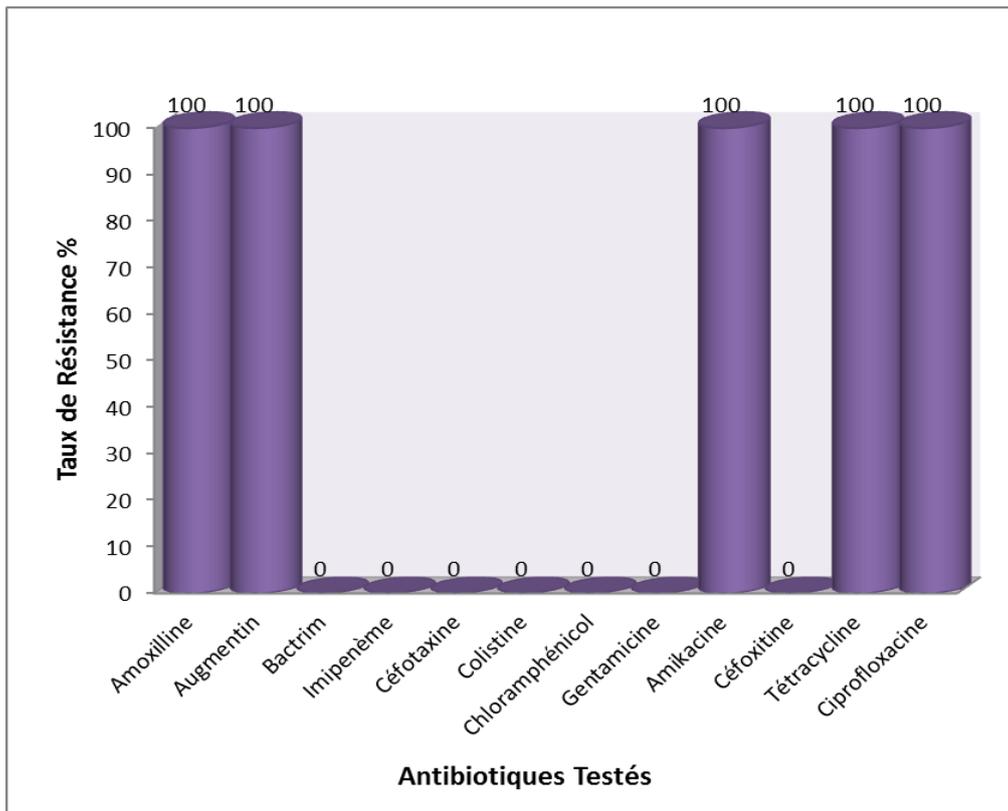


Figure 17. Les taux de résistance d'*E. Coli* isolée à partir des plaies.

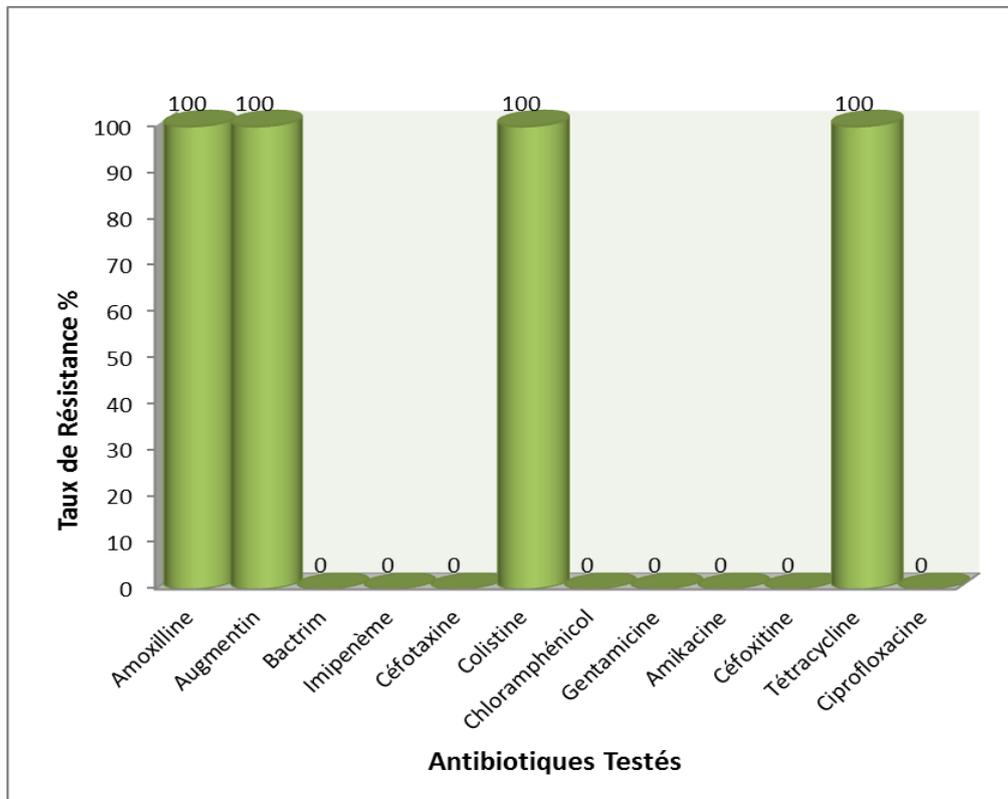


Figure 18. Les taux de résistance de *Klebsiella spp.* Isolée à partir des plaies.

L'analyse des résultats obtenus, représentant le spectre des principaux antibiotiques utilisés dans les infections du pied diabétique, l'ensemble des entérobactéries est plus ou moins résistants à AMX et sensible à IPM (Ha Van, 2008). Par conséquent, ces observations sont tout à fait en accord avec celles rapportés dans notre étude à l'exception de *P. mirabilis* qui possède un pourcentage d'environ 29 % à ce dernier ATB.

À l'issue des cultures bactériologiques réalisées dans une autre étude, les taux de résistance de différents germes ont été identifiés. Au regard des résultats des mises en cultures et de l'antibiogramme, le choix des Fluoroquinolones ne semble pas toujours approprié, en effet, de nombreux germes y sont résistants. Les taux de résistances des entérobactéries étaient: 44,4 % pour *E. coli*, 11,1 % pour *K. pneumoniae* et de 0 % pour *P. mirabilis*. La résistance aux bêta-lactamines était de 0 % pour *K. pneumoniae* (Lokrou *et al.*, 2013).

La fréquence de sensibilité des entérobactéries était de 94 % à IPM et de 50 % à la Ceftriaxone et la CIP (Guira *et al.*, 2015). Comparativement, les résultats de ces travaux sont proches à ceux rapportés dans notre étude.

2.6.2. Taux de résistance de *Staphylococcus aureus*

Selon les profils déterminés (Annexe 4.5), la souche de *S. aureus* présente de multiples résistances aux familles d'ATB (bêta lactamines, sulfamides, synergistine, rifamycines et aminoside). A l'opposé, l'efficacité des ATB contre cette souche a été seulement notée pour 4 ATB à savoir ; E (de la famille des macrolides), CD, L (de la famille des Lincosamides) et OP avec 0 % de résistance (Tableau 17 et Figure 19).

Tableau 17. Les taux de résistance de *Staphylococcus aureus* isolée à partir des plaies.

ATB (en abréviation)	<i>S. aureus</i>
P	100 %
OX1	100 %
CZ	100 %
E	0 %
SXT	100 %
IPM	100 %
PT	100 %
RA	100 %
CD	0 %
L	0 %
S	100 %
OP	0 %

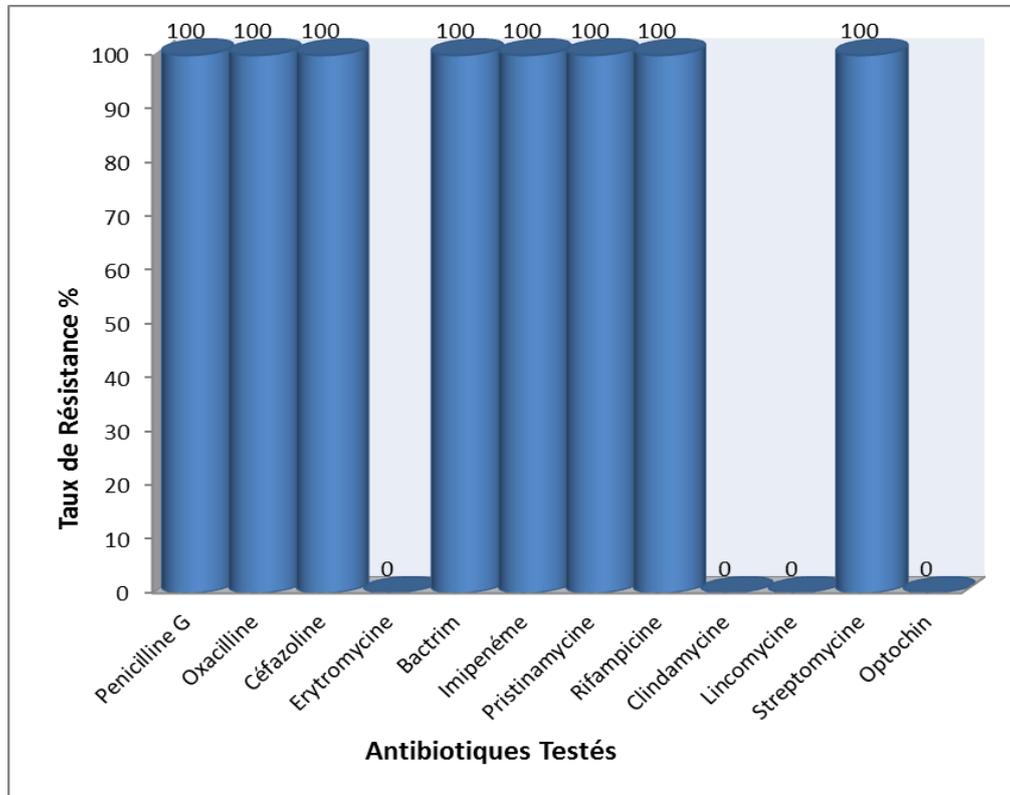


Figure 19. Les taux de résistance de *S. aureus* isolée à partir des plaies.

En revanche, une étude, a révélé que les taux de résistance de *S. aureus* étaient de 0 % pour les bêta-lactamines est de 0 % pour les macrolides (Lokrou *et al.*, 2013).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Ha Van (2008), représentant le spectre des principaux antibiotiques utilisés dans les infections du pied diabétique, qui ont indiqué que le Staphylocoque doré est résistant à deux antibiotiques OX1 et à IPM, appartenant aux bêta-lactamines (Ha Van, 2008).

Conclusion

Conclusion

Les bactéries vivent préférentiellement sous forme de biofilms. Ce dernier, qui se développe sur des surfaces telles que les tissus vivants, est la cause majeure des infections. Les bactéries impliquées sont essentiellement ceux de la flore cutanée sur les plaies infectées. Les infections du pied diabétique restent une complication silencieuse du diabète mais grave et constituent la cause la plus fréquente des amputations chez les patients diabétiques.

Dans cette étude, les résultats obtenus, à l'issue de l'examen cytologique des plaies, ont révélé que les taux les plus élevés de leucocytes ont été enregistrés chez les patients 4,6, 8 accompagnés par des nombres importants d'hématies et de cellules épithéliales. En effet, ce test a permis de déterminer la présence de bactéries responsables de l'infection chez le diabétique.

D'autre part, 5 entérobactéries ; *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *E. coli*, *Klebsiella* spp. et un cocci à Gram positif ; *S. aureus* ont été isolées à partir de prélèvements des plaies du pied diabétique. *P. mirabilis*, qui est connue comme la principale cause des infections du pied diabétique, vient en tête de liste. L'identification des souches bactériennes a été effectuée selon les méthodes conventionnelles.

L'analyse des résultats obtenus, en ce qui concerne la formation de biofilms bactériens au niveau des plaies, a montré que la formation de biofilms était prédominée par les biofilms monobactérien ainsi qu'à la présence d'un seul cas d'association mixte «bi bactériens», entre *P. mirabilis* et *S. aureus*.

Les résultats obtenus ont également indiqué une prédominance des entérobactéries chez les diabétiques de type 2 ainsi que chez le sexe masculin.

Par ailleurs, les souches bactériennes isolées ont fait l'objet de l'étude de leurs profils de résistance aux ATB. Par conséquent, les profils déterminés ont montré que les souches de *P. mirabilis* sont les plus résistantes au sein des entérobactéries et que les autres souches ont présenté une sensibilité à presque la moitié des ATB testés. En plus, les taux de résistance les

plus faibles, chez les souches de *P. mirabilis*, ont été enregistrées pour la Ciprofloxacine. Effectivement, *S. aureus* a montré de multiples résistances aux différentes familles d'ATB.

L'incidence du pied diabétique ne cesse d'augmenter constituant ainsi un défi croissant pour la santé publique. L'éradication d'un biofilm bactérien pose aussi de gros problèmes cliniques, car l'antibiothérapie active habituellement sur les bactéries à l'état planctonique se révèle bien souvent moins efficace sur des structures organisées en biofilm.

Devant une écologie bactérienne polymorphe et devant la résistance constatée aux antibiotiques, la collaboration entre biologiste, médecin et chirurgien est primordiale pour améliorer l'évaluation du risque podologique et une meilleure prise en charge des patients à risque d'ulcéré du pied.

Pour protéger un pied diabétique potentiellement fragile, on doit prendre en compte l'éducation du patient et le conseiller et surtout responsabiliser le malade diabétique en insistant sur le point clé : le diabétique doit obligatoirement prendre ses pieds en mains.

Références bibliographiques

A

- Ali S. (2011). The role of Quorum sensing in survival, Biofilm formation and gene expression of *Listeria Monocytogenes*. Thèse de doctorat en Philosophie in Food science. Université de Guelph, Canada.
- Alnnasouri M. (2010). Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat en génie des procédés et des produits. Institut National Polytechnique de Lorraine, France.
- 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.

B

- Baritaud S., Desmoulière A., Durand-Fontanier S., Martin C., Pesteil F., Sparsa A. (2013). Les principales plaies susceptibles d'être traitées par le miel. *Actualités pharmaceutiques* ; 531: 32-35.
- Bellifa S. (2014). Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat en maîtrise du développement microbien. Université abou bekr belkaid, Tlemcen.
- Bernard L., Stahl J P. (2007). Recommandations pour la pratique Clinique prise en charge du pied diabétique infecté. *Medicine et maladies infectieuses* 37;26-50.
- Boursier V., Pernes J M., Fukui S., Priollet P ; (2006). Plaies du pied chez le diabétique. *STV Sang Thrombose Vaisseaux* ; 18 : 282-286.
- Branger A., Richer M-M., Roustel S. (2007). Quelque système microbien : les biofilms. Dans : *Microbiochimie et alimentation*. Educagri éditions, dijón ; p.131-164.

- Brendt A R., Peters E J G., Bakker K., Embil J M., Eneroth M., Hinchliffe R J., Jeffcoate W J *et al.* (2008). Diabetic foot osteomyelitis: a progress report on diagnosis and a systematic review of treatment. *Diabetes Metab Res Rev*; 24(suppl 1): S145-S161.
- Buysschaert M. (2006). *Diabétologie Clinique*. De Boeck Supérieur.

C

- Chaida H, Bettahar M A. (2015). L'onychomycose. Mémoire de Pharmacie. Université Abou Belkaid Tlemcen.
- Chakroun M. (2007). Antibiothérapie des infections osteo-articulaires aigues communautaire a pyogenes. *Rev tun infectio* ; 1 : 33-42.
- Chalvet de Rochemonteix A. (2009). Les biofilms et la peau. Thèse Pour le Doctorat vétérinaire. École Nationale Vétérinaire D'alfort Paris.
- Clutterburk A.L., Woods E.J., Knottenbelt D.C., Clegg P.D., Cochrane C.A., Percival S.L.
- Costerton J.W., Stewart Philip S. ET Greenberg E.P. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*. 284: 1318 – 1322.

D

- Dionadji M., Brahim B., Djimadoum B., Dangar D. (2010). Ulcère du pied et diabète une pathologie grave et fréquente au Tchad. *Medecine* ; 475-477.
- Djelloul Daouadji, S. (2010). Détection de biofilm a staphylocoques sur cathéters veineux. Mémoire de Magister en biologie moléculaire et cellulaire. Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.
- Donlan R.M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*; 8, 9: 881– 890.
- Drouin P., Blickel J.F., Charbonnel B., Eschwege E., Guillanseau P.J. (1999). Diagnostic et lassification du diabète sucré Les nouveaux critères. *Diabètes et Métabolisme (Paris)* ; 25 :72-83.

E

- Edmonds M. (2009). The treatment of diabetic foot infections: focus on ertapenem. *Vascular Health and Risk Management* ; 5 : 949-963.

F

- Falanga V. (2005). Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*; 366:1736–1743.
- Fromantin I. (2012). Etude de la flore bactérienne dans les plaies tumorales du sein : incidence des biofilms bactériens sur l'évolution des plaies et le développement d'odeurs. Thèse de doctorat en médecine et santé. Université de Cergy-Pontoise.
- Frykberg R G., Zgonis T., Armstrong D G., Driver V R., Giurini J M., Kravitz S R., Landsman A S et al. (2006). Diabetic foot disorders: a clinical practice guideline. *Journal of Foot and Ankle surgery (suppl)*; 45:S1-S65.

G

- Goudote A. (2006). Etude de l'inféction des plaies non opératoires dans le service de traumatologie et d'orthopédie de l'hôpital Gabriel Toure. Thèse de doctorat en Pharmacie. Université de bamako faculté de medecine de pharmacie et d'odontostomatologie. Mali.
- Guérin A., Robillard R., Codis P., Charu P., Del Missier N., Callanquin., M. (2012). Traitement des plaies chroniques non évolutifs par électro stimulation chez la personne âgée hospitalisée : réaction de trois cas cliniques. *Le Pharmacien Hospitalier et Clinicien* ;47: 244-250.
- Guira O., Tiéno S., Diallo I., Ouangré E., Sagna Y., Zabsonré J., Yanogo D., Traoré S S., Drabo Y J. (2015). Ecologie bacterienne et facteurs déterminant le profil bactériologique du pied. Diabétique infecté à Ouagadougou (Bourkina Faso). *Société de pathologie exotique et Lavoisier* ; 1-5.

H

- Hartemann-Heurtier A, Senneville E. (2008). Diabetic foot osteomyelitis. *Diabetes and Metabolism* ; 34 : 87-95.
- Hartemann-Heurtier A., Marty L., Havan G., Grimaldi A. (2000). Place de l'antibiothérapie dans le traitement du pied diabétique. *diabète and metabolism*; 26 : 214-224.
- Ha Van G. (2008). *Le pied diabétique*. Springer. Elsevier Masson.

- 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.
- [Http://www.allodocteurs.fr/actualite-sante-comment-le-diabete-peut-il-conduire-a-l-amputation-_12001.html](http://www.allodocteurs.fr/actualite-sante-comment-le-diabete-peut-il-conduire-a-l-amputation-_12001.html).
- [Http://www.docteurclic.com/maladie/intertrigo.aspx](http://www.docteurclic.com/maladie/intertrigo.aspx).
- Husson M C. (2003). Escarre, ulcère, Pied diabétique : Pansements et biomatériaux aide à la cicatrisation. *Dossier du CNHIM* ; 6 : 1-63.

I

- Ibo Issa Maman N. (2013). Antibiothérapie des infections du pied diabétique. Thèse de doctorat en médecine. Université Mohammed V- Souissi, Maroc.

J

- Jamal D. (2015). Influence de stress environnementaux sur les propriétés physico-chimiques de jeunes biofilms en cours de formation : Etude par spectroscopie

vibrationnelles infrarouge-Raman et de force AFM. Thèse de doctorat en chimie, Université de Lorraine, Nancy, France.

- Jamal M., Taasneem U., Hussain T., Andaleeb S. (2015). Bacterial biofilm: its composition, Formation and role in human infections. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 4:1-14.

K

- Khalilzadeh P. (2009). Formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* : evaluation d'inhibiteurs potentiels du quorum sensing. Thèse de doctorat en microbiologie. Université Paul Sabatier (Toulouse III), France.
- Klein G. (2011). Nouvelles molécules naturelles inhibitrices du développement de biofilms de bactéries marines. Thèse de doctorat en microbiologie. Université de Bretagne occidentale, Bretagne.
- Kukavica-Ibrulj I. (2007). Chapitre 1. Introduction. Collection mémoires et thèses électroniques .Université Laval. Québec, Canada.

L

- Lavigne J P., Sotto A. (2007). Recommandations pour la bonne pratique du prélèvement microbiologique dans les infections cutanées et osseuses : à propos du pied diabétique. *Spectre biologie* ; 159 :29-34.
- Lebeaux D., Ghigo J M. (2012). Infections associées aux biofilms quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale . *Medecine /Science* ; 28 :727-739.
- Lipsky B A. (2004). Medical treatment of diabetic foot infection. *Clin Infect Dis*; 39 : S104-14.
- Lipsky B A., Berendt A R., Deery H G., Embil J M., Joseph W S., Karchmer A W., Lefrock J L *et al.* (2004). Diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Guideline for diabetic foot infections*; 39: 885-910.
- Lokrou A., Angnès Memel T., Koffi Dago P. (2013). Bactériologie du pied diabétique en côte-d'ivoire. *Médecine des maladies Métaboliques* ; 7 : 477-481.
- Lushiku E B (2006). Le pied diabétique. *Rev Med Brux*. 27 : S 315-323.

M

Références bibliographiques

- Macfarlane S et Dillon J F. (2007). Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* ; 102:1187-1196.
- Marchal M. (2010). Etude des biofilms bactériens arsénite-oxydants. Thèse de doctorat En aspects moléculaire et cellulaires de la biologie. Université de Strasbourg, France.
- Martini J., Grumbach M., Hartemann A., Bertoglio J. (2015). Référentiel de bonnes pratiques Pour la prévention et le traitement local des troubles trophiques podologiques chez les patients diabétiques à haut risque podologique, *Médecine des maladies Métaboliques* ; 9 : 1-34.
- Meddour F. (2012). Bioadhésion sur supports inertes : Influence de certains paramètres physico-chimique sur la formation d' *Enterococcus faecalis*. Thèse de doctorat en chimie physique et analytique. Institut des sciences et de technologie, Souk- Ahras.
- Monabeka H G et Nsakala-Kibangou N. (2001). Aspects épidémiologiques et cliniques du pied diabétique au CHU Brazzaville. *Société de pathologie exotique et Lavoisier* ; 3 : 246-248.
- Moty-Monnereau C., Peyre M.H., Gernigon G., Devaud C., Cardoso R., Pages F., Poutignat N., Eklo M. (2007). Séances de prévention des lésions des pieds chez le patient diabétique par le pédicure-podologue. *Haute Autorité de Santé et Service dévaluation des actes professionnels* ; 2-47.
- Muller A et Guaguere E. (2014). L'antibiothérapie n'est pas la seule source d'antibiorésistance : notion biofilm. *La Défence* 1-2.

P

- Parot, S. (2007). Biofilms électroactifs : formation, caractérisation et mécanismes. Thèse de doctorat en génie des procédés et de l'environnement. L'institut national polytechnique de Toulouse, France.
- Pecastaings S. (2010). Apport de modèles de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila* à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d'eaux minérales naturelles. Thèse pour la préparation de doctorat en Ingénieries Microbienne et Enzymatique. Université de Toulouse.
- Percival S.L., Emanuel C., Cutting K.F., Williams D.W.(2012). Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. *International wound journal* 9, 14–32.
- Phillips P L., Wolcott R D., Fletcher J., Schultz G S. (2011). Biofilms made easy. *Wounds international*.1: 1-6.
- Provost A G. (2005). Prévention des lésions ulcères du pied diabétique: utilisation du monofilament en médecine générale. Thèse de doctorat en médecine. Université Pierre et Marie Curie, France.

Q

- Qassimi F. (2015). Le pied diadétique. Thèse de doctorat en médecine. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Maroc.

R

- Romeo T. (2008). Bacterial Biofilms. Springer.
- Roux A. Et Ghigo J-M. (2006). Les biofilms bactériens. Communication, Bull. Acad. Vêt, 261-268.

S

- Sacareau J. (2012). Hypoglycémies iatrogènes sévères chez les patients diabétiques de type 2 : fréquence de survenue, circonstances et coût médico-économiques. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Faculté de Pharmacie de Grenoble, France.
- Saint-Cyr D. (2011). Les biofilms que sont-ils? Ou sont-ils? Quels impacts ont – ils sur les soins des plaies ? ; Perspective infirmière ; 36-38.
- Seghrouchni K. (2011). Pied diabétique. HUG ; 1-34
- Shunmugaperumal T. (2010). Biofilms eradication and prevention. John Wiley And Sons.
- Singh P K., Parsek M R., Greenberg E P., Welsh M J. (2002). A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. Nature., 417: 552-555.

T

- Tagougui S. (2015). Impact du diabète de type 1 et des niveaux élevés d'hémoglobine glyquée sur l'oxygénation musculaire et cérébrale a l'exercice- repercussions sur l'aptitude physique aerobie. Thèse de doctorat en physiologie Université Droit et Santé Lille2. France.

Références bibliographiques

- Thibaut S. (2014). Structuration morphologique et microbiologique des biofilms multiespèces: de l'adhésion au biofilm mature. Thèse de doctorat en génie des procédés. Université de Montpellier 2, France.
- Tolker- Nielsen T., Molin S. (2000). Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microb Ecol.*, 40: 75-84.
- Toumi A., Bernard L., Chakroun M. (2011). Antibiothérapie des infections du pied diabétique . *Revue Tunisienne d'infectiologie* ; 5 : 61-67.

V

- Van Damme H., Limet R. (2005). Le pied diabétique. *Rev Med Liege* ;60 :5-6 : 516-525.
- Vexiau P., Acker D. (2008). Diabète et cicatrisation.1-40.

Z

- Zhao G., Usui M L., Lippman S I., James G A., Stewart P S., Fleckman P., Olerud J E. (2013). Biofilms and inflammation in chronic wounds. *Advances in wound care*; 2: 389-399.

Annexe 1. Les plaies des pieds chez les patients diabétiques

Annexe 1.1. Patient 4



Annexe 1.2. Patient 6



Annexe 1.3. Patient 8



**Annexe 2. Résultats d'isolement des souches sur les milieux de culture :
Mac Conkey, Chapman et Gélose au sang cuit**

Annexe 2.1. Culture d'une souche de *Proteus mirabilis*



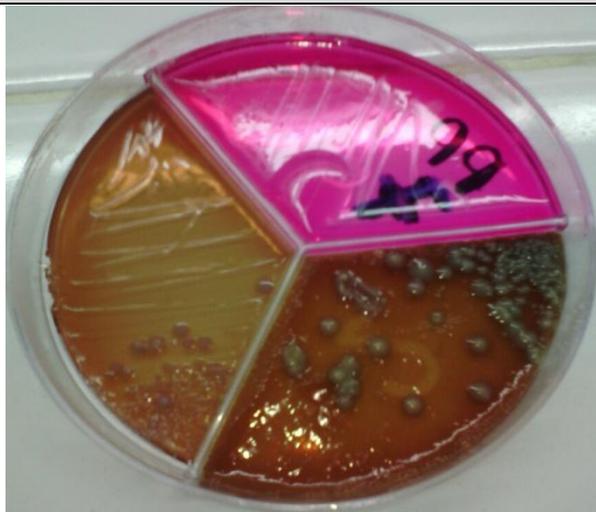
Annexe 2.2. Culture d'une souche de *Proteus vulgaris*



Annexe 2.3. Culture d'une souche d'*Escherichia coli*



Annexe 2.4. Culture d'une souche de *Klebsiella spp.*



Annexe 2.5. Culture d'une souche de *Staphylococcus aureus*

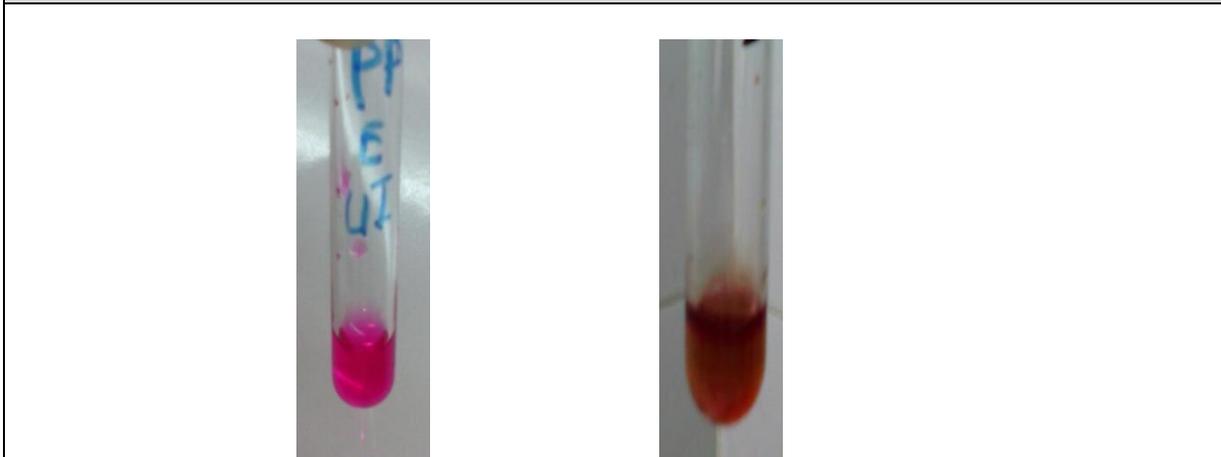


Annexe 3. Résultats d'identification biochimique des souches

Annexe 3.1. Identification d'une souche de *Proteus mirabilis* sur milieu Urée-Indole



Annexe 3.2. Identification d'une souche de *Proteus vulgaris* sur milieu Urée-Indole



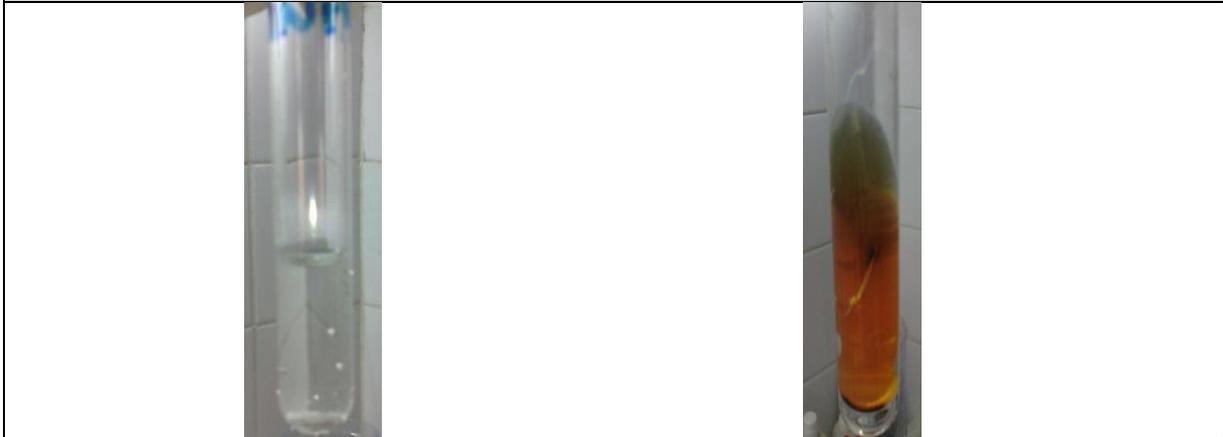
Annexe 3.3. Identification d'une souche d'*Escherichia coli* sur milieu Urée-Indole



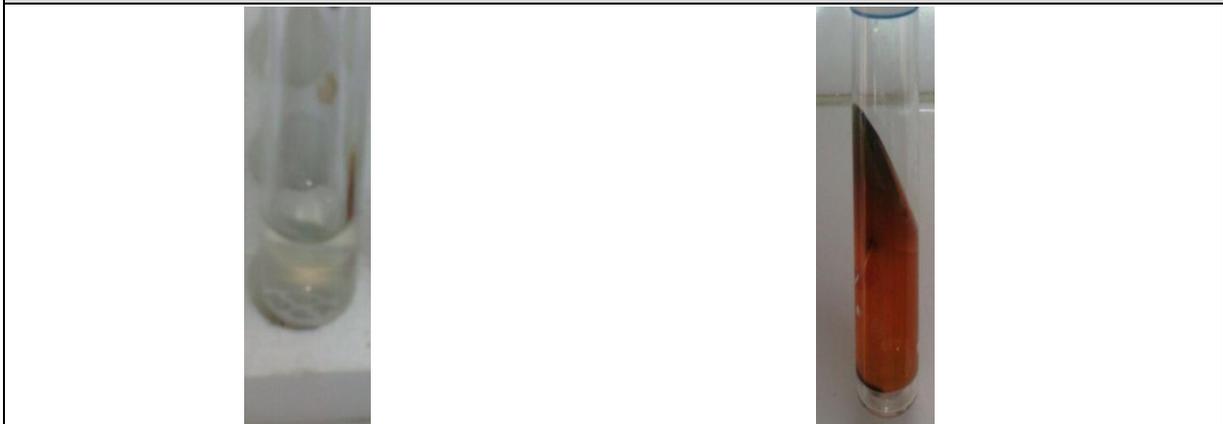
Annexe 3.4. Identification d'une souche de *Klebsiella spp.* sur milieu Urée-Indole



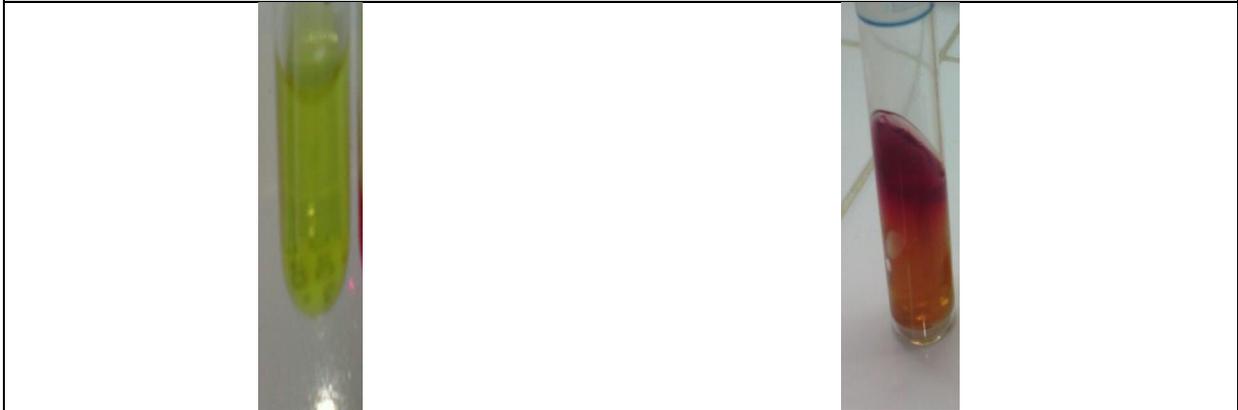
Annexe 3.5 Identification d'une souche de *Proteus mirabilis* sur les milieux ONPG et TSI



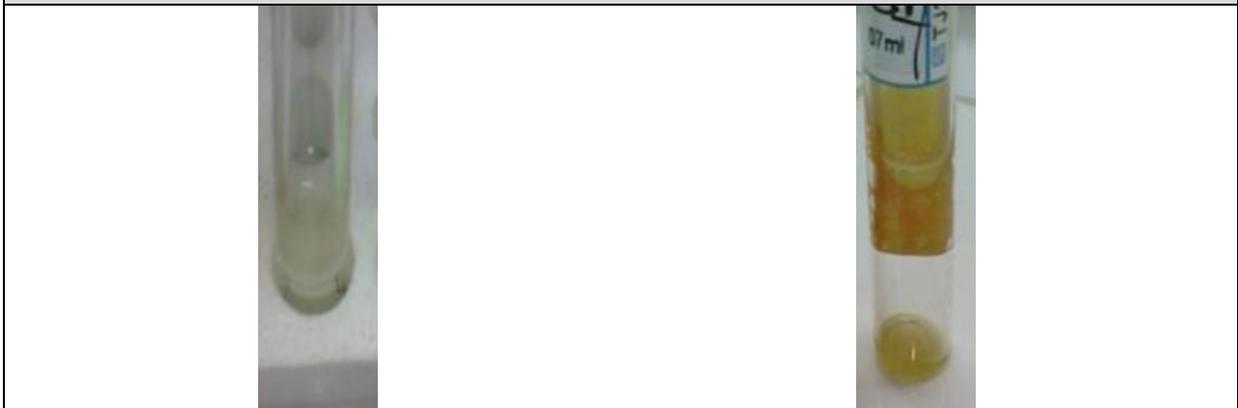
Annexe 3.6 Identification d'une souche de *Proteus vulgaris* sur les milieux ONPG et TSI



Annexe 3.7. Identification d'une souche d'*Escherichia coli* sur les milieux ONPG et TSI

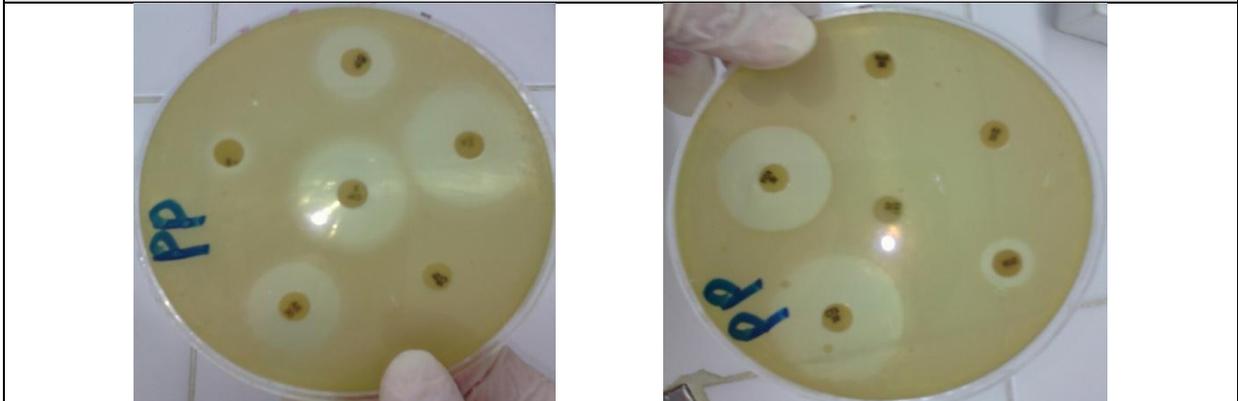


Annexe 3.8. Identification d'une souche de *Klebsiella spp.* sur les milieux ONPG et TSI

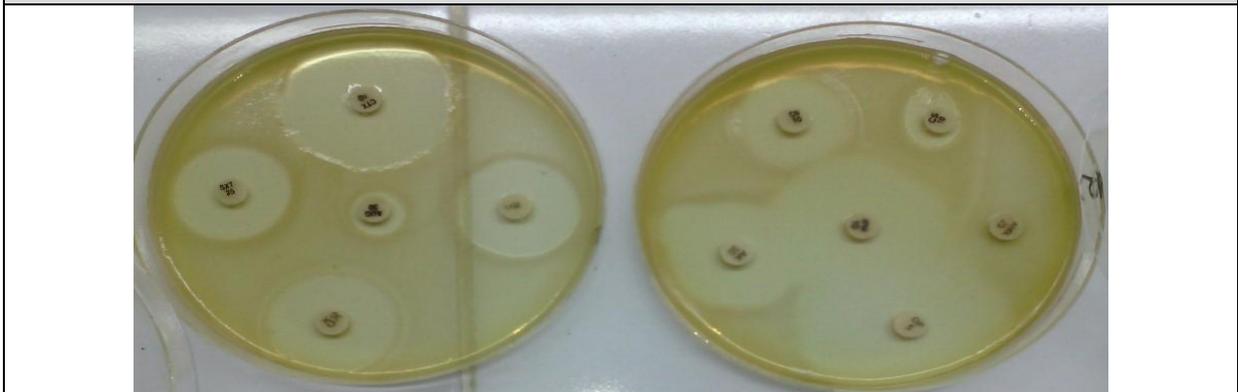


Annexe 4. Résultats de l'antibiogramme

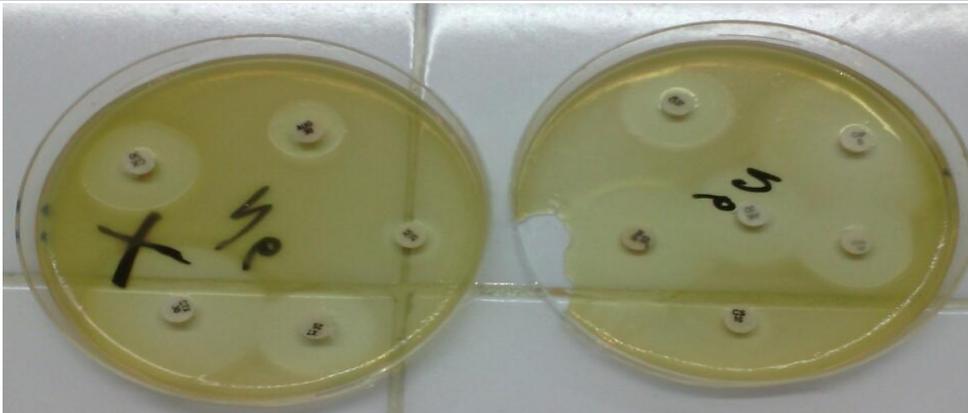
Annexe 4.1 Antibiogramme d'une souche de *Proteus mirabilis*



Annexe 4.2 Antibiogramme d'une souche de *Proteus vulgaris*



Annexe 4.3 Antibiogramme d'une souche d'*Escherichia coli*



Annexe 4.4 Antibiogramme d'une souche de *Klebsiella spp.*



Annexe 4.5 Antibiogramme d'une souche de *Staphylococcus aureus*



Annexe 4.6. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour les entérobactéries

N°	Antibiotiques Testés	Abréviation	Charge du Disque Ug	Diamètres Critiques (mm)		
				R	I	S
1	Amoxilline	AMX	30	≤13	14-17	≥18
2	Augmentin	AMC	30	≤13	14-16	≥17
3	Bactrim	SXT	25	≤10	11-15	≥16
4	Imipenème	IPM	10	≤13	-	≥18
5	Céfotaxine	CTX	30	≤14	15-22	≥23
6	Colistine	CS	10	≤10	-	≥11
7	Chloramphénicol	C	30	≤12	13-15	≥15
8	Gentamicine	GM	10	≤12	13-14	≥15
9	Amikacine	AN	30	≤14	13-16	≥17
10	Céfoxitine	FOX	30	≤14	15-17	≥18
11	Tétracycline	TE	30	≤14	15-18	≥19
12	Ciprofloxacine	CIP	5	≤15	16-20	≥21

Tableau extrait du Document CLSI M100 – S21. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing

Annexe 4.7. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibitions pour les Cocci à Gram positif

N°	Antibiotiques Testés	Abréviation	Charge du Disque Ug	Diamètres Critiques (mm)		
				R	I	S
1	Penicilline G	P	10	≤19	20-27	≥28
2	Oxacilline	OX1	1	≤10	11-12	≥13
3	Céfazoline	CZ	30	≤14	15-17	≥18
4	Erythromycine	E	15	≤15	16-20	≥21
5	Bactrim	SXT	25	≤10	11-15	≥16
6	Imipenème	IPM	10	≤13	-	≥18
7	Pristinamycine	PT	15	≤15	16-18	≥19
8	Rifampicine	RA	5	≤16	17-18	≥19
9	Clindamycine	CD	2	≤15	16-18	≥19
10	Lincomycine	L	15	≤14	15-17	≥18
11	Streptomycine	S	10	≤11	15-17	≥18
12	Optochin	OP	5	≤12	13-15	≥16

Tableau extrait du Document CLSI M100 – S21. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.

Résumé

Les diabétiques sont exposés à développer des plaies du pied potentiellement graves, qui se caractérisent par la multiplicité de souches bactériennes souvent multi-résistantes.

Le but de notre travail est de faire d'une part, une analyse cyto bactériologique des plaies du pied chez des patients diabétiques afin d'identifier les bactéries associées aux biofilms et d'autres part de déterminer leurs profils d'antibiorésistance. L'identification bactérienne a été faite selon les méthodes conventionnelles et l'étude de la résistance aux antibiotiques (ATB) a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Onze prélèvements de pus ont donné : 7 souches de *Proteus mirabilis* (63,64 %), 1 souche de *Proteus vulgaris* (9,09 %), 1 souche d'*Escherichia coli* (9,09 %), 1 souche de *Klebsiella spp.* (9,09 %) et 1 souche de *Staphylococcus aureus* (9,09 %). Un prélèvement était à flore multi bactérienne (biofilm « bi bactérien ») (10 %). Les infections à une seule souche bactérienne étaient dominées par 9 entérobactéries (biofilm « monobactérien ») (90 %). La prédominance des entérobactéries était chez les diabétiques de type 2 (60 %) ainsi que chez le sexe masculin (60 %).

Par ailleurs, les profils de résistances des souches étaient relevés comme suit : Les entérobactéries ont montré un taux de résistance élevé pour les antibiotiques AMX, AMC, TE et CS. Les souches *P. mirabilis* ont enregistré une résistance totale à l'AMX, AMC, CS, SXT, TE). *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* ont présenté une sensibilité à presque la moitié des ATB testés. *S. aureus* a montré de multiples résistances aux familles d'ATB (bêta-lactamines, sulfamides, synergistine, rifamycines et aminoside).

Ces résultats devraient permettre la maîtrise d'une bonne prescription antibiotique et adaptée, pour limiter le processus inflammatoire et septique afin d'éviter le recours à l'amputation.

Mots-clés : Examen cyto bactériologique, biofilm, plaie, pied diabétique, *P. mirabilis*, résistance aux ATB.

Abstract

Diabetics are exposed to a potentially serious foot sores development, that can be characterised by the multiplicity of bacterial strains, often multidrug-resistant.

The purpose of our research is to do a cytobacteriological analysis of the diabetic's foot sores in order to identify the bacteria associated with biofilms on the one hand, and on the other hand, to determine their antibiotic resistance profiles. The bacterial identification is done according to the conventional methods, and the study of the antibiotic resistance (ATB) is realised by the gel diffusion test.

Eleven pus collections gave : 7 *Proteus mirabilis* strains (63,64%), 1 *Proteus vulgaris* strain (9,09%),

Escherichia coli strain (9,09%), 1 *Klebsiella spp.* strain (9,09%) and 1 *Staphylococcus aureus* strain (9,09%). A collection of a multibacterial flora (biofilm «bi-bacterial») (10%). One bacterial strain infections were dominated by 9 enterobacteria (biofilm «monobacterial») (90%). The predominance of enterobacteria was in type 2 diabetics (60%), also (60%) for males.

Furthermore, strains profiles resistances were recorded as it follows : the enterobacteria showed a high level of resistance for the antibiotics AMX, AMC, TE and CS. The *P.mirabilis* strains recorded a complete resistance to the AMX, AMC, CS, SXT, TE. *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* presented sensitivity to almost the half of the tested ATB. *S. aureus* showed multiple resistances to ATB families (beta-lactams, sulfonamids, synergistin, rifamycins et aminoglycosides).

These results may allow the controlling of a good and an appropriate antibiotic prescription, to limit the inflammatory and septic process in order to prevent the amputation.

Key words: cytobacteriological test, biofilm, strain, diabetic foot, *P.mirabilis*, ATB resistance.

الملخص

يتعرض مرضى السكري لتطورات في الجروح على مستوى القدم التي قد تكون خطيرة و تتميز بتنوع السلالات البكتيرية ذات مقاومة متعددة في كثير من الاحيان .

الهدف من عملنا من جهة هو تقديم تحليل خلوي بكتيري لجروح قدم مرضى السكري من اجل تحديد البكتيريا المرتبطة بالأغشية الحيوية و من جهة أخرى تحديد مقاومة المضادات الحيوية الخاصة بهم ، لقد تم تحديد البكتيريا باستخدام الأساليب المناسبة ودراسة المقاومة للمضادات الحيوية تم القيام بها بطريقة النشر في وسط اجار .

إحدى عشر عينة من قيح الجروح أعطت 7 سلالات بروتيتوس ميغابيليس (63,64%) بالمئة، و سلالة واحدة من بروتيتوس فولغاغيس (9,09%) بالمئة و ايضا من اشيريشيا كولي (9,09%) بالمئة ،كلاسيلا اس بي بي. (9,09%) بالمئة وستافيلوكوكيوس اوغيوس (9,09%) بالمئة. عينة كانت متنوعة البكتيريا (اغشية حيوية«ثنائية البكتيريا») (10%) بالمئة. الالتهابات الناتجة من سلالة واحدة كانت سائدة عند 9 انتروبكتيريا (اغشية حيوية«احادية البكتيريا»)(90%) بالمئة، سيادة الانتروبكتيريا كانت لدى مرضى السكري نوع 2 (60%) بالمئة و ايضا عند الجنس الذكري (60%) بالمئة.

نتائج مقاومة السلالات للمضادات الحيوية كالتالي:الانتروبكتيريا المعزولة من الجروح تمثل نسبة عالية للمضادات الحيوية

.CS وTE،AMC،AMX

السلالة بروتيتوس ميغابيليس اعطت مقاومة كلية ل : TE, SXT, CS, AMC, AMX

بينت السلالات بروتيتوس فولغاغيس،اشيريشيا كولي،كلاسيلا اس بي بي. مدى حساسيتهم لنصف المضادات الحيوية المستعملة،واظهرت ستافيلوكوكيوس اوغيوس مقاومة متعددة لعائلات المضادات الحيوية(بيتا لاكتامين ، سولفاميد ، سينانجستين ، غيفامسين و امينوزيد).

تسمح هذه النتائج من الوصف الجيد للمضادات الحيوية الملائمة و استعمالها للحد من الالتهابات و لتجنب البثر .

الكلمات المفتاحية : التحليل الخلوي البكتيري،الغشاء الحيوي، الجرح، القدم السكري،بروتيتوس ميغابيليس، مقاومة المضادات الحيوية.

**ETUDE DE LA FORMATION DE BIOFILMS ASSOCIÉS AUX PLAIES
CHRONIQUES DU PIED DIABÉTIQUE**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie Générale
et Biologie Moléculaire des Microorganismes

Les diabétiques sont exposés à développer des plaies du pied potentiellement graves, qui se caractérisent par la multiplicité de souches bactériennes souvent multi-résistantes.

Le but de notre travail est de faire d'une part, une analyse cyto bactériologique des plaies du pied chez des patients diabétiques afin d'identifier les bactéries associées aux biofilms et d'autre part de déterminer leurs profils d'antibiorésistance. L'identification bactérienne a été faite selon les méthodes conventionnelles et l'étude de la résistance aux antibiotiques (ATB) a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Onze prélèvements de pus ont donné : 7 souches de *Proteus mirabilis* (63,64 %), 1 souche de *Proteus vulgaris* (9,09 %), 1 souche d'*Escherichia coli* (9,09 %), 1 souche de *Klebsiella spp.* (9,09 %) et 1 souche de *Staphylococcus aureus* (9,09 %). Un prélèvement était à flore multi bactérienne (biofilm « bi bactérien ») (10 %). Les infections à une seule souche bactérienne étaient dominées par 9 entérobactéries (biofilm « monobactérien ») (90 %). La prédominance des entérobactéries était chez les diabétiques de type 2 (60 %) ainsi que chez le sexe masculin (60 %).

Par ailleurs, les profils de résistances des souches étaient relevés comme suit : Les entérobactéries ont montré un taux de résistance élevé pour les antibiotiques AMX, AMC, TE et CS. Les souches *P. mirabilis* ont enregistré une résistance totale à l'AMX, AMC, CS, SXT, TE). *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* ont présenté une sensibilité à presque la moitié des ATB testés. *S. aureus* a montré de multiples résistances aux familles d'ATB (bêta-lactamines, sulfamides, synergistine, rifamycines et aminoside).

Ces résultats devraient permettre la maîtrise d'une bonne prescription antibiotique et adaptée, pour limiter le processus inflammatoire et septique afin d'éviter le recours à l'amputation.

Mots clés : Examen cyto bactériologique, biofilm, plaie, pied diabétique, *P. mirabilis*, résistance aux ATB.

Laboratoire de recherche : Laboratoire d'analyses médicales Lina (Casbah) à Constantine

Jury d'évaluation :

Président du jury : ABDELAZIZ Ouided (Maître Assistane « A » - UFM Constantine),
Rapporteur : BOUCHLOUKH Warda (Maître Assistane « A » - UFM Constantine),
Examineur : BELMESSIKH Aicha (Maître Assistane « A » - UFM Constantine).

Date de soutenance : 23/06/2016