

DÉDICACE

Je dédie ce travail

*A ma chère mère Djaouida; symbole de sacrifice ; tendresse
et d'affection.*

*Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me
portez depuis mon enfance
et j'espère que votre bénédiction m'accompagnera toujours, que
dieu vous protège.*

*A mes chers beaux-parents Achour et Houraya
Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous
m'avez porté.*

*A mon cher fiancé Amine
Je vous remercie pour votre encouragement, soutien et
amour que vous m'avez porté.*

A ma chère binôme Khodja Zakia.

*A mes chères sœurs : Maïssa, Batoul, Wiam et Warda et
chers frères : Walid, Hamza, Fical et Yacine pour
leurs encouragements et tous les moments inoubliables
que nous avons partagé ensemble.*

*A tous les membres de ma famille. A tous mes amis et mes
collègues, ils trouveront ici le témoignage d'une fidélité
et d'une amitié infinie.*

A la mémoire des gens qui nous ont quittés.

Meriem

DÉDICACE

*Je dédie ce modeste travail avec une grande joie à toutes
chères personnes de ma vie*

*Ma mère et mon père pour leur tendresse leur amour leur
sacrifice et leur soutien.*

A mes frères : Zakaria, Ahmed, Fouad.

A ma sœur : Nihel.

A ma copine et ma sœur : Boukhlifa maria.

A mon binômmedjazí Meriem.

A toute la promotion Master 2 Microbiologie

*A tout personne qui a participé de près ou de loin dans la
réalisation de ce travail.*

*A tous les membres de ma famille. A tous mes amis et mes
collègues, ils trouveront ici le témoignage d'une fidélité
et d'une amitié infinie.*

A la mémoire des gens qui nous ont quittés.

Zakia

Résumé

La présente étude est réalisée sur 63 patients admis pour infection du pied diabétique et qui provient de différents établissements sur Blida, Alger et Boufarik. Des prélèvements profonds de pus par écouvillonnage sont effectués pour la mise en culture des germes responsables de l'infection du pied diabétique.

Les résultats ont montré la prédominance des bacilles à Gram négatif avec une prévalence de 77%. Un taux de 54% est d'une culture monomicrobienne. Sur 69 germes isolés, correspondant à 23 espèces différentes. La répartition par espèce a montré la prédominance du *Staphylococcus aureus* avec 21,73 % des isolats. L'antibiogramme a permis d'identifier 9 bactéries multirésistantes (BMR) avec une prévalence de 13,04%, dont 45% sont des entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération et 33,3% sont des *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SRM) par rapport au nombre total des BMR.

L'effet antibactérien de la molécule biologique de chitosane a montré son efficacité sur l'ensemble des bactéries multirésistantes testées notamment sur les *Staphylococcus aureus* (13-40mm), *Proteus mirabilis* (20-33mm), *Proteus penneri* (17-27mm), et *Acinetobacter baumannii* (12-15mm). Ces investigations requerront une étude formellement prévue avec un plus long suivi dans des sujets diabétiques.

Mots Clés : Pied diabétique, infection, bactéries multirésistantes, antibiotiques, chitosane, effet antibactérien.

Abstract

The present study is carried out on 63 patients admitted for diabetic foot infection and who comes from different institutions in Blida, Algiers, Kolea and Boufarik. Deep samples of pus by swabbing are made for culturing the germs responsible for the infection of the diabetic foot.

The results showed the predominance of Gram-negative bacilli with a prevalence of 77%. A rate of 54% is of a monomicrobial culture. On 69 isolated germs, corresponding to 23 different species. The distribution by species showed the predominance of *Staphylococcus aureus* with 21.73% of the isolates. The antibiogram identified 9 multidrug-resistant bacteria (MDR) with a prevalence of (13.04%), of which 45% are enteric bacteria resistant to third-generation cephalosporins and (33.3%) are resistant *Staphylococcus aureus*. methicillin (MRSA) compared to the total number of BMRs.

The antibacterial effect of the biological molecule of chitosan showed its effectiveness on all the multiresistant bacteria tested especially on *Staphylococcus aureus* (13-40mm), *Proteus mirabilis* (20-33mm), *Proteus penneri*(17-27mm), and *Acenitobacterbaumanii* (12-15mm). These investigations will require a formally planned study with longer follow-up in diabetic subjects.

Key words:Diabetic foot, infection, multiresistant bacteria, antibiotics, chitosan, antibacterial effect.

Liste des figures

Figure 1 : Physiopathologie des lésions ulcérées du pied diabétique d'après le Consensus International sur le Pied Diabétique	6
Figure 2 : Structure de la chitine et du chitosane produit par désacétylation	16
Figure 3 : Exemples d'applications du chitosane	19
Figure 4 : fiche d'exploitation pour les patients diabétiques	Anx I
Figure 5 : Présentation de la galerie Api 20 E avant et après l'ajout de l'inoculum.....	Anx I
Figure 6 : Catalogue analytique de la galerie Api 20 E.....	Anx I
Figure 7 : Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie.....	33
Figure 8 : Test du double disque positif.....	34
Figure 9 : (A) Préparation des 03 concentrations du chitosane à 2 volumes (V_1 et V_2), (B) Homogénéisation des concentrations du chitosane par l'agitateur	35
Figure 10 : Répartition des prélèvements positifs et négatifs	36
Figure 11 : Répartition des cultures en mono et polymicrobienne	37
Figure 12 : Répartition des résultats selon les groupes de germes identifiés.....	37
Figure 13 : Répartition des résultats selon les germes identifiés	38
Figure 14 : Répartition globale des différentes espèces isolées	39
Figure 15 : Pourcentage de résistance des <i>Staphylococcus aureus</i> aux antibiotiques	40
Figure 16 : Pourcentage de résistance d' <i>entérobactéries</i> aux antibiotiques.....	41
Figure 17 : Pourcentage de résistance des <i>E. Coli</i> aux antibiotiques.....	41
Figure 18 : Pourcentage de résistance des <i>Proteus mirabilis</i> aux antibiotiques.....	42
Figure 19 : Pourcentage de résistance des <i>Proteus penneri</i> aux antibiotiques	43
Figure 20 : Pourcentage de résistance des <i>Proteus vulgaris</i> aux antibiotiques.....	43
Figure 21 : Pourcentage des bactéries multirésistantes.....	46

Figure 22 : Répartition des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> selon la résistance à laméthycilline (MRSA).....	46
Figure 23 : Répartition des patients selon la tranche d'âge	47
Figure 24 : Répartition des patients selon le sexe.....	47
Figure 25: Répartition des patients selon les tranches d'âge et le sexe.....	48
Figure 26 : Répartition des patients en fonction du type du diabète.....	48
Figure 27 : Répartition des patients selon la présence d'amputation pour des lésions du pied diabétique	49
Figure 28 : Répartition des souches testées dans le volume 20 ml en fonction des concentrations et des diamètres de zone d'inhibition).....	52
Figure 29 : Répartition des souches testées dans le volume 100 ml en fonction des concentrations et des diamètres de zone d'inhibition.).....	52
Figure 30 : Zones d'inhibition de la souche de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC isolée du pied diabétique testée avec les concentrations C1, C2, C3 dans les volumes V1 et V2 par la méthode des disques).....	53
Figure 31 : Zones d'inhibition de la souche de <i>Proteus mirabilis</i> ATCC isolée du pied diabétique testé avec les concentrations C1, C2, C3 dans les volumes V1 et V2 par la méthode des disques).....	54
Figure 32 : les zones d'inhibition de la souche de <i>E. coli</i> ATCC isolé du pied diabétique testé avec les concentrations C1, C2, C3 dans les volumes V1 et V2 par la méthode des disques).....	54
Figure 33 : les zones d'inhibition de la souche de <i>Pseudomonas</i> ATCC isolé du pied diabétique testé avec les concentrations C1, C2, C3 dans les volumes V1 et V2 par la méthode des disques).....	55
Figure 34: Zones d'inhibition de la souche de <i>Proteus penneri</i> isolée du pied diabétique testée avec les concentrations C1, C2, C3 dans les volumes V1 et V2 par la méthode des disques).....	55

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification étiologique du diabète sucré.....	Anx I
Tableau 2 : Classification de l'infection des plaies du pied selon le Consensus International sur le pied diabétique (Source : recommandations pour la pratique clinique. Prise en charge du pied diabétique infecté).	Anx I
Tableau 3 . Corrélation clinico- biologique entre les types de plaies et les germes impliqués et identifiés.....	11
Tableau 4 : Les principales familles d'antibiotiques et leur spectre d'activité.....	Anx I
Tableau 5 : Les principaux antibiotiques classés selon leur site d'action.....	Anx I
Tableau 6 : Les matériels non biologique	Anx II
Tableau 7 : Echantillonnage de pus du pied diabétique dans les hôpitaux et l'unités de soins.....	20
Tableau 8 : Tableau de lecture d'Api 20 ^E	Anx II
Tableau 9 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour <i>Entérobactéries</i>	Anx II
Tableau 10 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour <i>pseudomonas aeruginosa</i>	Anx II
Tableau 11 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour <i>Acinetobacter ssp.</i>	Anx II
Tableau 12 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour <i>staphylococcus aureus</i>	Anx II
Tableau 13 : Recherche de la résistance à l'oxacilline et interprétation des résultats (Méthode de diffusion de disque)	31
Tableau 14 : Technique du screening test et interprétation des résultats.....	32
Tableau 15 : Pourcentage de résistance du reste d'espèces des entérobactéries aux antibiotiques.....	44
Tableau 16 : Pourcentage de résistance d' <i>Acinetobacter baumannii</i> aux antibiotiques....	45
Tableau 17 : Pourcentage de résistance d' <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux antibiotiques...45	

Tableau 18 : Effet antibactérien du Chitosane sur les différentes souches multirésistantes isolées du pied diabétique par la méthode de diffusion par disque sur gélose..... 50

Liste des abréviations

ADH : Arginine dihydrolase.

ATB : Antibiotique.

BGN : Bacilles à Gram Négatif.

BGT : Bouillon glucose tamponné.

BHIB : Bouillon cœur cerveau.

BLSE : Bactéries productrice de β -lactamine a spectre élargi.

BMR : Bactéries multirésistantes.

CGP : Cocci à Gram Positif.

CLSI :Clinical Laboratory Standards Institute

DID : Diabète insulino-dépendant.

DNID : Diabète non-insulino-dépendant.

EBLSE : Entérobactéries productrice de β -lactamine a spectre élargi.

FID : Fédération International du Diabète.

GN : Gélose nutritive.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

H₂S: Hydrogène sulfuré.

IF: Infection.

IWGDF: International Working Group on the Diabetic Foot.

LDC : Lysine décarboxylase.

MD : Malade diabétique.

MH : Muller Hinton.

MRSA :Methicillin-Résistant *staphylococcus aureus*.

MSSA : Methicillin-Sensible*staphylococcus aureus*

ODC : Ornithine décarboxylase.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

RAISIN : Réseau d'alerte d'investigation de surveillance des infections nosocomiales.

SARM : *Staphylococcus aureus* résistante a la méticilline.

TSI : Triple Sugar Iron.

UPD : Ulcère pied diabétique.

ملخص

لقد أجريت هذه الدراسة على 63 مريض مصاب بعدو القدم السكر حيث حصلنا على العينات من مريضاتنا كملنا القليعة بفرار يكال جزائر البلدية وذلك عن طريق مسحات التقنيات الجرثومية. جعلنا العدو بأولاً ثم زر عهفياً وساطالزرع أظهرت النتائج غلبة العصيات سلبية الغرام بنسبة 77 بالمائة بنسبة 54 بالمائة من الزرعة كانت تحتوى على عواحد من البكتيريا وذلك على 69 بكتيريا معزولة التي تنتمي إلى 23 نوع مختلف.

أظهر التوزيع حسب الأنواع هيمنة البكتيريا العنقودية الذهبية بنسبة 21.73 بالمائة من الأنواع المعزولة. سمح المضاد الحيوي بالغراملت يعرف 9 بكتيريا من نوع عكثيريا متعددة المقاومة للمضاد الحيوي بنسبة 13.04 بالمائة التي تتضمن 45 بالمائة من البكتيريا المعوية المقاومة للسيفالوسبورينات الجيل 3 و 33.3 بالمائة من البكتيريا العنقودية الذهبية المقاومة للميتيسيلين.

توصلنا إلى الشيتوزان والتي تمثل مادة فعالة علم مجموعة البكتيريا المقاومة المذكورة سابقاً بما فيها البكتيريا العنقودية الذهبية (40-13 مم) بروتيوسميغابيليس (20-33 مم) بروتيوسيينوري (17-27 مم) واسينتوبكتاريوماتي (12-15 مم) هذه البحوث تستوجب دراسة أعمق عن مدى أطول بالنسبة لمرضى السكر.

كلمات البحث

القدم السكرية - العدوى - بكتيريا متعددة المقاومة للمضاد الحيوي - الشيتوزان - تأثير مضاد للجراثيم.

Le diabète est parmi les maladies chroniques avec une incidence et une prévalence très élevée (**Farhani et al., 2015**), ces complications constituent un problème de santé majeur dû à un trouble de l'assimilation, de régulation et du stockage des sucres apportés par l'alimentation. (**Ducloux et Altman, 2014**).

À l'échelle mondiale, le nombre d'adultes dans le monde atteints de diabète est de 425 millions en 2017, selon les chiffres publiés par la Fédération internationale du diabète (FID), à l'occasion de la Journée mondiale du diabète. Leur nombre pourrait atteindre 629 millions en 2045 (**FID, 2017**). En 2012, le diabète a causé 1,5 million de décès (**OMS, 2016**).

À l'échelle nationale, cette maladie constitue un problème de santé publique par son double fardeau épidémiologique et économique. En effet, Environ 1,8 million de personnes sont atteintes de diabète en Algérie, avec une prévalence nationale du diabète établie à 6,9%, selon les données du nouveau rapport 2017 de la Fédération internationale du diabète (**FID, 2017**). En effet, une étude statistique a montré en 2015 qu'une personne meurt du diabète toutes les 8 secondes dans le monde (**FID, 2015**).

La présente étude porte sur l'étude des infections du pied diabétique qui est l'une des complications les plus graves et les plus coûteuses du diabète sucré, en effet 50% à 70% des amputations non traumatiques des membres inférieurs sont réalisées chez les patients diabétiques et que près de 70% de ces sujets décèdent dans les cinq ans qui suivent l'amputation (**IWGDF, 2016**). L'amputation de tout ou partie d'un membre inférieur est généralement précédée par un ulcère du pied selon le Consensus International du Pied Diabétique (**CIPD, 2007**). Cet ulcère sert de porte d'entrée de la majorité des infections du pied qui se déclarent chez des patients diabétiques (**Schaper, 2004 ; Lavery et al., 2006 ; Lipsky et al., 2012**).

Selon multiples études réalisées sur les infections du pied diabétique, une variété bactérienne très importante comprenant des Cocci à Gram positif (CGP), en particulier *Staphylococcus aureus*, et des bacilles à Gram négatif qui correspondent aux germes majoritairement isolés qui colonisent les plaies du pied diabétique (**Vexiau et al., 2008 ; Aragon-Sanchez et al., 2009 ; Toumi et al., 2011**).

Quels que soient les progrès faits dans une telle démarche, le traitement des lésions du pied chez le patient diabétique est toujours difficile, plein d'obstacles, d'échecs et parfois de récurrences (**Hartemann-Heurtier et al., 2000 ; Edmonds et Poster, 2004 ; Lipsky, 2005 ;**

Bernard et Stahl, 2007). Cependant, cet échec est dû par l'utilisation croissante et parfois injustifiée des antibiotiques, les bactéries ont appris à se défendre et à s'adapter et certaines sont devenues résistantes aux antibiotiques (**Grace Yim, 2011 ; Ibo Issa Maman, 2013**). Cette situation apparaît particulièrement préoccupante en milieu hospitalier. La pression de sélection exercée par l'utilisation importante de l'antibiothérapie et la diffusion épidémique des bactéries multirésistantes (BMR) sont les deux facteurs principaux conditionnant cette évolution et sont devenues probablement les plus inquiétants de ces dernières années (**Soussy, 2007 ; Inserm, 2015**).

Ces bactéries multirésistantes représentent l'objet de la présente étude dont l'objectif est de les isoler à partir des pieds de plusieurs patients, notant que *Staphylococcus aureus* sont des BMR polyvalentes aptes à développer une résistance à la méthicilline d'où le nom de SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline), notant aussi les BLSE qui constituent un groupe d'enzymes qui ont la propriété commune de conférer la résistance par les inhibiteurs des β -lactamases (**Bush et al., 1995**) impliquées dans plusieurs types d'infections notamment, les infections nosocomiales (**Rehyer et al., 2011 ; Otto, 2013**). Ce phénomène survient dans tous les pays du monde, avec des disparités selon les régions (**Institut national de la santé et de la recherche médicale, 2015**).

Pour ces raisons, les gens retournent de nouveau vers la médecine traditionnelle, dite conventionnelle, particulièrement vers la thérapie par les plantes dite phytothérapie antidiabétiques et aussi l'utilisation de produits biologiques actifs (collagène, facteurs de croissance, tissus obtenus par bio-ingénierie tissulaire, etc.) dans les ulcères, ou des biopolymères à effet antibactérien.

Notre travail a pour objectif d'étudier l'effet du chitosane qui est un oligomère extrait par la désacétylation de la chitine présente dans la carapace des arthropodes, visant d'évaluer leur activité antimicrobienne envers les bactéries multirésistantes isolées (BMR) du pied diabétique.

Nous avons organisé notre travail comme suit :

Le premier chapitre a un aperçu général sur le diabète et le pied diabétique.

Le second chapitre, regroupe le matériel utilisé et les méthodes opératoires pour l'étude des bactéries multirésistantes et l'efficacité du chitosane vis-à-vis de ces derniers.

Le dernier chapitre, présente les résultats obtenus et leur discussion.

1. Généralités sur le diabète

1.1. Définition

Selon l'organisation mondiale de la santé le terme diabète est défini comme étant une maladie chronique qui survient lorsque le pancréas ne produit pas assez d'insuline ou lorsque l'organisme n'est pas capable d'utiliser efficacement l'insuline qu'il produit. Il en résulte une concentration accrue de glucose dans le sang (hyperglycémie). (OMS, 1999).

Le diagnostic de diabète peut être établi de trois façons différentes (Drouin et al., 1999 ; OMS, 1999) :

- ✓ Glycémie à jeun supérieure ou égale à 1,26g/L (7 mmol/L),
- ✓ Symptômes cliniques du diabète (polyurie, polydipsie, amaigrissement inexplicable, somnolence voire coma) et glycémie supérieure à 2 g/l quelle que soit l'heure de la journée.
- ✓ Glycémie supérieure à 2g/l, 2 heures après une charge orale de 75g de glucose. Le seuil de glycémie a été fixé en fonction du risque de survenue de complications, en particulier de rétinopathie.

1.2. Epidémiologie

1.2.1. Données mondiale

Le diabète est un problème de santé publique ; c'est une maladie chronique avec une incidence et une prévalence très élevée (Farhani et al., 2015). Selon l'OMS, environ 30 millions d'adultes étaient diabétiques dans le monde en 1985; ce nombre est passé à 173 millions en 2002 est atteint 425 millions en 2017. Selon les chiffres publiés par la Fédération internationale du diabète (FID), et les projections prévoient qu'en 2045, 629 millions d'individus seront atteints de diabète (FID, 2017). En 2012, le diabète a causé 1,5 million de décès (OMS, 2016).

1.2.2. Données nationale

Le diabète en Algérie reste une réalité préoccupante puisqu'il s'agit de la deuxième maladie chronique après l'hypertension. Le nombre des diabétiques est atteint environ 1,8 million de personnes avec une prévalence nationale du diabète établie à 6,9%, selon les données du nouveau rapport 2017 de la Fédération internationale du diabète (FID, 2017).

L'Algérie est en pleine transition épidémiologique et le diabète pose un vrai problème de santé publique par le biais des complications chroniques dominées par les complications cardio-vasculaires, le pied diabétique, l'insuffisance rénale chronique et la rétinopathie (Belhadj et al.,2005).

Ces complications constituent des facteurs de risque pour développer des troubles trophiques du pied tels que les maux perforants plantaires et ulcères du pied pouvant mener à l'amputation. La Fédération Internationale des Diabètes (FID) estime que 85 % de ces amputations sont précédées d'un ulcère du pied et que le taux d'amputation est 10 à 20 fois plus élevé chez le diabétique par rapport au non diabétique (FID, 2005 ; OMS, 2005).

Passant de 11% en 2015 à 12% en 2016, ce nombre est en nette croissance, signale le président de la Fédération algérienne des associations des diabétiques. En chiffres, ils sont environ 4,5 millions de citoyens atteints par cette pathologie (FID, 2014).

1.3. Classification du diabète

La diabétologie humaine a scindé le diabète sucré en grands groupes : le diabète insulino-dépendant (DID) et le diabète non-insulino-dépendant (DNID) (Tableau 1, Annexe 1).

1.3.1. Le diabète de Type I

Le diabète de Type I est provoqué par une réaction auto-immune au cours de laquelle le système immunitaire de l'organisme attaque les cellules des îlots du pancréas qui produisent l'insuline. L'organisme devient alors incapable de produire l'insuline dont il a besoin, ou alors en quantité très faible, avec pour conséquence une déficience relative ou absolue en insuline. Les causes de ce processus destructeur ne sont pas totalement comprises, mais une susceptibilité génétique combinée à des facteurs déclencheurs environnementaux, tels qu'une infection virale, des toxines ou certains facteurs alimentaires, est impliquée. La maladie peut se développer à tout âge, mais le Type I apparaît le plus souvent à l'enfance ou à l'adolescence. Les personnes atteintes de cette forme de diabète ont besoin d'insuline chaque jour pour maintenir leur glycémie sous contrôle et ne peuvent survivre sans (Eisenbarth, 1986 ; Monnier et Colette, 2014 ; IDF, 2016).

1.3.2. Le diabète de Type II

Le diabète de Type II est la forme la plus courante de la maladie et représente environ 90 % de tous les cas(**Papoz et Eschwège,1990**). Dans cette forme de diabète, l'hyperglycémie est le résultat d'une production inadéquate d'insuline et de l'incapacité de l'organisme à répondre pleinement à l'insuline, un état qualifié de résistance à l'insuline. L'insuline s'avère alors inefficace, ce qui déclenche dans un premier temps une hausse de la production de l'insuline pour réduire l'augmentation du taux de glycémie. Au fil du temps, une production inadéquate relative d'insuline peut toutefois se développer. Le diabète de Type II touche généralement des adultes plus âgés, mais est de plus en plus souvent observé chez des enfants, des adolescents et des adultes plus jeunes en raison de l'augmentation des taux d'obésité, de l'inactivité physique et de la mauvaise alimentation(**DeFronzo, 1997 ; Davis et al., 2010 ; Monnier et Colette, 2014 ;Sahah et al.,2015**).

La prévalence du diabète de Type II est élevée et sa hausse n'épargne aucune région du monde. Cette augmentation est vraisemblablement attisée par le vieillissement de la population, le développement économique et l'urbanisation croissante, qui se traduisent par des vies plus sédentaires et une hausse de la consommation d'aliments non sains liés à l'obésité (**Saito et al.,2011**).

2.Pied diabétique

L'hyperglycémie chronique du diabète est associée à d'importantes complications (**GoldenbergetPunthakee, 2013**). Ces complications exposent les pieds de la personne atteinte de diabète à de nombreuses anomalies responsables d'une somme de problématiques invalidantes dont celles du syndrome du pied diabétique (**Nagoba et al.,2010 ; Bowering etEmbril, 2013**). Le syndrome du pied diabétique est une complication fréquente du diabète qui touche approximativement 15% à 25% des personnes atteintes (**Botros et al., 2017**).

Les plaies chroniques du pied diabétique résultent fréquemment d'une combinaison de plusieurs facteurs de risque (**Ha Van, 2008**)d'où l'infection, l'ulcération ou destruction des tissus profonds du pied associées à une neuropathie et/ou un artériopathie périphérique des membres inférieurs chez le diabétique.

On regroupe sous le terme « pied diabétique » l'ensemble des manifestations pathologiquesatteignant le pied et directement en rapport avec la maladie diabétique sous-jacente.

Trois mécanismes diversement associés peuvent être impliqués dans l'apparition du pied diabétique : la neuropathie, l'ischémie résultant d'une artériopathie des membres inférieurs, l'infection selon le Consensus international sur le pied diabétique (IWGDF, 2011).

2.1. Physiopathologie

La physiopathologie des lésions ulcérées du pied diabétique est en relation avec plusieurs facteurs de risques engendrés par le diabète, la figure 1 résume les différentes complications.

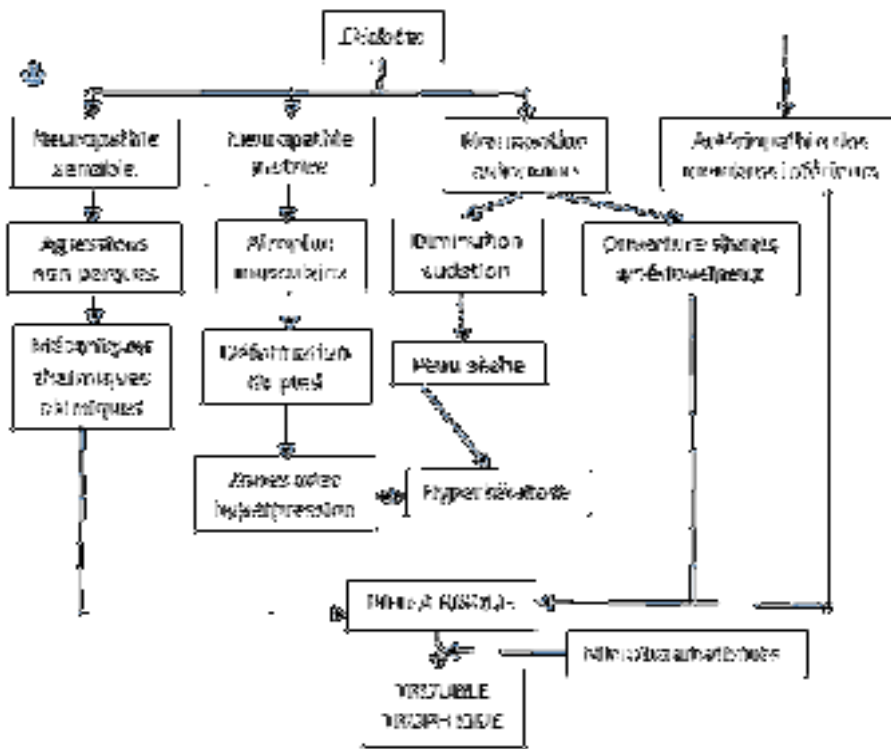


Figure 1 : Physiopathologie des lésions ulcérées du pied diabétique d'après le Consensus International sur le Pied Diabétique (mai 1999).

2.2. Facteurs pathogéniques

Les plaies chroniques du pied diabétique résultent fréquemment d'une combinaison des facteurs internes et externes (Herisson et Simon, 1993 ; Grumbatch et Jean, 2005).

2.2.1. Facteurs pathogéniques internes

2.2.1.1. Neuropathie diabétique

C'est le principal facteur responsable de l'apparition de lésions du pied. Sa prévalence est difficilement estimable : elle a touché entre 20 et 50 % des diabétiques (**Andrew,2005**). La neuropathie est l'atteinte des nerfs liée à une hyperglycémie chronique durant des années. Elle est associée aux pieds de la personne atteinte de diabète se classe en trois types, soit autonome, sensorielle et motrice (**Woo, 2013**). De plus, ces neuropathies peuvent évoluer en artériopathie de Charcot.

a) Neuropathie sensorielle : La neuropathie sensorielle entraîne la perte de sensibilité qui expose le pied à des blessures telles que les brûlures, les engelures et les ulcères du pied diabétique (UPD)(**Steed, 2007 ; Mahoney, 2010; Woo, 2013**). D'ailleurs, la neuropathie sensorielle est présente chez 80% des personnes atteintes d'un UPD (**Mahoney, 2010**).

Elle peut également occasionner des symptômes douloureux, tels que des brûlures, des engourdissements, des sensations de fourmillement, des décharges électriques et la présence de froid douloureux (**Bouhassira et al., 2004 ; Botros et al., 2017**).

b) Neuropathie autonome (végétative) : La neuropathie autonome cause une anomalie de la régulation du système nerveux et est responsable de la défaillance des glandes sébacées et sudoripares (**Mahoney, 2010**).

Ce phénomène occasionne une réduction de la lubrification de la peau contribuant ainsi à une sécheresse excessive (**Mahoney, 2010 ; Woo, 2013**), ce qui expose le pied aux fissures ou aux crevasses pouvant évoluer en ulcère du pied diabétique (UPD) (**Woo, 2013**). La neuropathie autonome provoque également une dysfonction du mécanisme de régulation sanguine sous le pied observée par une dilatation anormale du réseau capillaire qui diminue la pression dans les vaisseaux sanguins et empêche le passage du sang des artères vers les veines ce qui provoque l'ouverture de shunt artérioveineux (**Woo, 2013**). Ces shunts participent aussi à la réduction de l'oxygénation tissulaire et favorisent la résorption osseuse qui peut conduire à l'extrême au pied de Charcot.

c) Neuropathie motrice : La neuropathie motrice représente le troisième et dernier type de neuropathie et résulte de déformations du pied (**Mahoney, 2010 ; Woo, 2013**). L'atrophie des muscles intrinsèques du pied diabétique est responsable d'une perte de résistance musculaire, ainsi que d'une diminution de l'amplitude des

mouvements et de l'équilibre (**Mahoney, 2010 ; Woo, 2013**). La neuropathie motrice s'observe par la contraction des orteils et l'amincissement du coussinet adipeux aux pieds (**Woo, 2013; Botros et al., 2017**). La démarche devient alors limitée et accroît la pression sur la surface plantaire (**Botros et al., 2017**). Les différentes déformations osseuses contribuent aussi à l'ulcération du pied, en raison des sites de pression inhabituels aux pieds, résultant de la présence de proéminences osseuses qui prédisposent à la formation de callosités (**Mahoney, 2010 ; Woo, 2013 ; Botros et al., 2017**).

2.2.1.2. Troubles vasculaires artériels

Outre les différents types de neuropathie, les troubles vasculaires artériels sont également associés au syndrome du pied diabétique. Les problèmes d'ordre vasculaire aux membres inférieurs sont en effet plus agressifs chez les personnes atteintes de diabète. Ce phénomène survient en raison d'une prédisposition précoce aux troubles microvasculaire et macrovasculaire des membres inférieurs, couplée à la neuropathie périphérique (**Norgreen et al., 2007 ; Schaper et al., 2012 ; Botros et al., 2017**) exposent une statistique préoccupante selon laquelle chaque augmentation de la concentration plasmatique en glucose (HbA1c) de 1% prédispose à l'augmentation des troubles vasculaires artériels à 26%. Chez les personnes atteintes de diabète, les troubles vasculaires artériels comprennent la viscosité sanguine et l'angiopathie.

a) Viscosité sanguine : est occasionnée par l'hyperglycémie chronique reliée à une concentration plasmatique élevée en glucose (**Woo, 2013**). La résistance occasionnée par la viscosité sanguine crée une mauvaise circulation sanguine et ne peut assurer l'oxygénation, la nutrition et l'apport en leucocytes à la peau, ce qui altère la défense immunitaire et prédispose le pied des personnes atteintes de diabète à l'infection. À son tour, cette infection peut dégénérer en UPD, ostéite, gangrène ou amputation des membres inférieurs (**Mahoney, 2010; Elmakki et al., 2010 ; Woo, 2013 ; Botros et al., 2017**).

b) Angiopathie : Par ailleurs, selon **Woo (2013)**, les personnes atteintes de diabète sont vulnérables à l'angiopathie. **Morocco et Bush (2010)** mentionnent que la maladie vasculaire artérielle périphérique (MVAP), résultant de l'angiopathie, s'installe de façon accélérée chez la personne atteinte de diabète. La MVAP réduit le débit sanguin et la pression assurant la perfusion distale des membres inférieurs (**Schaper et al., 2012**). Selon **Schaper et al. (2012)**,

l'angiopathie est caractérisée par l'athérosclérose obstructive et la calcification des artères. **Schaper et al. (2012)** ajoutent que la calcification des artères est corrélée avec les neuropathies et atteint 50% des personnes atteintes de diabète. Les mêmes auteurs mentionnent que les personnes souffrant de diabète et touchées par la MVAP sont asymptomatiques et ce phénomène pourrait masquer certaines anomalies.

2.2.1.3. Prédilection aux infections

Outre les différents types de neuropathie et les troubles vasculaires, la prédisposition à l'infection est le troisième élément pouvant contribuer au syndrome du pied diabétique. Le risque à l'infection est plus important chez les personnes atteintes de diabète en raison de la neuropathie et des troubles vasculaires (**Nagoba et al., 2010 ; Botros et al., 2017**). La neuropathie peut d'ailleurs masquer la présence de signes et symptômes d'infection comme l'hyperthermie, l'inflammation ou l'augmentation des globules blancs (**Bakker et al., 2015**). L'infection est souvent commune à l'UPD, puis devient progressivement sévère et difficile à traiter (**Nagoba et al., 2010**).

a) Impacts des complications

Le syndrome du pied diabétique prédispose à différentes complications et les personnes atteintes peuvent souffrir de comorbidités qui affectent leur bien-être et leur autonomie (**Abetz et al., 2002 ; Altenburg et al., 2010**). La personne atteinte d'UPD est exposée à des pertes de mobilité et des restrictions dans les activités de la vie quotidienne, les loisirs et les interactions sociales (**Abetz et al., 2002**). De plus, la crainte reliée à l'amputation potentielle du pied diabétique génère du stress et de l'anxiété (**Price et Krasner, 2012**).

Par ailleurs, des données statistiques permettent de noter que 15% des personnes atteintes de diabète développeront une plaie aux pieds au cours de leur vie et 85% des amputations surviennent en raison d'un ulcère du pied diabétique infecté (**Hopkins et al., 2015**).

L'infection du pied diabétique est définie par une invasion tissulaire avec multiplication des micro-organismes entraînant des dégâts tissulaires avec ou sans réponse inflammatoire de l'organisme. Dans le cadre du pied diabétique, selon Société de Pathologie infectieuse de Langue Française (SPL) l'infection est secondaire à une plaie cutanée (**SPL, 2007**).

La sévérité de l'infection est déterminée d'après la classification du Consensus International sur le pied diabétique. Cette classification se fait à l'aide de 4 grades présentés dans le tableau 2, annexe 1.

b) Les germes en causes

Les principaux germes impliqués dans les infections des plaies du pied diabétique (Tableau 3) :

- **Les bactéries aérobies à Gram positif** : sont les plus fréquentes ; dans ce groupe, *Staphylococcus aureus* est la bactérie le plus souvent mise en évidence, de façon isolée ou au sein d'une population polymicrobienne, lors d'infection qu'elles soient superficielles ou profondes. Les streptocoques β -hémolytique sont également fréquents, le plus souvent dans le cadre d'infections polymicrobiennes (**Game et al., 2004 ; Chidiac et al., 2007 ; Nordman et al., 2014**).

- **Les bacilles aérobies à Gram négatif** : surtout de la famille des entérobactéries (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*) se rencontrent en cas d'infection chroniques ou déjà traitées. *Pseudomonas aeruginosa* est souvent isolé après une longue hospitalisation son rôle pathogène est toujours à discuter.

- **Les bactéries anaérobies strictes** : le plus souvent Cocci à Gram positif mais aussi bacilles à Gram négatif (*Prevotillespp*, *Bacteroidesspp*) sont souvent associés à des germes aérobies. Les bactéries à Gram positifs anaérobies strictes sont en règle présentes dans des plaies peu profondes alors que celle à Gram négatifs anaérobies sont associées à une nécrose ischémique ou à une atteinte profonde.

Tableau 3 : Corrélation clinico- biologique entre les types de plaies et les germes impliqués et identifiés (**Toumi 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 aérobie (<i>S. aureus</i> , streptocoques β -hémolytiques, SCN, entérocoques), corynébactéries, entérobactéries, <i>Pseudomonas spp.</i> , bacilles à Gram négatif non fermentatifs = agents fongiques.
Odeur nauséabonde, nécrose, gangrène				Cocci à Gram positif aérobie, entérobactéries, <i>Pseudomonas spp.</i> , bacilles à Gram négatif non fermentatifs, anaérobies stricts.

2.2.2. Facteurs pathogènes externes

Plusieurs facteurs externes participent au développement des infections tels que :

➤ 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).

➤ 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**).

➤ **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 parachute d'objet sur le pied peuvent également être impliqués dans les facteurs déclenchant (**Lushiku,2006**).

3.Antibiotique et antibiorésistance

3.1.Définition des antibiotiques

Les antibiotiques sont des composés antimicrobiens et sont plutôt des substances naturelles que synthétiques. Ils sont produits par un large éventail de micro-organismes fongiques et bactériens. Beaucoup d'antibiotiques naturels ont été structurellement modifiés en laboratoire, pour augmenter leur efficacité formant ainsi, la classe des antibiotiques semi-synthétiques (**Madigan et Martinko,2007**). Mais toutefois chaque antibiotique a une spécificité d'action (**Figarella et al., 2007**).Les grands groupes d'antibiotiques groupés par famille et spectre d'activité présentés dans le tableau 4, annexe 1 (**Figarella et al., 2007**).

3.2.Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques se différencient des antiseptiques par leur mécanismes d'action, ils agissent à un niveau précis des structures bactériennes, dénommé site d'action. L'action d'un

antibiotique est le résultat des interactions organisme-antibiotique d'une part et antibiotique-bactéries d'autre part(**Gaudy et Buxeraud,2005**).

Les principaux antibiotiques classés selon leur cibles présenté dans le tableau 5, annexe 1(**Figarella et al., 2007**).

3.3. Antibiorésistance

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

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

3.3.1. Différents types de résistance bactérienne

On distingue deux types de résistance selon leur origine. Elle peut être naturelle ou acquise (**Vaubourdolle, 2007**).

a) Résistance naturelle

La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce, elle peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'ATB qu'est une conséquence des différences existantes entre les structures pariétales bactérienne, à une faible affinité de la cible pour l'ATB, ou encore à l'absence de la cible (**Poyart, 2003**).

b) Résistance acquise

Les gènes de résistance peuvent être acquis par transformation de gènes étrangers provenant de chromosomes d'autres espèces ou être portés par des éléments mobiles (transposons, Intégrons) (**Vaubourdolle, 2007**). Certaines bactéries deviennent résistantes aux antibiotiques en acquérant un fragment d'ADN, appelé plasmide, donné par une bactérie résistante. (**Figarella et al., 2007**).L'acquisition de la résistance peut aussi résulter d'une mutation chromosomique pouvant entraîner :

- Une modification de perméabilité à un ou plusieurs antibiotiques ;

- Une modification de la cible pariétale ou intracellulaire (**Vaubourdolle, 2007**).

3.3.2.Mécanisme de la résistance bactérienne aux antibiotiques

Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques (**Madiganet Martinko,2007**).

a) Inactivation enzymatique des antibiotiques

Par ce mécanisme, la bactérie acquiert la capacité d'inactiver l'action des antibiotiques par la sécrétion d'enzyme avant même qu'ils n'aient pénétré au sein du micro-organisme. Les classes d'antibiotiques visées par ces enzymes sont les β -lactamine, les aminosides et les phénicoles(**Bevilacqua, 2011**).

b) Altération (ou modification) de site de liaison

Phénomène engendré par des chromosomes ou des plasmides, ce mécanisme de résistance produit une baisse de l'affinité de l'antibiotique pour son site d'action (**Carle, 2009**).

c) Diminution de la perméabilité

Les porines sont des protéines formant des pores dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif et permettant le passage de certaines molécules hydrophiles. Des mutations peuvent entraîner une perte de certaines porines et de ce fait entraver la pénétration de certains antibiotiques. Ces mutations peuvent entraîner la résistance à plusieurs familles d'antibiotiques simultanément (**Nauciel, 2000**).

d) Excrétion de l'antibiotique par l'efflux

Ils existent chez les bactéries des systèmes permettant d'excréter certains antibiotiques. Ces systèmes jouent un rôle dans la résistance naturelle, sous l'effet de mutation leur niveau d'expression peut augmenter et faire apparaître une résistance acquise pouvant toucher simultanément plusieurs familles d'ATB. Le phénomène a été décrit surtout chez les bactéries à Gram négatif (**Nauciel, 2000**).

3.4. Les bactéries multirésistantes

3.4.1.Définition

Les bactéries sont dites multi résistantes (BMR) aux antibiotiques lorsque, du fait de l'accumulation des résistances naturelles et acquises, selon le réseau d'alerte d'investigation de surveillance des infections nosocomiales elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutiques (résistance à au moins 3 familles d'antibiotiques) (RAISIN, 2009). Certaines résistances sont particulièrement importantes à prendre en compte, car elles concernent des espèces bactériennes qui sont à la fois commensales susceptibles de disséminer dans la population générale et à fort potentiel pathogène. C'est le cas des *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) et des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (EBLSE) (Mehdi, 2008).

3.4.2. Les BMR des hospitaliers

- SARM : *S. aureus* est une des deux principales espèces responsables d'infection nosocomiale. Le développement incontrôlé des épidémies de SARM et les preuves répétées de leur diffusion clonale justifient à eux seuls la mise en place d'un programme de lutte contre les BMR. Les SARM représentent 5 à 10% des bactéries isolées des infections nosocomiales (IN), ils sont résistants à toutes les β -lactamines et très souvent résistants aux aminosides, aux macrolides et aux fluoroquinolones (Vincent, 2000).
- EBLSE : les entérobactéries dans leur ensemble représentent 35 à 40% des bactéries responsables d'IN. Les EBLSE représentent environ 1% des bactéries isolées des IN. La tendance à la diffusion clonale des EBLSE est bien démontrée. Les souches d'EBLSE principalement *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* et à un moindre degré *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter* sont résistants à de nombreuses β -lactamines (sauf imipénème), et souvent céphamycines pour les espèces qui y sont naturellement sensibles, et très souvent résistants aussi aux aminosides et aux fluoroquinolones (Vincent, 2000).
- Entérocoque résistant à la vancomycine (ERV) : représentent environ 1% des souches d'entérocoques isolées à l'hôpital. On retrouve principalement :
 - *Acinetobacter baumannii*: représentent 2 à 4% des bactéries responsables d'IN, jouent un rôle non négligeable dans certains secteurs hospitaliers (soins intensifs) et sont parfois à l'origine de bouffées épidémiques dans lesquelles la contamination de l'environnement des patients porteurs joue un rôle. Certaines souches épidémiques résistantes à l'imipénème conduisent à des impasses thérapeutiques (Vincent, 2000).

- *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant : les souches de *P. aeruginosa* résistantes aux β -lactamines (ticarcilline, ceftazidime ou imipénème) ont tendance à être résistantes aussi aux aminosides et aux fluoroquinolones. Dans les hôpitaux concernés, ces souches doivent faire l'objet d'une stratégie spécifique, notamment d'une politique de prescription des antibiotiques, et des mesures de contrôle de l'environnement (Vincent, 2000).

4. Chitosane et propriétés générales

4.1. Définition et structure

Le Chitosane est un polymère modifié et non-toxique d'hydrate de carbone dérivé de la chitine par la désacétylation enzymatique ou chimique (Dodane et al., 1998 ; Bhatnagar et al., 2009 ; Kong et al., 2010). Il est constitué par β - (1,4) des unités de glucosamine comme son composant principal (> 80%) et glucosamine de N-acétyle (< 20%) distribuée aléatoirement le long de la chaîne (No et al, 2003 ; Perelshtein et al., 2013) (Figure 2). Il a une moyenne de poids moléculaire entre 50 et 150 KDa, avec une valeur de pKa de 6,3 et est soluble dans les solutions d'acide dilué (Zhu et al., 2007). À ce pH, le chitosane se comporte comme grande molécule polycationique due à ses groupes aminés réactifs, qui font son utilisation dans l'industrie et la recherche dans une série de domaines possibles.

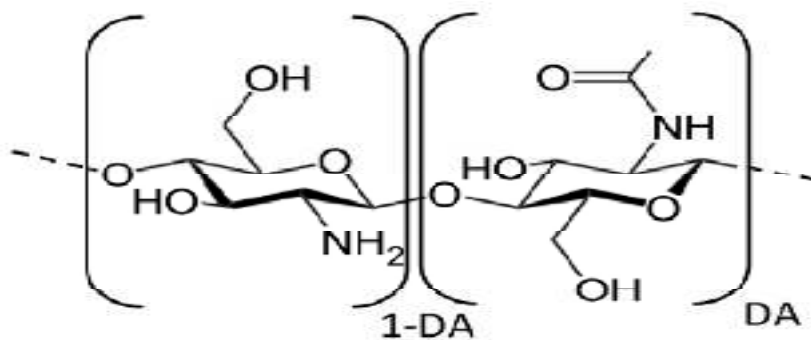


Figure 2 : Représentation de la structure chimique de chitosane. Résidu D-Glucosamine (GlcN) à gauche et N-acétyl-D-Glucosamine (GlcNAc) à droite (Audrey et al., 2016).

Le chitosane est le deuxième polysaccharide naturel répandu dans la nature après la cellulose (Kaur et Dhillon, 2014). Il est présent dans l'exosquelette des crustacés et présent aussi dans

les algues vertes, les parois cellulaires des champignons, dans les cuticules des insectes et des arachnides et (khoushab, 2010).

4.2. Systématique de la crevette (Alcock, 1901 ; Garcia et al., 1973)

Règne : Animalia.

Embranchement : Arthropoda.

Classe : Malacostraca.

Ordre : Decapoda.

Famille : Penaeidae.

Genre : *Prarapenaeus*.

Espèce : *Prarapenaeus longirostris*.

4.3. Propriétés physico-chimiques et biologiques

4.3.1 Propriétés physico-chimiques

Le chitosane est caractérisé par son degré de désacétylation, sa viscosité et son poids moléculaire.

a) Le degré de Désacétylation (DD) : est le pourcentage molaire de l'élimination des groupements N-acétyle. Ce paramètre (DD) influe sur toutes les propriétés physicochimiques (masse moléculaire en poids, viscosité, solubilité, etc.) du chitosane et apparaît donc comme le plus important. La détermination du DD est l'une des analyses de routine lors de l'extraction de la chitine et la préparation du chitosane (Onesippe, 2005).

b) La viscosité : dépend de son degré d'acétylation : plus il est désacétylé, plus il y a de groupements amine libres, plus le chitosane est soluble, et plus sa viscosité est importante dépend aussi de sa concentration, de la température, et le pH avec une valeur de pKa de 6,3 et est soluble dans les solutions acides diluées (Zhu et al., 2007).

c) **Le poids moléculaire** : peut être déterminé par HPLC. La masse moléculaire moyenne comprise entre 50 et 150 KDa (**Zhu et al., 2007**).

4.3.2. Propriétés biologiques

Le chitosane est biocompatible et biodégradable par les micro-organismes possédant des enzymes qu'on appelle chitosanase. Il montre des propriétés cicatrisantes remarquables et un bon effet sur le pansement/blessure processus de guérison (**Murakami et al., 2010**). Le chitosane a également des propriétés inhibitrices sur la croissance de nombreux parasites et infections. Il a de plus des propriétés immunologiques, antitumorales (**Zemmouri, 2008**), neuroprotectrice (**Pangestuti et al., 2010**) et anti-inflammatoire (**Yang et Lee, 2010**).

Des propriétés bactériostatiques et fongistatiques observées qu'à l'état protoné des fonctions amine qui augmente l'activité antibactérienne du chitosane (**Baldrick, 2010 ; Vo et al., 2013**).

4.4. Application

Les applications du chitosane sont très larges et se retrouvent dans divers domaines tels que l'alimentation, l'industrie, l'agriculture, la diététique, les cosmétiques et la médecine. La médecine régénérative représente le champ d'application d'intérêt pour ce projet d'étude (**Khor et Yong, 2003 ; Shahidi et Abuzaytoun, 2005 ; Khoushab.F et Yamabhai.M, 2010**)(Figure 3).

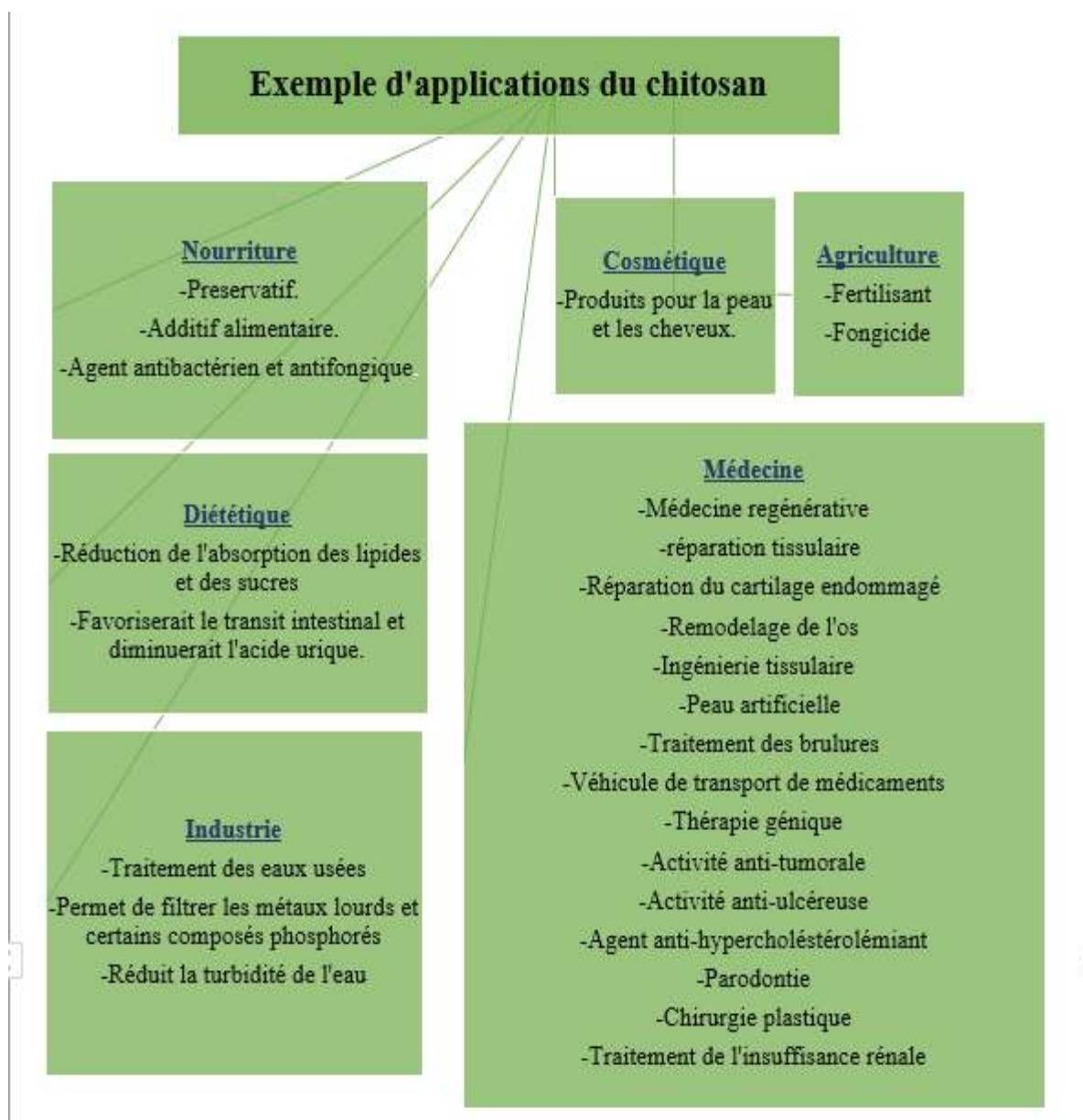


Figure 3 : Exemples d'applications du chitosane(Khor et Yong, 2003 ; Shahidi et Abuzaytoun,2005).

Références bibliographiques

- Abed, N., Essayd.M. Profil de résistance des bactéries à Gram positif et à Gram négatif isolées au niveau du CHU de Constantine, Ecologie Microbienne, Université des frères Mentouri Constantine. Pp: 165 ; 2015.
- Abetz, L., Sutton, M., Brady, L., McNulty, P., Gagnon, D. D. The Diabetic Foot Ulcer Scale (DFS : a quality of life instrument for use in clinical trials. *Practical Diabetes International*. Vol : 19(6), pp : 167-175 ; 2002.
- Acharya, B., Kumar, V., Varadaraj, M.C., Lalitha, R., Rudrapatnam, N. Caractérisation des chito-oligosaccharides préparés par chitosanolyse à l'aide de la papaïne et de la pronase, et leur action bactéricide contre le *Bacillus cereus* et *Escherichia coli*. *Journal biochimique*. Pp: 12-21; 2005.
- Ahmed, T.A., Aljaeid, B.M. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug Des. Dev. Ther.* Vol: 10, pp: 483–507; 2016.
- Aider, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT- Food Science and Technology*. Vol: 43, pp: 837-842; 2010.
- Ako-Nai, A., Ikem I., Akinloye O., Aboderin A., Ikem R., Kassim O. Characterization of bacterial isolates from diabetic foot infections in Ile-Ife, Southwestern Nigeria. *The Foot*. Vol :16(3), pp :158-164 ;2006.
- Al Benwan, K., Al Mulla, A., Rotimi, VO. A study of the microbiology of diabetic foot infections in a teaching hospital in Kuwait. *Journal of infection and public Health* ; 2012.Pp :2 ;5(1) :1-8.
- Allan, L. Optimisation de la revascularisation des îlots pancréatiques au cours de la transplantation : approche génétique ou pharmacologique. Thèse de doctorat. Pp: 120; 2008.
- Altenburg, N., Joraschky, P., Barthel, A., Bittner, A., Pohlmann, K., Rietzsch, H., Bomstein, S. R. Alcohol consumption and other psycho-social conditions as important factors in the development of diabetic foot ulcers. *Diabetic Medicine*. Vol : 28, pp: 168-174; 2010.
- American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. Pp: 29-43; 2011.
- American Diabetes Association: Peripheral arterial disease in people with diabetes (Consensus Statement). *Diabetes Care*. Vol :339,pp : 26-330 ; 2003.

- Ammari, H. Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale. 6ème Edition. Pp : 191 ; 2011.
- Aouati, H. Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicillines : étude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques. Département De Biochimie et De Microbiologie, Algérie : thèse N° : 006. Pp : 29-35 ; 2009.
- Arbouche, LZ. Les effets du traitement substitutif post ménopausique chez la diabétique de type 2, sur le métabolisme des lipoprotéines et le métabolisme glucidique. Thèse doctorat d'état en Médecine. Univ d'Alger, Algérie. Pp : 16-23 ; 2007.
- Arnaud, C. Surveillance des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé en France. Réseau BMR-Raisin. Pp : 35 ; 2010.
- Association des infirmières et infirmiers autorisés de l'Ontario (AIIO). Évaluation et traitement des plaies du pied chez les personnes atteintes de diabète (2 éd.). Toronto, Ontario : Association des infirmières et infirmiers autorisés de l'Ontario. Pp : 61 ; 2013.
- Attouche, A. Etude sur le pied diabétique. [Thèse pour l'obtention du doctorat en médecine]. Pp: 86; 2017.
- Audrey Aussel, Noëlie B. Thébaud, Alexandra Montembault, Laurent David, Laurence Bordenave, Biomatériaux Cliniques. Vol. 1 - n° 1, 2016.
- Bakker, K., Apelqvist, J., Lipsky, B. A., Van Netten, J. 1., Schaper, N. C. The IWGDF Guidance documents on prevention and management of foot problems in diabetes: development of evidence-based global consensus. International Working Group on the Diabetic Foot. Pp: 1-14; 2015.
- Baldrick, P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regul Toxicol Pharmacol*. Vol: 56(3), pp:290-9; 2010.
- Bautista-Banos, S., Romanazzi, G., Jiménez-Aparicio, A. (Eds.) Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities; Amsterdam, The Netherlands. 4e éd. Pp. 537-541; 2016.
- Belhadj, M., Malek, R., Aribi, S., Arrada, M., Ayad F., Bachaoui, M., Benfenatki, N., Berrah, A., Berrah, M., Bouchenak, M., Bouderd, Z., Boudiba, A., Brouri, M., Cherrak, A., Guermez, R., Lezzar, E., MImouni, S., Nadir, D., Oudjit, S., Roula, D., Zekri, S. Guide de diabétologie. Livre. Comité Médical National de Diabétologie ; éd. 7. Pp : 707-712 ; 2005.

- Belhadj, M. Diabcare Algérie. Médecine des Maladies Métaboliques. Vol :4, pp : 88-92 ; 2010.
- Benhabiles, M.S., R. Salah, H. Lounici, N. Drouiche, M.F.A. Goosen, N. Mameri. L'activité antibactérienne de la chitine, du chitosan et de ses oligomères a préparé à partir de la perte de coquille de crevette. Food Hydrocolloïdes. Vol : 9, pp: 56; 2012.
- Benkhelifa, T., Z. Benzian, M. Benghani, M. S. Merad. Flore bactérienne dans le pied diabétique. Diabetes Metab. Pp : 39 ; 2013.
- Bernard, L., Stahl, J P. Recommandations pour la pratique Clinique prise en charge du pied diabétique infecté. Médecine et maladies infectieuses. Vol : 37, pp : 26-50 ; 2007.
- Bernard, P., Bédane, C., Mounier, M., Denis, F., Bonnetblanc, JM. Dermohypodermes bactériennes de l'adulte : incidence et place de l'étiologie streptococcique. Vol: 122, pp : 495-500 ; 1995.
- Bevilacqua, S. Evaluation de l'impact d'une équipe opérationnelle en infectiologie sur la consommation et le cout des antibiotiques au CHU de Nancy. Thèse pour l'obtention du titre de docteur de l'université HENRI POINCARÉ. Pp : 182 ; 2011.
- Bhatnagar, A., Sillanpää, M. Applications of chitin- and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater - A short review. Adv Colloid Interface Sci. vol:152, pp: 26–38, 2009.
- Bjerke, Wendy. The Impact of Infectious Disease on Chronic Disease: A Review of Contemporary Findings. Journal of Social, Behavioral, and Health Sciences. Issue 1, volume 5, pp: 45–5; 2011.
- Borg, M.A., DeKraker, M., Scicluna, E., Van Sande-Bruinsma, N., Tiemersma, E., Monen, J. Prevalence of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) in invasive isolates from southern and eastern Mediterranean countries. J Antimicrob Chemother. Vol: 60, pp: 1310–1315; 2007.
- Botros, M., Kuhnke, J., Embil, J., Goetti, K., Morin, C., Parsons, L., Evans, R. Best practice recommendations for the Prevention and Management of Diabetic Foot Ulcers. Pp : 1-66 ; 2017.

- Boudellaa, Y., Bougattoucha, W. Examen cyto bactériologique des urines. Ecole de formation paramédicale de Skikda Algérie. Thèse de doctorat, pp : 254 ; 2010.
- Bouhassira, D., Attal, N., Fermanian, J., Alchaar, H., Gautron, M., Masquelier, E., Grisart, J. Development and validation of the Neuropatic Pain Symptom Inventory. Vol: 108(3), pp: 248-257; 2004.
- Bouhenna, M., Salah, R., Bakour, R., Drouiche, N., Abdi, N., Grib, H., Lounici, H., Mameri, N. Effects of chitin and its derivatives on human cancer cells lines. Environ. Sci. Pollut. Vol: 22, pp: 15579–15586; 2015.
- Bowering, K., Embril, J. Foot Care. Canadian Journal of Diabetes. Vol: 37, pp: S145-S149; 2013.
- Britto, D., Assis, B. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. Vol: 9, pp: 241-247; 2015.
- Brun-buisson, C. Risques et maîtrise des infections nosocomiales en réanimation. Réanimation. Pp: 463-471; 2010.
- Bush, K., Jacob, G.A., Medeiros, A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother. Vol:39, pp : 1211-1233 ;1995.
- Carle, S. Les résistances aux antibiotiques: Un enjeu de santé public important pharmactuel, vol 42, pp : 10 ; 2009.
- Chaala, W. Occurrence et profil d'antibiorésistance des *Staphylococcus aureus* isolée de produits alimentaires. Université "Es-senia Oran, Algérie. Thèse de doctorat, pp : 236 ; 2013.
- Charpentier, H-H., Haman, F., Harley, A., Ridou, L. Guide du préparateur en pharmacie. Elsevier Masson. Pp: 239; 2008.
- Chen, HF., Li, CY. Effect-modifications by age and sex on the risks of coronary artery disease and revascularization procedures in relation to diabetes. Diabetes Res Clin Pract. Vol:75, pp : 88–95 ;2007.
- Chidiac, C., Bru, J-P., Choutet, P. Recommandations pour la pratique clinique Prise en charge du pied diabétique infecté. Médecine et maladies infectieuses. Vol : 37, pp :1-13 ; 2007.

- Choi, B.K., Kim, K.Y., Yoo, Y.J., oh, S.J., Choi, J.H., et Kim, C.Y. Activité antimicrobienne in vitro d'un mélange de chitooligosaccharide contre les actinomycetemcomitans et le Streptococcus mutans d'actinobacillus. Journal international des agents antimicrobiens, pp : 320 ; 2001.
- Chung, YC., Su, YP., Chen, CC., Jia, G., Wang, HL., Wu, JC., Lin, JG. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. Acta Pharmacol Sin. Vol:25(7), pp:932-6; 2004.
- Citron, DM., Goldstein, EJ., Merriam, CV., Lipsky, BA., Abramson, MA. Bacteriology of moderate-to-severe diabetic foot infections and in vitro activity of antimicrobial agents. Journal of clinicalmicrobiology. Vol : 45(9), pp : 2819-2828, 2007.
- CLSI (ClinicalLaboratory Standards Institute) recommandées par l'OMS (La standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale, avec collaboration de l'OMS 6ème édition, 2011).
- Coma, V., Deschamps, A.,Martial-Gros, A. Matériaux d'emballage bioactifs d'évaluation antimicrobienne comestible d'activité du polymère e de chitosane sur les contaminants laiterie-connexes. Journal des sciences de l'alimentation.Vol : 32, pp : 35 ; 2003.
- Couret, G., Desbiiez, F. Emergence des infections monomicobiennes à staphylocoque doré méticillinerésistant dans les ostéites du pied diabétique. La Presse Médicale,n°6-C1, vol :36, pp : 851-858 ; 2007.
- Crini, G., Badot, P-M.,Guibal, É. Chitine et chitosane : du biopolymère à l'application. Pp: 303; 2009.
- Cunha, BA. Antibiotic selection for diabetic foot infections: a review. J Foot AnkleSurg. Vol : 23, pp : 42 ; 2000.
- Dai, T., Huang, Y., Sharma, S., Hashmi, J.T., Kurup, D.B., Hamblin, M.R. Antimicrobiens topiques pour des infections de blessure de brûlure. Brevet récent Antiinf. Drogue Discov. Vol : 4, pp : 221-228 ; 2010.
- Dali-Sahi, M. Étude de l'épidémiologie du diabète de type 2 dans des populations endogames de l'ouest algérien. Lebanese Science Journal. Vol :13 (2), pp : 17-26; 2012.
- Dash, M.,Chiellini, F.,Ottenbrite, R.M.,Chiellini, E. Chitosan—A versatile semi-syntheticpolymer in biomedical applications. Vol:36, pp :981–1014; 2011.

- Davies, J., Davies, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* Vol: 74, pp: 417-433; 2010.
- Davis, WA., Knudman, MW., Davis, TME. An Australian cardiovascular risk equation for type 2 diabetes: the Fremantle Diabetes Study. *Intern Med J.* Vol : 40, pp : 286–92 ;2010.
- Dehayem, M. Définition. Classification et physiopathologie des diabètes. Pp: 454–457; 2011.
- DeFronzo, RA. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev*, vol :5, pp : 177–269; 1997.
- Dehayem, M. Définition, classification et physiopathologie des diabètes *Diabétologie Nutrition, Estem, Medline, Paris.* Pp : 259-285 ; 2011.
- Delarras, C. Microbiologie pratique pour le laboratoire (d'analyses ou de contrôle sanitaire). Ed médicales internationales TEC et DOC. Pp : 105 -107-108 ; 2007.
- Diabate, A. Examen cyto bactériologique des pus et des liquides d'épanchement. Thèse Pharm, Bamako. Pp: 50; 2007.
- Diabètes Atlas IDF 7eme Edition 2015.
- Diabètes Atlas IDF 8eme Edition 2017.
- Dieckmann, C., Renner, R., Milkova, L., Simon, J.C. Médecine régénératrice en dermatologie : matières biologiques, technologie de tissu, cellules de tige, transfert de gènes et là-bas. *Exp. Dermatol.* Pp: 196 ; 2010.
- Djahmi, N., Messad, N., Nedjai, S. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains isolated from inpatients with infected diabetic foot ulcers in an Algerian University Hospital. *Clinical Microbiology and Infection.* Vol: 19(9), pp: E398-E404; 2013.
- Djoudi, F., Bonura, C., Benallaoua, S., Touati, A., Touati, D., Aleo, A., Pantan-Valentine leukocidin positive sequence type 80 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying a staphylococcal cassette chromosome mec type IVc is dominant in neonates and children in an Algiers hospital. *New Microbio.* Vol : 12, pp: 52; 2013.
- Dodane, V., Vilivalam, V.D. Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharm Sci Tech Today.* Vol :1, pp : 246–253. 1998.
- Dovillez, P. Chirurgie abdominale. Dijon : Estem. Pp : 146 ; 2006.

- Drouin, P., Blickle, JF., Charbonnel, B., Eschwege, E., Guillausseau, PJ., Plouin, PF., Daninos, JM., Balarac, N., Sauvanet, JP. Diagnostic et classification du diabète sucré les nouveaux critères. *Diabetes and metabolism (Paris)*. Vol : 25, pp :72-83 ; 1999.
- Ducloux, R., Altman, J-J. Le pied diabétique, mécanismes physiopathologiques et épidémiologie. Données générales sur le pied diabétique. Pp :2-6 ; 2014.
- Durgad, S., Koticha, A., Nataraj, G., Deshpande, A., Mehta, P. Diabetic foot ulcers *International Journal of Diabetes in Developing Countries*. Vol :34(3), pp :169-173 ; 2014.
- Dutta, P.K., Tripathi, S., Mehrotra, G.K., Dutta, J. Les perspectives du chitosane ont basé les films antimicrobiens dans des applications de nourriture. *Chimie alimentaire*. Pp: 23; 2009.
- Eaton, P., Fernandes, J.C., Pereira, E., Pintado, M.E., Malcata, F.X. Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. vol: 20, pp: 232; 2008.
- Edmonds, M. E., Foster, A V. M., Sanders, L. J. A Practical Manual of Diabetic Foot Care. États-Unis, Pensilvanie: Blackwell. Vol: 27, pp: 325;2008.
- Eisenbarth, GS. Type I. diabetes mellitus. A chronic auto-immune disease. *N Engl J Med*. Vol: 314, pp: 1360–8; 1986.
- Ela, M.A., El-Shaer, N.S., Ghanem, N.B. Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and tixedolls. *Pharmazie*. Vol: 51, pp: 993-995, 1996.
- ElMakki, M. A., Tamimi, A O., Mahadi, S. L., Widatalla, AH., Shower, M. A Hallux Ulceration in Diabetic Patient. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*. Vol : 49(1), pp : 2-7 ;2010.
- Euzéby, J.P. Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Pp : 485; 2010.
- Farahani, P.I. Pharmacotherapy education and diabetes management: Challenges in Pharmacotherapeutics Education for Diabetes in Real-World Clinical Settings: Views from Family Medicine and Internal Medicine Residents. *Clin Invest Med*. Pp: 38 (3), 2015.

- Faraoun, K., Tahar-Abbas, F., Benasla, L., Sahnine, K., Fazaz, T., Benkhelifa, Z., Benzian, M., Benghani, M., Merad, S. Flore bactérienne dans le pied diabétique. *Diabetes Metab.* Vol : 2, pp : 108; 2013.
- Fauchere, J L., Aucher, P., Burucoa, C., Fendri, C., Grollier, C., Simonet, M. Bacteriofiches techniques en bactériologie clinique. Paris, Ellipses, pp : 174 ; 1997.
- Fédération international du diabète ; 2017.
- Fehaima, Sarra. CHU Tlemcen-service de médecine interne. Qualité de vie et diabète. Mémoire de fin d'étude en vue d'obtention du Diplôme de Docteurs en médecine. Pp : 90 ; 2017.
- Figarella, J., Leyral, G., Terret, M. Microbiologie générale et appliquée delgrave edition. France. Pp : 102, 104, 106, 107, 108 ; 2007.
- Fontbonne, A. Diabétologie. In : Épidémiologie des états diabétiques. Chapitre 1: Paris: Elsevier Masson SAS. Vol: 12, pp: 112; 2014.
- Gadepalli, R., Dhawan, B., Sreenivas, V., Kapil, A., Ammini, AC., Chaudhry, R. A clinico-microbiological study of diabetic foot ulcers in an Indian tertiary care hospital. *Diabetes care.* Pp: 86; 2006.
- Game, F., Jeffcoate, W. MRSA and osteomyelitis of the foot in diabetes. *Diabetic Medicine.* Vol : 21(s4), pp : 16-19 ; 2004.
- Garnier, F., Denis, F. Bactériologie médicale : Techniques usuelles : Cocci à Gram positif. Masson. Chapitre. Pp : 98 ; 2007.
- Gaudy, C., Buxerau, J. Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique, elsevier, Paris. Pp: 14, 23, 24; 2005.
- Goldenberg, R., Punthakee, Z. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome. *Canadian Journal of Diabetes.* Vol: 37, pp: S8-S11; 2013.
- Got, I. Peripheral vascular disease and diabetic foot. *La Revue de médecine interne.* Vol : 29 Suppl. Pp : 249-259 ; 2008.
- Goy, R.C., de Britto, D. ; Assis, O.B.G. Un examen de l'activité antimicrobienne du chitosan. Vol : 19, pp : 241-247; 2009.

- Grumbatch, M-L., Jean, L-R. La prévention et le traitement local des lésions du pied chez les diabétiques. Recommandations de bonnes pratiques Alfediam, paramédical. Pp : 6-7 ; 2005.
- HA Van, G. Conduite à tenir face à une plaie du pied chez un diabétique. la revue de médecine interne n°29. Pp : 238-242 ; 2008.
- HA van, G. Profil bactériologique des lésions trophiques du pied diabétique et leur résistance aux antibiotiques. Diabète & Métabolisme. Supplément 3, vol : 34; 2008.
- HA Van, G. Le pied diabétique. Edition Masson. Paris. Vol: 81, pp : 128-129 ; 2008.
- Hadwiger, L.A., Loschke, D.C. Communication moléculaire en polymères hôtes-parasites d'hexosamine des interactions (chitosane) comme composés de régulateur dans interactions course-spécifiques et autres. Phytopathology. Vol : 3, pp : 285-287; 1981.
- Hadwiger, L.A., Kendra, D.F., Fristensky, B.W., et Wagoner, W. Le Chitosan active des gènes aux usines et empêche la synthèse d'ARN dans les mycètes. Dans R.A.A. Muzzarelli, C. Jeuniaux, et G. chitine en nature et technologie. Vol : 15, pp : 221-231; 1986.
- Hamdi, S., Mahjoub, F., Fennira, E., Gammoudi, A., Sallem, K., Sébai, I., Berriche, O., Amrouche, C., Jamoussi, H. Institut national de nutrition, Tunis, Tunisia. Dépistage des diabétiques à risque d'ulcère du pied. Elsevier Masson SAS. Pp : 652; 2016.
- Hartemann-Heurtier, A. Senneville, C. Diabetic foot osteomyelitis. Diabète Metab. Vol : 34. Pp: 85-95, 2008.
- Helander, I., Nurmiäho-Lassila, E-L., Ahvenainen, R., Rhoades, J. Le rouleau, Chitosan de S. perturbe les propriétés de barrière de la membrane externe des bactéries gram négatives. *International. J. Microbiologie de nourriture* ; 2001.
- Hélène Astier-Théfenne., Audrey Wolf., Chrystelle Darles., Éric Garnote. Vérification des performances d'une méthode selon le SH FORM 44 : application à la coloration de Gram. Pp : 485 ; 2016.
- Herisson, C., Simmon, L. Le pied diabétique. Edition Masson. Paris. Pp : 112 ; 1993.
- Hirano, S. Application de chitine et de chitosane dans écologie champs environnementaux. Dans M.F.A. Applications de chitine et chitosane. Vol: 16, pp : 108; 1997.

- Hopkins, R B., Burke, N., Harlock, J., Jegathisawaran, J., Goeree, R. Economic burden of illness associated with diabetic foot ulcers in Canada. *BMC Health Services Research*. Vol : 15(13), pp : 1-9 ;2015.
- Hosseinnejad, M., Jafari, S.M. Évaluation de différents facteurs affectant les propriétés antimicrobiennes du chitosan. *International. J. Biol. Macromol.* Vol : 92, pp : 476–483 ; 2016.
- Ibo Issa Maman N. Antibiothérapie des infections du pied diabétique. Thèse de doctorat en médecine. Université Mohammed V- Souissi, Maroc ; N °148 RABAT, pp : 595 ; 2013.
- Ikinci, G., Senel, S., Akuncubay H., Kas, S., Ercis, S., Wilson, C. Huncalun Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. Pp: 235; 2002.
- Inade, K., Chirkov, S., IIL, A., Lopatin, S., Varlamov, V. Effet du poids moléculaire du chitosan sur son activité antivirale aux usines. *Biochimie et microbiologie appliquées*. Pp : 586 ; 2006.
- Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), Résistance aux antibiotiques ; 2015.
- International Diabetes Federation Clinical Guidelines Task Force Global Guidance for Type 2 Diabetes. International Diabetes Federation, Brussels;2005.
- International Diabetes Federation. Diabetes and Cardiovascular Disease. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2016.
- International Diabetes Federation. Diabetes. Atlas, third edition 2006. Bruxelles: International Diabetes Federation 2006.
- International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas update poster, 6th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2014.
- International Working Group on the Diabetic Foot. Epidemiology of the diabetic foot; 2016.
- International Working Group on the Diabetic Foot. Recommandations pratiques quant à la prise en charge et la prévention du pied diabétique ; 2007.
- International Working Group on the Diabetic foot. Recommandations pratiques quant à la prise en charge et la prévention du pied diabétique. Basées sur le Consensus International sur le Pied Diabétique ; 2011.

- Kandemir, O., Akbay, E. Risks factors for infection in the diabetic foot with multi-antibiotic resistant microorganisms. *J Infect* 54 Issue, vol: 5, pp:439-445, 2007.
- Karthikeyan, K. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*. Pp : 597-602 ; 2010.
- Kenedra, D.F., Hadwiger, L.A. Caractérisation du plus petit oligomère de chitosane qui est au maximum antifongique de solani de fusarium et obtient la formation de pisatin dans *pisumsativum*, pp : 56; 2014.
- Khalifa, S. le diabète sucré. Algérie office publications universitaires. Pp : 102 ; 2001.
- Khelif, H. la prévention et l'éducation des complications du diabète sucré. Mémoire professionnel en infirmier de santé publique. Ecole paramédical de M'Sila ; 2012.
- Khor, E., Wan, A.C.A. Chitin: Fulfilling a Biomaterials Promise, 2nd ed.; Elsevier Ltd. Waltham, MA, USA. Pp: 423-590; 2013.
- Khoushab, F., Yamabhai, M. Chitin Research Revisited. *Mar. Drugs*, pp: 8, 1988–2012.
- Klein, M. Relations entre le diabète sucré de type 2 et l'amyloïdose chez le. Thèse d'état en vitrine. Univ de Toulouse, France. Pp : 17-88 ; 2009.
- Kohanski MA, Dwyer, DJ., Hayete, B., Lawrence, CA., Collins, JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Vol:130*, pp: 797-81; 2007.
- Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., parc, HJ. Propriétés antimicrobiennes de chitosane et mode d'action : une revue du dernier cri. *Microbiologie de nourriture d'international J*. Vol : 144, pp :51 – 63 ; 2010.
- Kong, M., Chen, X.G., Liu, C.S., Liu, C.G., Meng, X.H., Yu, L.J. Mécanisme antibactérien des microsphères de chitosane dans un système de dispersion plein contre *Escherichia coli*. *Colloïdes et surfaces B : Bio interfaces*. Pp : 66; 2008.
- Krajewska, B., Kyzilol, A., Wydro, P. Chitosan comme subphasedisturbant des couches unitaires de lipide de membrane. L'effet de la température à varier le pH, DPPC et cholestérol. *Colloïdes et surfaces*. Vol : 41, pp : 305-312; 2013.

- Kumar, D. R., Aslinia, F., Yale, S. H., Mazza, J. R. Jean-Martin Charcot: The Father of Neurology. *Clinical Medicine and Research*. Le pied diabétique. *La Revue du Praticien*. Vol: 51, pp : 1788-179 ;2009.
- LabaniYouness. Profil bactériologique et fréquence de résistance aux antibiotiques de l'infection du pied diabétique. [Thèse pour l'obtention du doctorat en médecine]. Pp : 282; 2016.
- Lamchahab, FZ., El Kihal, N., Khoudri, I., Chraibi, A., Hassam, B., Ait Ourhroui, M. Factors influencing the awareness of diabetic foot risks. *Annals of physical and rehabilitation medicine*. Pp: 65; 2011.
- Lan levengood, SK., Zhang, M. Chitosan scaffolds for bone tissue engineering. *J Materials Chemical B*. Pp : 364 ; 2014.
- Langlet, J., Gaboriaud, F., Gantzer, C. Effets du pH sur la plaque formant des comptes d'unité et l'agrégation du bactériophage MS2. *Journal de la microbiologie appliquée*. Vol : 32, pp : 182; 2007.
- Le Consensus International sur le Pied Diabétique. Recommandations pratiques quant à la prise en charge et la prévention du pied diabétique ; 2007.
- Leuba, S., et Stossel, P. Chitosan et d'autres polyamines : activité et interaction antifongiques avec les membranes biologiques. Dans R.A.A. Muzzarelli, C. Jeuniaux, et C. Gooday. *Chitineen nature et technologie*. Pp: 386; 1986.
- Lipsky, B-A. New developments in diagnosing and treating diabetic foot infections. *Diabetes Metab, Res, Rev* 24; pp: 66-71; 2008.
- Liu, H., du, Y.M., Wang, X.H., et Sun, L.P. Le Chitosan tue des bactéries par des dommages de membrane de cellules. *Journal international de la microbiologie de nourriture*. Vol : 2, pp : 95; 2004.
- Liu, X.F., Guan, Y.L., Yang, D.Z., Li, Z., et Yao, K.D. Action antibactérienne de chitosan et de chitosancarboxymethylated. *Journal de la Science appliquée de polymère*. Vol : 21, pp : 143; 2001.
- Livermore, D.M., Brown, D.F. Detection of bêta-lactamase-mediatedresistance. L'obtention du doctorat en médecine]. Marrakech : université Cadi Ayyad, pp : 265; 2015.

- Lokrou, A., Memel, TA., Dago, PK. Bactériologie du pied diabétique en Côte-d'Ivoire. Médecine des Maladies Métaboliques. Vol : 7(5), pp :477-481;2013.
- Luo, Y.; Wang, Q. Recent Advances of Chitosan and Its Derivatives for Novel Applications in Food Science. J. Food Process. Beverages, pp : 1, 1-13 ; 2013.
- Lushiku, E-B. le pied diabétique, les pathologies du pied. Diabetic foot. Service d'orthopédie-traumatologie, HIS., Site Etterbeek-Ixelles et Molière- Longchamp Rev Med Brux, pp : 316-318 ; 2006.
- Madigan, M., Martinko. J. Biologie de Micro-organismes. Université Carbondale de l'Illinois du sud .11e édition. Pp: 862; 2007.
- Mahoney, E. Diabetic Foot Ulcerations. Dans J. M. McColloch, L. C. Kloth Wound Healing: Evidence-Based Management. Malvern, PA: HMP Communications. 4e éd., pp: 213-230; 2010.
- Markin, D., Duek, L., Berdice, sky. Demande de Chitosane de l'assistant M. de production bio-basée active de films et potentiel dans l'industrie alimentaire : Revue. LWT - Les sciences et technologies de l'alimentation. Vol : 43, pp : 837– 842 ; 2010.
- Marrocco, C. J., Bush, R. L. Peripheral arterial disease. Dans L. A Lavery, E. J. G. Peters, R. L. Bush High Risk Diabetic Foot Treatment and Prevention. États-Unis, New-York : Informa healthcare. Pp : 1-8; 2010.
- Martini, J., Grumbach, M., Hartemann, A., Bertoglio, J. 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. Pp : 506 ; 2015.
- Maser, RE., Sosenko, JM., Ziegler, D. American Diabetes Association. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabete Association. Diabetes Care. Vol : 962, pp : 28-956 ; 2005.
- Mehdi, S. La fréquence des bactéries multi résistante à l'hôpital Hassan ii de Settat. Thèse pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie. RABAT. Pp : 215; 2008.
- Mendes, J., Marques-Costa, A., Vilela, C. Clinical and bacteriological survey of diabetic foot infections in Lisbon. Diabetes research and clinical practice. Vol: 95(1), pp :153-161 ;2012.

- Mendes, J., Marques-Costa, A., Vilela, C. Clinical and bacteriological survey of diabetic foot infections in Lisbon. *Diabetesresearch and clinicalpractice* ; 2012.
- Meyer, R., Kessler, L. Le pied diabétique, Première partie. *La Lettre du Rhumatologue*. Vol : 264, pp : 24-34 ; 2000.
- Meyer, A., Deiana, J., Bernar, A. *Coure de microbiologie générale*, doinéditeurs, 2e édition, France. Pp : 257 ; 2004.
- Minor, L., Richard, C. *Méthodes de laboratoire pour l'identification des Entérobactéries*-Institut pasteur ; 1993.
- Monnier L, C. Colette *Définitions et classifications des états diabétiques*. Chapitre 3, Elsevier Masson SAS Atlas IDF ; 2015.
- Muzzarelli, R., Tarses, R., Filippini, O., Giovanetti, E., Biagini, G., Varaldo. Propriétés antimicrobiennes de P.E. de Chitosan de *N-carboxybutyl*. *Antimicrob. Agents Chemothe*. Vol: 16, pp: 110-114;1990.
- Nagoba, B. S., Gandhi, R. c., Wadher, B. J., Rao, A. R., Selkar, S. P. A simple and effective approach for the treatment of diabetic foot ulcers. *International Wound Journal*. vol : 7(3), pp : 153-158; 2010.
- Nauciel, C. *ntitreédition bactériologie médicale*. Vol: 288, pp: 55-69;2000.
- Nigatu, T. Integration of HIV and Noncommunicable Diseases in Health Care Delivery in Low- and Middle- Income Countries. *Prev Chronic Dis*. Vol: 9, pp :110-331; 2012.
- No, L.H.K., Meyers, S.P. Application of chitosan for treatment of wastewaters. *Rev. Environ. Contam. Toxicol*. Vol : 1, pp : 1-27 ; 2000.
- Nordmann, P., Poirel, L. Résistances aux antibiotiques émergentes et importantes chez les bactéries Gram négatif: épidémiologie, aspects théoriques et détection. *Maladies infectieuses*. Vol : 427(16), pp :902-907; 2014.
- Norgreen, L., Hiatt, W. R., Dormandy, J. A., Nehler, M. R., Harris, K. A. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Journal ofVascularSurgery*. Vol : 45(1), pp : S5A-S67A ; 2007.

- Olicón-Hernández, DR., Hernández-Lauzardo, K., Pardo, JP., Peña, A., Velázquez-del Valle, Guerra-Sánchez, G. Chitosan et ses dérivés sur le développement de cellules et la physiologie des maydis d'Ustilago. *Biol Macromol d'international J.* vol : 15, pp :150 ; 2015.
- ONERBA. Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques (ONERBA) : rapport d'activité. Pp :10 ; 2011.
- Onesippe, C. Etude des systèmes polyélectrolytes/Tensioactif en phase aqueuse et l'interface liquide/gaz. Application à l'élaboration de micro – capsules. Thèse de doctorat, Ecole Doctorale : Science chimiques et physique, Université de Montpellier II, France. Vol : 20, pp : 35-45 ; 2005.
- OMS. Organisation Mondiale de la Santé. Définition, diagnostic and classification of diabetes mellitus and its complications; 1999.
- OMS. Organisation Mondiale de la Santé. Rapport Mondial Sur Le Diabète ; 2016.
- Otto, M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *AnnuRev Med.* Vol : 64, pp : 175-88; 2013.
- Pangestuti, R., Kim, S.K. Propriétés de Neuroprotective de chitosan et de ses dérivés. *Drogues marines.* Vol : 8, pp : 2117-2128 ; 2010.
- Papoz, L., Eschwège, E. Epidémiologie du diabète non insulino-dépendant. In: Tchobroutsky, G., Slama, G., Assan, R., Freychet, P., eds. *Traité de diabétologie.* Pp : 329-334, 1990.
- Pas, H. Activité antibactérienne de des chitosans et oligomères de chitosan avec différents poids moléculaires. *International. J. Microbiologie de nourriture.* Vol : 2, pp : 118-184 ; 2002.
- Perelshtein, I., Ruderman, E., Perkas, N., Tzanov, T., Beddow, J., Joyce, E. Chitosan et nanoparticules complexes chitosan-ZnO-basés : formation, caractérisation, et activité antibactérienne. *Matériaux Chem B.* Pp : 356 ; 2013.
- Perlemuter, G. Complications du diabète (en dehors des complications Perspectives d'avenir. *Médecine & Hygiène.* Vol : 59, pp: 2526-2529 ; 2001.
- Perlemuter, G., Morin, N.H. *Endocrinologie Diabétologie Nutrition.* 4ème édition. Collection Med-Line. Estem. Pp: 195; 2004.
- Pfaller, M.A., Segreti, J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Infect Dis.* Vol : 42 (suppl. 4), pp :153-63 ; 2006.

- Pibiri, M.C. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorale. Ecole poly technique fédérale, EPFL. Lausanne (suisse) ; 2006.
- Ponce, AG., Fritz, R., del Valle, C., Roura, SI. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LW Technol.* Vol. 36, Pp. 679-684 ; 2003.
- Poyart, P. Bactériologie systématique, Tom II, Ed : Masson : Paris. Pp: 25, 26, 45; 2003.
- Price, P., Krasner, D. L. Health-Related Quality of life and Chronic Wounds: Evidence and Implications for Practice. Dans D. L. Krasner, G. T. Rodeheaver, R. G. Pp :62; 2012.
- Qassimi, F. Le pied diadétique. Thèse de doctorat en médecine. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Maroc. Vol : 12, pp : 56; 2015.
- Raafat, D., Von Bargen, K., Haas, A., Sahl. Aperçus de H.G. du mode de l'action du chitosan comme composé d'antibactérien. *APPL. Entourer. Microbiologie.* Vol :2, pp: 186-201; 2008.
- Raja, NS. Microbiology of diabetic foot infections in a teaching hospital in Malaysia: a retrospective study of 194 cases. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*; 2007.
- Ramakant, P., Verma, A., Misra, R. Changing microbiological profile of pathogenic bacteria in diabetic foot infections: time for a rethink on which empirical therapy to choose? *Diabetologia.* Vol: 54(1), pp:58-64; 2011.
- Ramakant, P., Verma, A., Misra, R. Changing microbiological profile of pathogenic bacteria in diabetic foot infections: time for a rethink on which empirical therapy to choose. *Diabetologia*; 2011.
- Ramdani-Bouguessa, N., Bes, M., Meugnier, H., Forey, F., Reverdy, M-E., Lina, G. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital; 2006.
- Renaud, F., Tissot-Guezzaz, F. La sécurité au laboratoire de biologie clinique. Manuel de bactériologie clinique 2eme Ed. Vol. 1 Ed. Elsevier. Pp : 141 -155 ; 1994.
- Réseau d'alerte d'investigation de surveillance des infections nosocomiales (RAISIN) surveillance des bactéries multi résistantes dans les établissements de santé en France- réseau BMR-Raisin, résultats 2007-2009.

- Reyher, KK., Dufour, S., Barkema, WH., Des Côteaux, L., DeVries, JT., Dohoo, RI., Keefe, PG., Roy, J-P., Scholl, DT. The National Cohort of Dairy Farms--A data collection platform for mastitis research in Canada. *J Dairy Sci.* Vol : 94, pp : 1616-1626 ; 2011.
- Richard, JL., Lavigne., JP, Got, I. Management of patients hospitalized for diabetic foot infection: results of the French OPIDIA study. *Diabetes & metabolism.* Vol : 37(3), pp :208-215; 2011.
- Richard, JL., Sotto, A., Jourdan, N. Risk factors and healing impact of multidrug-resistant bacteria in diabetic foot ulcers. *DiabetesMetabRev.* Vol : 12, pp : 111-124; 2008.
- Richard, J-L., Lavigne, J-P. Prise en charge du pied diabétique infecté. *Médecine interne*, 29, Edition Elsevier Masso. Pp: 222-230; 2007.
- Saito, I., Kokubo, Y., Yamagishi, K. Diabetes and the risk of coronary heart disease in the general Japanese population: The Japan Public Health Center-based prospective (JPHC) study. *Atherosclerosis.* Vol : 216, pp : 187-91; 2011.
- Schaechter, M., Medoff, G., Eisenstein Barry, I. *Microbiologie et pathologie infectieuse.* De Boeck Univ. Paris Bruxelles. Pp: 188-189; 1999.
- Schaper, NC. Diabetic foot ulcer classification system for research purposes: A progress report on criteria for including patients in research studies. *Diabetes Metab Res Rev*, vol: 20; 2004.
- Schaper, N. C., Andros, G., Apquelvist, J., Bakker, K., Lammer, J., Lepantalo, M., Hinchliffe, R. J. Diagnosis and treatment of peripheral arterial disease in diabetic patients with a foot ulcer. A process report of the International Working Group on the Diabetic Foot. *Diabetes/Metabolism research and reviews.* Vol : 28(1), pp : 218-224; 2012.
- Senneville, E. Ostéite du pied chez le diabétique. *Rev. Prat.* Vol:57, pp : 4-991 ;2007.
- Senneville, E. Infection et pied diabétique. *La revue de médecine interne* 29. Elsevier Msson SAS. Pp :201-215 ; 2008.
- Senneville Eric. Apport de la biopsie osseuse transcutanée dans le traitement de l'ostéite du pied diabétique. Thèse de doctorat d'université. Lille : Université de Lille, 2010.

- Shah, AD., Langenberg, C., Rapsomaniki, E. Type 2 diabetes and incidence of a wide range of cardiovascular diseases: a cohort study in 1.9 million people. *The Lancet*. Vol : 385, pp : 86; 2015.
- Shahidi, F., Abuzaytoun, R. Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, productions, applications, and health effects. *Adv. Food Nutr. Res.* Vol: 49, pp : 93-135; 2005.
- Shankar, E., Mohan, V., Premalatha, G., Srinivasan, R., Usha, A. Bacterial etiology of diabetic foot infections in South India. *European journal of internal medicine*. Vol: 16(8), pp:567-570; 2005.
- Sharp, R.G. A Review of the Applications of Chitin and Its Derivatives in Agriculture to Modify Plant-Microbial Interactions and Improve Crop Yields. *Agronomy*, 3. Pp: 757–793; 2013.
- Sibbald, K. Y. Woo *Chronic Wound Care: A Clinical Book for Healthcare Professionals* Malvern: HMP Communications. 4e éd. Pp : 549-555 ; 2015.
- Société de Pathologie infectieuse de Langue Française. Recommandations sur la prise en charge du pied diabétique infecté. *Medecine et maladies infectieuses*. Vol : 37, pp :1-13 ; 2007.
- Soussy, C.-J. Résistance bactérienne aux antibiotiques. *Monographies en Urologie*. Pp: 21-46; 2007.
- Steed, D. L. *Wounds in People with Diabetes: Assessment, Classification, and Management*. Dans D. L. Krasner, G. T. Rodeheaver, G. Sibbald. *Chronic Wound Care: A Clinical Source Book for Healthcare Professionals* Malvern, PA: HMP Communications. 4e éd. Pp: 537-541; 2007.
- Sudarshan, N.R., Hoover, D.G., Knorr, D. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnological*. Vol: 6, pp: 257-272; 1992.
- Talber, M., Willoquet, G., Gervais, R. *Pharmacoclinique*, Wolters Kluwer France. Pp : 641, 648, 655; 2009.
- Tao, Y., Qian, G., Xie, J. Effet de chitosan sur la perméabilité du membrane et morphologie de cellules de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Staphylococcus aureus*. *Polymères d'hydrate de carbone*. Vol: 2, pp: 120-201; 2011.

- Tayel, A.A., Moussa, S., Opwis, K., Knittel, D., Schollmeyer, E., Nickisch-Hartfiel, A. Inhibition of microbial pathogens by chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* Vol : 47, pp :10–14 ; 2010.
- Thierry Pepersack. Le diabete en geriatrie. Service de Médecine Interne Gériatrique. C.H.U. Brugmann Université Libre de Bruxelles;2014.
- Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M., Alagui, A. Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properti. *Polym.* Vol: 44, pp : 7939-7952, 2003.
- Toumi, A., Bernard, L., Chakroun, M. Antibiothérapie des infections du pied diabétique. *Revue Tunisienne d'infectiologie.* Vol : 5, pp : 61-67 ; 2011.
- Tsai, G.J., Su, W.H. Activité antibactérienne de chitosan de crevette contre *Escherichia coli*. *Journal de la protection de nourriture*; 1999.
- Turhan, V., Mutluoglu, M., Acar, A. Increasing incidence of Gram-negative organisms in bacterial agents isolated from diabetic foot ulcers. *Journal of infection in developing countries*; 2013.
- Uçkay, I., Gariani, K., Pataky, Z., Lipsky, BA. Diabetic foot infections: state-of-the-art. *Diabetes, Obesity and Metabolism*; 2014.
- Van Bambeke, F., Tulkens, P., Glupczynski, Y., Leclercq, M., Sonveaux E. pharmacologie et pharmacothérapie Anti-infectieuse. Unité de pharmacologie cellulaire et Moléculaire Université catholique de Louvain. Bruxelles. Pp : 03 ; 2008.
- Vanbourdolle, M. infectiologie, 3ème edition Walters'skluwer. Pp: 347-645 ; 2007.
- Vandepittel, J.K., Engbaek, P., Piot, C.C. Heuk. Bactériologie clinique: techniques de base pour le laboratoire Prélèvements de matière fécale, écouvillonnage, préparation de suspension de matière fécale, ensemencement des boites de gélose. Organisation mondiale de la santé. Pp : 37 ; 1994.
- Vexiau, P., Acker D. Diabète et cicatrisation. Pp : 1-40 ; 2008.
- Vincent, J. Bactéries multirésistantes dans les hôpitaux français : bilan en et perspectives de surveillance nationale dans le cadre du Réseau d'Alerte d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN) ; 2000.

- Vo, T.-S., Ng, D.-H., Kim, S.-K. Cosmeceutical compounds from marine sources. In Kirk-Othmer Chemical Technology of Cosmetics; Seidel, A., Bickford, M., Eds.; John Wiley Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA.Pp: 483–499; 2013.
- Wang, S-H., Sun, Z-L., Guo, Y-J. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from foot ulcers in diabetic patients in a Chinese care hospital: risk factors for infection and prevalence. *Journal of medical microbiology*. Vol:59(10), pp :1219-1224; 2010.
- Wang, Z., Zheng, L., Yang, S., Niu, R., Chu, E., Lin, X. N-acetylchitooligosaccharide is a potent angiogenic inhibitor both *in vivo* and *in vitro*. *BiochemBiophysRes Commun*.Vol : 357, pp : 26–31 ; 2007.
- Wang, G.H. Inhibition et inactivation de 5 espèces des microbes pathogènes portés par les aliments par le chitosan. *Journal de la protection de nourriture*; 1992.
- Winell, K., Pietilä, A., Niemi, M. Trends in population attributable fraction of acute coronary syndrome and ischaemic stroke due to diabetes in Finland. *Diabetologia*. Vol : 54, pp : 2789–94; 2011.
- Woo, K. Understanding diabetic foot ulcers. *Nursing*. Vol :43, pp : 36-42; 2013.
- Yang, E.J., Kim, J.G., Kim, J.Y., Kim, S., Lee, N. Effet anti-inflammatoire des oligosaccharides de chitosan en 264.7 cellules CRUES. *Journal de l'Europe centrale de la biologie*. Vol : 5, pp : 95-102; 2010.
- Zahi, S., Mahir, L., Moigny, Y., Lmidmani, F., El Fatimi, A. Service de médecine physique et de réadaptation fonctionnelle, Casablanca, Maroc. Pied diabétique : profil clinique et prévalence des amputations. Pp : 50 ; 2017.
- Zekri, S. Profil épidémiologique de l'AOMI du diabétique : contribution à une meilleure prise en charge. Thèse de DESM – Faculté de Médecine d'Alger. Pp :389; 2005.
- Zemmouri, A., Tarchouli, M., Benbouha, A. Profil bactériologique du pied diabétique et son impact sur le choix des antibiotiques. *Pan AfricanMedical Journal*. Pp : 20(1); 2015.
- Zemmouri, H. Utilisation du chitosane comme agent flocculant dans le traitement des eaux. Mémoire de Magister, Laboratoire de Biotechnologie Environnementale et Génie des procédés, Ecole Nationale polytechnique, Alger, Algérie ; 2008.

-Zhong, Z., Xing, R., Liu, S., Wang, L., Cai, S., Li, P. Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities *in vitro*. CarbohydrRes. Vol : 343(3), pp:566-70; 2008.

-Zhu , X-f., Zhou, Y., Feng, JL. Analysis of both chitinase and chitosanase produced by *Sphingomonas* sp. CJ-5. J Zhejiang Univ Sci B. vol : 8, pp : 831-838; 2007.

Chapitre I : Partie bibliographique

Introduction	1
1. Généralités sur le diabète	3
1.1. Définition	3
1.2. Epidémiologie	3
1.2.1. Donnés mondiale	3
1.2.2. Donnés nationale	3
1.3. Classification du diabète	4
1.3.1. Le diabète de Type 1	4
1.3.2. Le diabète de type 2	4
2-Le pied diabétique	5
2.1. Physiopathologie	6
2.2. Facteurs pathogéniques	6
2.2.1. Facteurs pathogéniques internes	6
2.2.1.1. La neuropathie diabétique	6
2.2.1.2. Troubles vasculaires artériels	8
2.2.1.3. Predisposition aux infections	9
a) Impacts des complications	9
b) Germes en causes	10
2.2.2. Facteurs pathogènes externes	11
3-Antibiotique et antibiorésistance	11
3.1. Définition des antibiotiques	12
3.2. Mode d'action des antibiotiques	12
3.3. Antibiorésistance	13
3.3.1. Différents types de résistance bactérienne	13
3.3.2. Mécanisme de la résistance bactérienne aux antibiotiques	14
3.4. Bactéries multirésistantes	14
3.4.1. Définition	14
3.4.2. BMR des hospitaliers	15

Sommaire

4. Chitosane et propriétés générales	16
4.1. Définition et structure.....	16
4.2. Systématique de la crevette	17
4.3. Propriétés physico-chimiques et biologiques.....	17
4.3.1. Propriétés physico-chimiques	17
4.3.2. Propriétés biologiques	18
4.4. Application	18

Chapitre II : Matériels et Méthodes

1. Matériels.....	20
1.1. Matériels biologiques	20
1.2. Matériel non biologique	20
2. Méthodes	21
2.1. Prélèvements et échantillonnage	21
2.2. Examen bactériologique de pus	21
2.2.1. Isolement des bactéries	21
2.2.2. Identification bactérienne	22
2.2.3. Recherche des caractères biochimiques (Galerie classique)	24
2.2.4. Mini galerie API 20E	30
2.2.5. Antibiogramme.....	31
2.2.6. Recherche complémentaire	32
2.2.6.1. Recherche des Staphylocoques Methicillino-Résistantes (MRSA)	32
2.2.6.2. Test de screening à l'oxacilline pour Staphylococcus aureus	33
2.2.6.3. Recherche de β -lactamase à spectre élargi	34
2.3. Etude de l'activité antibactérienne du chitosane	35

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Résultats	37
1. Données microbiologiques	37
2. Résultats de l'antibiorésistance	30

Sommaire

3. Données épidémiologiques	46
4. Etude de l'effet antibactérien de chitosane	49
III.2. Discussion	54
Conclusion	62
Références bibliographiques	64
Annexes.	

II. Matériel et méthodes

➤ Lieu d'étude

Notre étude est réalisée sur une durée de 03 mois au niveau du laboratoire d'hygiène à Blida. L'échantillonnage des pus des infections du pied diabétique a été effectué entre le 11/02/2018 et le 24/04/2018. Durant cette période, nous avons réalisé 63 prélèvements purulents proviennent de l'Etablissement Public Hospitalier de Blida et de Kolea et de Boufarik(EPH-Blida, EPH-Kolea, EPH-Boufarik),et au Centre Hospitalier Universitaire MustaphaPacha (CHU d'AlgerMustapha Pacha). Ces derniers accueillent tous les patients hospitalisés au niveau de différents services, ou non hospitalisés ayant une pathologie au niveau de maison diabétique de Blida.

➤ Modalités de recueil des données

Nous avons effectué notre travail grâce à des fiches d'exploitation préalablement établies, comportant pour chaque malade les données nécessaires à notre étude (Figure4, annexe 2). Elles comprennent :

- L'identité du patient.
- L'âge et le sexe.
- Les résultats de l'examen direct, la culture et l'antibiogramme.

II.1. Matériels

II.1.1. Matériels biologiques

Le matériel biologique est représenté par :

- Le pus** : prélevé par écouvillonnage à partir des plaies du pied chez les diabétiques.
- Le chitosane** : la molécule biologique dérivée de la chitine extraite à partir des carapaces des crevettes. Elle est caractérisée par :

- Une couleur blanche.
- Un poids moléculaire (PM) de 69kDa.
- Un degré de désacétylation (DDA) de 74%.
- Souches de références (*Escherichia coli*ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Staphylococcus aureus*ATCC6538, *Klebsiella pneumonie*, *Enterobacter* ssp).

II.1.2. Matériel non biologique

Le matériel non biologique est représenté par les instruments, les appareillages, les réactifs, les milieux de cultures et les disques d'antibiotiques utilisés (Tableau 6, Annexe 2).

II.2. Méthodes

II.2.1. Prélèvements et échantillonnage

Les prélèvements bactériologiques sont réalisés en cas d'infection établie cliniquement. Ils sont précédés d'un nettoyage de la lésion par une compresse stérile imbibée de sérum physiologique stérile. La méthode de prélèvement effectuée est par :

- L'écouvillonnage avec prélèvement profond de pus qui consiste à passer un écouvillon de coton sur la lésion infectée dans un mouvement de zigzag combiné à une rotation.
- Ce prélèvement est effectué sur deux écouvillons l'un pour l'examen direct (cytologie) et l'autre pour la culture (microbiologie). Les prélèvements de cette dernière sont ensuite immédiatement acheminés au laboratoire de microbiologie afin d'être ensemencés sur un milieu spécial.

Nous avons réalisé 63 prélèvements de pus des pieds diabétiques issus de plusieurs établissements selon le tableau ci-dessous

Tableau 7 : Echantillonnage de pus du pied diabétique dans les hôpitaux et l'unité de soins.

Etablissements	EPH-Blida	CHU d'Alger	EPH- Boufarik	Maison diabétique	EPH-Kolea
Prélèvements	29	5	7	17	5
Total	63				

➤ Conservation et transport

Les échantillons sont reçus au laboratoire en moins de deux heures à une température ambiante (25°C) pour un résultat optimal et en cas de transport long les prélèvements sont conservés dans une glacière entre 2 et 8°C durant 24 heures (**Murray et al., 2003**).

2.2. Examen bactériologique de pus

2.2.1. Isolement des bactéries

a) Enrichissement des prélèvements

Parfois l'absence de colonies suspectes sur l'isolement sélectif ne suffit pas pour affirmer l'absence de ces bactéries dans le prélèvement. C'est pourquoi un enrichissement du prélèvement est réalisé en même temps que l'isolement. L'enrichissement est réalisé sur un bouillon glucose

tamponné (BGT) ou sur un bouillon cœur cerveau (BHIB) dans le but de favoriser la croissance des bactéries ensemencées en cas de culture faible ou absente.

b) Technique d'ensemencement

La mise en culture de prélèvement de pus est effectuée sur différents milieux de culture (gélose nutritif, Hecktoen ou BCPL et Chapman) dans le but d'isoler les différentes bactéries contenues dans le pus. L'ensemencement est effectué par pipette pasteur stérile en utilisant la méthode de quadrant, en faisant des stries serrées puis éloignées. Les boîtes sont ensuite incubées pour une durée de 24h à 37°C.

2.2.2. Identification bactérienne

L'identification comporte une série d'étape, se succédant le plus souvent dans un ordre déterminé, dont les étapes sont les suivantes :

➤ **Examen macroscopique**

Pour l'examen macroscopique des bactéries communes permet de déterminer les caractères cultureux suivants : taille des colonies, le relief (bombées, plates ou ombiliquées) de la surface des colonies sur boîte, la transparence des colonies sur boîte (transparentes, translucides ou opaques) **(Delarras, 2007)**.

➤ **Examen microscopique**

Au cours de l'analyse microbiologique, l'observation microscopique permet de faire une étude morphologique des cellules d'une espèce microbienne, elle comprend **(Boudellaa et al., 2010)** :

- l'examen à l'état frais (examen entre lame et lamelle de bactéries vivantes)
- l'examen après coloration (le plus souvent sur frottis séché et fixé)

a) Examen à l'état frais

Il permet de noter la présence de bactéries et d'observer les caractères suivants : la forme des cellules (Cocci, bacilles, coccobacilles, incurvés en virgule), le mode de regroupement, la mobilité et la quantité approximative de bactéries par champ microscopique **(Delarras,2007)**.

b) Examen après coloration

Si la plupart des bactéries peuvent être observées en suspension aqueuse, cette observation est grandement facilitée par l'application de colorants. Les colorations, réalisées sur des frottis séchés et fixés(Boudellaa,2010).

-Coloration différentielle : la coloration de Gram

C'est la coloration différentielle systématiquement réalisée lors d'un examen microscopique de bactéries. Elle permet non seulement d'observer la forme des cellules mais aussi de diviser les bactéries en deux grands groupes taxonomiquement différents : les bactéries Gram positives et les bactéries Gram négatives (Delarras,2007).

La coloration de Gram est basée sur l'affinité tinctoriale différente des bactéries à certains colorants due à la constitution de leur paroi. Cette coloration permet aussi d'observer la morphologie des bactéries (formes allongées pour les bacilles et arrondies pour les Cocci).

Le principe de la technique(Hélène et al., 2016) :

- Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Rincer à l'eau déminéralisée.
- Mordantage au Lugol (solution d'iode iodo-iodurée) : étaler le Lugol et laisser agir 20 secondes ;rincer à l'eau déminéralisée. On peut réaliser une deuxième fois l'opération identiquement pour plus de sécurité.
- Décoloration (rapide) à l'alcool: verser goutte à goutte l'alcool ou un mélange alcool-acétone sur la lame inclinée obliquement, et surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau déminéralisée
- Recoloration à la safranine ou à la fuchsine. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute.
- Laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame sur une platine chauffante à 40°C pendant 10 à 15 minutes.
- Observer avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement x1000).

Les étapes 1 et 2 colorent en violet le contenu de la bactérie. Le violet de gentiane se fixe sur les composants cytoplasmiques de toutes les bactéries. Le Lugol permet de fixer cette coloration interne.

L'étape 3 (alcool) sert à décolorer le cytoplasme des bactéries qui seront dites « Gram négatives ». En effet, celles-ci ont une paroi pauvre en peptidoglycane donc plus fine qui va laisser passer l'alcool (molécule lipophile), et qui décolorera le cytoplasme en éliminant le violet de gentiane. Au contraire, pour les bactéries dites « Gram positif » la paroi constitue une barrière imperméable à

l'alcool car elle est composée d'une "couche" de peptidoglycane plus importante donc de ce fait ; plus épaisse. Elles resteront alors violettes.

L'étape 4 est une contre coloration ayant pour but de donner aux bactéries Gram négatives précédemment décolorées une teinte rose permettant de les visualiser au microscope.

2.2.3. Recherche des caractères biochimiques (Galerie classique)

Après l'isolement des bactéries de pus du pied diabétique, nous avons réalisé la galerie classique pour mettre en évidence les caractères biochimiques de ces bactéries.

a) Identification des Staphylocoques

Les souches à Gram positif isolées ont été identifiées par des techniques microbiologiques standards (la coloration de Gram, catalase et test de coagulase).

- **Recherche de la catalase**

La catalase a la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène. C'est l'action directe de l'enzyme qui est mise en évidence dans la masse bactérienne (**Garnier et Denis, 2007**).



Technique : Une goutte d'eau oxygénée ($\text{H}_2 \text{O}_2$) est déposée sur une lame avec une colonie bien distincte de culture jeune de 24 h.

Lecture :

- la bactérie possède la catalase (Catalase+) : dégagement immédiat de bulles d'oxygène
- la bactérie ne possède pas la catalase (Catalase-) : pas de bulle d'oxygène.

- **Recherche de la coagulase**

La coagulase libre est présente chez *Staphylococcus aureus*. Ce test consiste à mettre en évidence la coagulase libérée dans le milieu extérieur (**Garnier et Denis, 2007**).

Technique : En ajoutant dans un tube à hémolyse 0,5 ml de plasma humain, 0,5 ml d'une culture de staphylocoques de 24h en bouillon. Le mélange est placé à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Les souches de *S. aureus* provoquant la coagulation du plasma le plus souvent les trois premières heures.

Lecture :

- Un test positif : formation d'un coagulum qui se traduit par transformation du fibrinogène en fibrine.
- Un test négatif : pas de coagulation.

b) Identification des bactéries à Gram négatif

L'identification des souches à Gram négatif (Entérobactéries, *Pseudomonas*) a porté sur une série de tests biochimiques. Les tests biochimiques ayant servi à l'identification sont :

- **Test d'oxydase**

L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires bactériennes, c'est une enzyme qui catalyse une réaction d'oxydo-réduction en impliquant une molécule d'oxygène comme accepteur d'électrons.

Technique : Ce test est réalisé à l'aide des disques prêts à l'emploi, imprégnés du réactif N-diméthylparaphénylène diamine, sur lequel on dépose une colonie.

Lecture : -Présence d'une coloration bleu-violet : Oxydase (+).

-Absence de coloration : Oxydase (-), la lecture est immédiate et sans incubation.

- **Test de fermentation de trois sucres**

Le milieu de culture TSI (Triple Sugar Iron), est principalement utilisé pour la caractérisation biochimique des entérobactéries. C'est un milieu différentiel par la capacité à mettre en évidence les fermentations du : glucose, lactose et/ou saccharose ainsi que la production d'hydrogène sulfuré (H_2S) et de gaz. Le rouge de phénol est l'indicateur colorant virant du rouge au jaune pour un résultat positif. Le noircissement du culot indique la présence de H_2S (**Abed et Essayed, 2015**).

Technique : Ensemencer abondamment la surface du milieu TSI par des stries ou par inondation, puis le culot par simple piqure, à l'aide de la même pipette boutonnée. Visser partiellement la capsule afin de permettre les échanges gazeux. Mettre à l'étuve à $37C^\circ$ pendant 24 heures.

Lecture :

- Aucun sucre dégradé : pente et culot rouge.
- Fermentation du glucose seulement : culot jaune et pente rouge.
- Fermentation du glucose et un des deux autres sucres (lactose ou saccharose) : culot et pente jaune.
- Présence de bulles et le déplacement du milieu vers le haut signifie qu'il y a production du gaz et la production d' H_2S se traduit par un précipité noir.

- **Milieu citrate de Simmons**

Le milieu citrate de sodium (citrate de Simmons) est un milieu solide qui permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie, ce caractère est intéressant pour discriminer les bactéries entre-elles et ainsi de les identifier (Abed et Essayed, 2015).

Technique : La pente ensemencée par une série longitudinale, réalisée à l'anse, à partir d'une suspension de la culture solide en eau distillée stérile. Mettre à l'étuve 24h à 37°C. Le bouchon n'est pas vissé à fond, afin de permettre les échanges gazeux (en particulier l'élimination du dioxyde de carbone).

Lecture :

-La souche est citrate de Simmons positif (+) : Virage de l'indicateur de pH au bleu, il y'a eu une alcalinisation du milieu

-La souche est citrate de Simmons négatif (-) : Pas de virage de l'indicateur de pH donc il n'y a pas eu une alcalinisation du milieu (pas de culture).

- **Production de la B-galactosidase (Disques ONPG)**

L'orthonitrophényl-B-D-galactopyranoside (ONPG) est un hétéroside dont l'aglycone est l'orthonitrophénol (composé soluble jaune) et l'ose est le galactose (Delarras, 2007). C'est un analogue structural du lactose, qui peut être clivé par des enzymes dites ONPG hydrolases qui correspondent :

-Soit à la β -galactosidase, ONPG-hydrolase qui catalyse la réaction d'hydrolyse de l'ONPG.

-Soit à d'autres enzymes bactériennes, désignées ONPG-hydrolase qui hydrolysent également l'ONPG, mais pas le lactose ; elles sont différentes de la β -galactosidase (Delarras, 2014).

Technique : Le test est pratiqué en réalisant une suspension dense de la bactérie testée dans de l'eau distillée puis à l'aide d'une pince flambée et refroidie, un disque imprégné d'ONPG est ajouté. Le tube est incubé à 37°C pendant 15 à 20 minutes.

Lecture :

-Le test est positif (ONPG+) : Présence d'une coloration jaune.

-Le test négatif (ONPG-) : Absence de coloration.

- **Milieu mannitol-mobilité**

Ce milieu permet de rechercher simultanément la mobilité, et l'utilisation du mannitol. Il convient plus particulièrement à l'étude des bacilles à Gram négatifs fermentatifs. Il s'agit d'un milieu semi-

solide contenant entre autres du mannitol, du rouge de phénol comme indicateur du pH. L'acidification du milieu est indiquée par le virage de l'indicateur du pH (rouge vers le jaune)(Denis et al., 2007).

Technique : le milieu est ensemencé par une piqure centrale à l'aide d'une pipette pasteur stérile chargée en suspension bactérienne déjà préparée, l'incubation se fait à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Lecture :

-La bactérie est de mannitol (+) : Virage de l'indicateur de pH du rouge en milieu basique au jaune en milieu acide (la bactérie fermente le mannitol).

- La bactérie est de mannitol (-) : pas de virage du pH, le milieu reste rouge (la bactérie ne fermente pas le mannitol).

- **Recherche de voie de fermentation du glucose**

Le milieu Clark et Lubs (milieu RM-VP) permet de rechercher les voies fermentaires du glucose et de différencier la fermentation des acides mixtes et la fermentation butanediolique. Deux tubes de ce milieu sont ensemencés puis incubés à 37°C pendant 24 heures.

- **Test du rouge de méthyle (test RM)**

C'est une réaction utilisée pour mettre en évidence la voie fermentative des acides mixtes. Après avoir ajouté quelques gouttes de réactif rouge de méthyle au premier tube de Clark et Lubs. Ces acides mixtes font virer le réactif au rouge (RM+) et dans le cas contraire, il vire au jaune (RM-).

- **Réaction de Voges-Proskauer (test VP)**

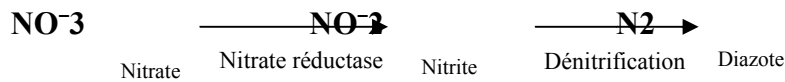
C'est une réaction utilisée pour mettre en évidence la voie fermentaire du butane 2-3 diol. Elle permet de mettre en évidence l'acétoïne ou (3 hydroxybutanone), car le butane 2-3 diol ne peut pas être mis en évidence facilement. Après avoir ajouté quelques gouttes de réactifs VPI et de VPII au deuxième tube de Clark et Lubs, mettre le tube dans une position inclinée. La lecture se fait après 5 minutes :

-Appariation d'un anneau rouge : VP (+).

-Absence d'un anneau rouge : VP (-).

- **Recherche de nitrate réductase**

Principe : Toutes les Entérobactériaceae possèdent une nitrate réductase à l'exception des souches mutantes. Cette enzyme est capable de réduire les nitrates en nitrites, décelable uniquement avec la réaction de Griess (Minor, 1993 ; Vandepitte et al., 1994). Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction, jusqu'à une dénitrification comme suit :



Lecture :

- Réaction de Griess positive (NR+) : coloration en rouge ou rose, suite à la combinaison de l'ion NO_2^- formé avec l'acide parasulfanilique et l' α -naphtylamine.
- Si la réaction est négative, ajouter une quantité de poudre de Zinc (réaction de Zobell), agiter et attendre 5 minutes : la coloration rouge, signifie qu'il y a réduction de NO_3^- en NO_2^- , donc la bactérie est (NR-). L'absence de coloration, indique l'absence de NO_3^- , ce qui veut dire que la réduction a dépassé le stade NO_2^- et que la bactérie est NR+ (Minor, 1993).

- **Recherche de décarboxylases**

La recherche des décarboxylases de l'ornithine, de la lysine, et de l'arginine forment trois tests biochimiques utiles dans le diagnostic différentiel des entérobactéries. Ces trois tests peuvent être réalisés sur les bouillons (LDC, ODC, ADH) qui sont appelés les milieux de Moëller et qui permettent de montrer la présence des décarboxylases et dihydrolases bactériennes par la mise en évidence de l'acidification du milieu et sa réalcalinisation (Lebres, 2002).

Technique : Une suspension bactérienne est préparée en eau physiologique stérile à partir d'une culture de la souche à étudier. Le test est réalisé dans 4 tubes différents :

- Le premier constitue le témoin.
- Les autres tubes contiennent l'un des trois acides aminés suivant : Arginine, Lysine ou Ornithine. Après ensemencement, quelques gouttes d'huile de vaseline sont ajoutées dans chaque tube et le tout sera incubé à 37 pendant 24h.

Lecture :

-La réaction est positive lorsque le témoin vire au jaune (acidification du milieu est due à l'utilisation du glucose). Les tubes contenant l'acide aminé restent violets (phénomène due à l'alcalinisation).

-La réaction est négative lorsque les tubes contenant l'acide aminé et le témoin virent au jaune (acidification).

- **Milieu urée-indole**

Appelé aussi milieu urée tryptophane. Ce milieu complexe fournit un ensemble de résultats utiles à l'identification de nombreux germes bactériens. C'est un milieu synthétique ; non nutritif permet à rechercher des trois activités enzymatiques.

- **Uréase**

L'urée est un composé organique qui peut servir de source d'azote unique aux bactéries possédant une uréase. En présence de cette enzyme, les bactéries uréolytiques peuvent décomposer l'urée en carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu, et qui fait virer l'indicateur coloré de pH (le rouge de phénol) du jaune au rouge en milieu basique (**Denis et al., 2007**).

Technique : La mise en évidence de l'uréase s'est faite en utilisant le milieu urée-indole. Ce dernier est inoculé avec quelques gouttes de la suspension bactérienne après l'avoir préparée dans de l'eau physiologique. Ensuite une incubation de 18 heures à 37°C.

Lecture : Coloration rouge de milieu traduit uréase positif.

- **Tryptophanase**

Après addition du réactif de Kovacs, le diméthyl-aminobenzaldhyde contenu dans le réactif de Kovacs réagit avec l'indole, produit l'activité de la tryptophanase et forme un composé coloré en rouge (**Abed et Essayed,2015**).

- **Tryptophane désaminase (Test TDA)**

Par contre certaines bactéries dégradent le tryptophane grâce à l'enzyme tryptophane désaminase (Test TDA) et ce dernier conduit à la désamination de cet acide aminé en produisant l'ammoniac et l'acide indole-3-pyruvique. Ce dernier est révélé par l'apparition d'une couleur brune en présence de perchlorure de fer.

- **Productions des pigments**

Des espèces des *Pseudomonas* produisent des pigments dont les deux principaux (pyocyanine et pyoverdine) peuvent être mis en évidence sur les géloses King A et King B. Le milieu est ensemencé par strie sur la pente, incubation à 37°C pendant 24h.

- **King A**

La gélose King A est utilisée pour la caractérisation des *Pseudomonas* par la mise en évidence de la production de pyocyanine. La production de pyocyanine se caractérise par une pigmentation bleue.

- **King B**

La gélose King B permet la production de fluorescéine (ou pyoverdine), pigment jaune-vert fluorescent sous lumière ultra-violette, par certains *Pseudomonas*.

- **Conservation des souches**

Les souches sont conservées dans des tubes de gélose nutritive inclinés à une température de 4°C (ces bactéries sont placées dans un état de vie ralentie ou momentanément suspendue donc dans des conditions peu favorables pour leur multiplication).

2.2.4. Mini galerie API 20E

Le système API 20 E est une version miniaturisée et standardisée des techniques conventionnelles pour l'identification des bactéries. La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratés (Figure 5 et 6, annexe 2). Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Arnaud, 2008).

- **Préparation de l'inoculum**

-Remplir les tubes à essai avec 5ml de l'eau physiologique stérile. Prélever une seule colonie bien isolée à l'aide de pipette pasteur. Utiliser des cultures jeunes (18-24h) puis réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu.

- **Préparation de la galerie**

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. La galerie est déposée dans la boîte d'incubation après l'inscription de la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.

- **Inoculation de la galerie**

-Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne.

-Remplir uniquement les tubes des autres tests.

-Créer une anaérobiose dans les tests : ADH. LDC. ODC. URE. H₂S en remplissant leurs cupules d'huile de vaseline stérile.

-Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures.

- **Lecture de la galerie**

Après incubation, lire les réactions conformément au tableau de lecture présenté dans le tableau 8, l'annexe 2, en ajoutant une goutte de chacun des réactifs suivants :

-Test IND; Kovacs.

-Test VP; VP1 et VP 2.

-Test NIT ; NIT₁ et NIT₂.

L'identification des bactéries est réalisée à l'aide du logiciel d'identification.

2.2.5. Antibiogramme

Principe : L'antibiogramme est réalisé par la méthode de diffusion en gélose (méthode des disques), selon le communiqué du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM, 2010), qui repose sur la connaissance du phénotype sauvage caractéristique de l'espèce et de différents phénotypes de résistance acquis. Ces dernières sont définies non seulement par des caractères de résistance en termes de catégories clinique ("I", "R", ou "S"), mais aussi en termes de diminution significative de sensibilité et par des images typiques (Synergie, Antagonisme).

Technique : La gélose Muller Hinton est coulée en boîtes sur une épaisseur de 4 mm et séchées avant l'emploi. A partir d'une culture pure de 18-24 h sur milieu gélosé Mueller-Hinton, une suspension en 5 ml de solution saline (0,9 % NaCl) a été préparée en équivalente au standard McFarlane 0,5 (~10⁸ UFC/ml). A partir de cette suspension bactérienne, une dilution au 1/10 dans l'eau physiologique (0,9 % NaCl) a été réalisée et bien homogénéisée ; puis ensemencée par écouvillonnage sur des boîtes de Pétri gélosées en Mueller-Hinton.

Application des disques d'ATB : Les disques d'antibiotiques correspondant ont été appliqués à l'aide d'un distributeur ou par une pince en appuyant légèrement ; puis incubés pendant 18-24h à 37°C ± 1°C.

Lecture :

Les diamètres d'inhibition sont mesurés et reportés sur une fiche d'antibiogramme de concordance pour les comparer aux diamètres critiques citées dans la standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (Tableaux 9, 10, 11 et 12 de l'annexe 2). Cela permet de classer les souches en sensible (S), intermédiaire (I) résistante (R) (Fauchere et al ; 1997 ; Dovillez, 2006 ; Diabate, 2007).

2.2.6. Recherche complémentaire

Pour certains antibiotiques ou familles d'antibiotiques, l'antibiogramme standard n'est pas suffisant et des tests complémentaires doivent être pratiqués avant une interprétation définitive.

2.2.6.1 Recherche des Staphylocoques Methicillino-Résistantes (MRSA)

En pratique, pour une meilleure détection de la résistance, les disques d'oxacilline (1µg) et de Céfoxitine (30µg) doivent être testés simultanément au niveau de l'antibiogramme standard de *Staphylococcus aureus*.

Après avoir lu le diamètre des zones d'inhibitions des antibiotiques ; les souches qui présentent un diamètre d'inhibition de Céfoxitine ≤ 21 mm et sont-elles mêmes résistantes à l'oxacilline (diamètre ≤ 12 mm) elles sont qualifiées comme des *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline (MRSA) et lorsque le diamètre de zone d'inhibition de Céfoxitine est ≥ 22 mm et les souches elles-mêmes ne sont pas résistantes à l'oxacilline (diamètre ≥ 13 mm) ces souches sont dites des (MSSA) (Tableau 13).

Tableau 13: Recherche de la résistance à l'oxacilline (méthode de diffusion de disque)

	Oxacilline (1µg)	Céfoxitine (30µg)	Interprétation
<i>S. aureus</i>	≥ 13 mm	≥ 22 mm	Souche OXA S
	≤ 12 mm	≤ 21 mm	Souche OXA R

2.2.6.2 Test de screening à l'oxacilline pour *Staphylococcus aureus*

Devant tout problème d'interprétation du diamètre d'inhibition de la Céfoxitine faire un Screening test. Ce test concerne uniquement *Staphylococcus aureus* (Ammari, 2011).

Le milieu utilisé pour ce test est la gélose Mueller Hinton additionnée de 4% de NaCl, et de 6µg/ml d'oxacilline. La préparation de la solution d'oxacilline se fait de la manière suivante (Tableau 14).

Technique : Diluer 6mg d'oxacilline (poudre injectable d'un flacon de 1g) dans 10ml d'eau distillée stérile, puis faire une dilution au dixième. Répartir la solution obtenue à raison de 2ml par tube ; ainsi conditionnées ces solutions peuvent être conservées à -20°C pendant une semaine, au bout de laquelle elles doivent être renouvelées. Mettre 2ml de cette solution dans une boîte de 90 mm de diamètre et ajouter 18ml de gélose Mueller Hinton additionnée de 4% de NaCl. Mélanger en faisant des mouvements rotatoires (Ammari, 2011).

Inoculum :

- A partir d'une culture pure de 24h sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 MacFarland, ou à une DO de 0,08 à 0,10 lue à 625nm.
- L'ensemencement se fait par spots, en appliquant verticalement sur la gélose l'extrémité d'un écouvillon trempé dans la suspension bactérienne.
- Les souches de références doivent être testées dans les mêmes conditions. Incuber 24h à 37°C.

Lecture : La culture de plus d'une colonie de la souche test, suffit pour indiquer une résistance à l'oxacilline, impliquant une résistance à toutes les β-lactamines.

Tableau 14 : Technique du screening test et interprétation des résultats (Ammari, 2011).

	Technique	Inoculum	Milieu	T° incubation	Durée incubation	Interprétation
Screening test Oxa	Dilution en milieu gélosé : 6mg/L	0,5 McFarland	MH+ 4% NaCl	33-35°C	24 h	<i>S. aureus</i> >1 colonie = Résistante

2.2.6.3. Recherche de β-lactamase à spectre élargi

Les BLSE désignent des enzymes « β -lactamases » produites par les entérobactéries. *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter spp* entraînant une diminution de l'activité des Céphalosporines de 3ème génération (C3G) (cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime) et des monobactames (aztréonam). En effet ces BLSE peuvent être mises en évidence par un test de synergie et un test de confirmation (test du double disque).

- **Méthodes de détection de la BLSE**

Afin d'améliorer la sensibilité de la détection de BLSE, il est conseillé d'utiliser une combinaison d'au moins deux céphalosporines « indicateur » (**Livermore et al.,2001 ;Pfaller et al., 2006**).

Les agents antimicrobiens les plus souvent utilisés comme indicateurs dans les tests de dépistage sont la ceftazidime, la céfotaxime ou la ceftriaxone et l'aztreonam. Pour la détection de BLSE, il est dans tous le cas fortement recommandé d'utiliser une combinaison de deux méthodes :

1. Test de synergie

C'est un test de dépistage basé sur la détection à la résistance ou la diminution de sensibilité dans les conditions standards de l'antibiogramme. Puisqu' aucune céphalosporine « indicateur » n'est en mesure de détecter seule tous les types de BLSE, il est recommandé de tester plusieurs (au moins deux) céphalosporines en première intention.

Technique : Déposer un disque d'amoxicilline+acide clavulanique (AMC 20/10pg) à 30 mm centre à centre des disques de C3G [la ceftazidime (CAZ 30 μ g), la céfotaxime (CTX 30 μ g), ou la ceftriaxone (CRO 30 μ g), et l'aztréonam]. L'incubation se fait à 18h à 35°C (Figure7).

Lecture : La production d'enzyme peut se traduit par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques : AMC et CTX, AMC et CAZ en fin AMC et ATM.

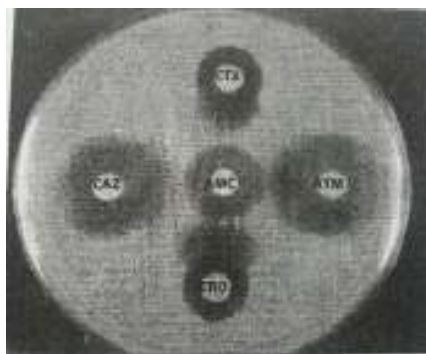


Figure 7 : Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie (**Ammari,2011**).

2. Test de confirmation ou technique du double disque

Ce deuxième test est basé sur la synergie entre une céphalosporine (la céfotaxime ou la ceftazidime) et un inhibiteur de β -lactamases (AMC) sera ensuite réalisé.

Technique :

- Déposer un disque d'AMC et un disque de C3G (CTX ou CRO) à une distance de 30mm (centre à centre).
- Laisser diffuser les antibiotiques pendant une heure, à la température ambiante, la boîte sera déposée couvercle vers le haut.
- Après 1H d'incubation, ôter les disques d'AMC et le remplacer par un disque de CTX ou CRO et incuber la boîte pendant 18h à 35°C.

Lecture : le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition autour C3G, appliqué après diffusion du disque AMC est ≥ 5 mm par rapport au diamètre d'inhibition autour du disque C3G, comme la figure 8 l'indique.

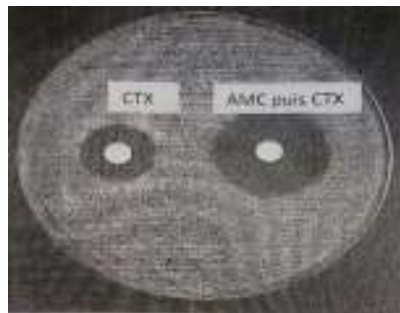


Figure 8 : Test du double disque positif (Ammari, 2011)

2.3. Etude de l'activité antibactérienne du chitosane

a) Préparation des solutions de chitosane

Nous avons étudié les propriétés antibactériennes de la poudre de chitosane dissoute dans l'acide acétique de 0,1M avec un pH = 3,2 dilué dans l'eau distillée de 100 ml. En fonction de deux volumes ($V_1 = 20$ ml et $V_2 = 100$ ml), nous avons préparé 03 concentrations différentes du biopolymère ($C_1 = 0,25$ g/ml, $C_2 = 1$ g/ml et $C_3 = 1,75$ g/ml), qui sont par la suite homogénéisées à l'aide d'un agitateur pendant 24h à une température ambiante (Figure 9).

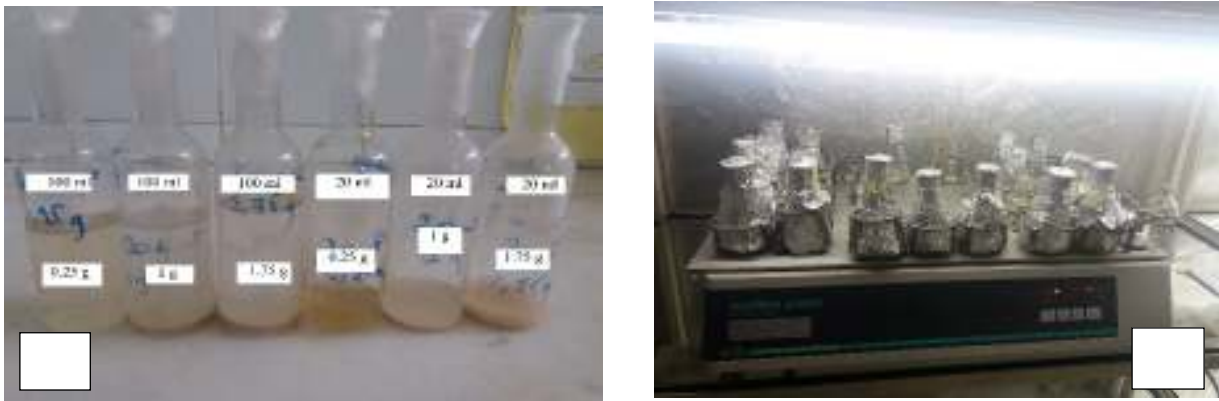


Figure 9 :(A) Préparation des 03 concentrations du chitosane à 2 volumes (V_1 et V_2),(B) Homogénéisation des concentrations du chitosane par l'agitateur.

b) Etude de l'effet antibactérien du chitosane par méthode de disque

C'est la méthode adoptée dans notre travail, elle est utilisée par plusieurs auteurs (**Benjlali et al.,1986 ; Satrani et al.,2007**).C'est une technique qualitative permettant de déterminer la sensibilité des micro-organismes vis-à-vis d'une substance réputée antimicrobienne. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire du chitosane à l'intérieur d'une boîte de Pétri, dans un milieu nutritif solide (Mueller Hinton).

L'ensemencement de l'inoculum de 1ml est réalisé en surface du milieu Mueller Hinton préalablement coulé dans des boîtes de Pétri. Des disques stériles (9mm de diamètre papier Wattman) imprégnés d'une quantité de chitosane à l'état pur ($5 \mu\text{l}$) sont déposés au centre des boîtes. Celles-ci sont ensuite fermées et laissées diffuser pendant 20 mn puis incubées à 37°C pendant 24h. Après incubation, l'absence de croissance bactérienne exprimant une activité antimicrobienne qui se traduit par un halo translucide autour du disque, de même couleur que la gélose stérile et dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (\emptyset exprimé en mm) (**Markin, 2003 ; Pibiri, 2006**).

La sensibilité des différentes souches vis-à-vis du chitosane étudiées est classée selon le diamètre d'inhibition selon les critères suivants : $\emptyset < 8 \text{ mm}$: bactérie non sensible ; $9 < \emptyset < 14 \text{ mm}$: bactérie sensible ; $15 < \emptyset < 19 \text{ mm}$: bactérie très sensible et $\emptyset > 20 \text{ mm}$: bactérie extrêmement sensible. Un traitement avec l'eau est utilisé comme témoin négatif (**PONCE et al., 2003**).

Les infections du pied diabétique restent une complication redoutable du diabète. Elles constituent la principale cause d'hospitalisation des diabétiques et l'une des causes majeures d'amputation des membres inférieurs.

Les résultats obtenus durant notre étude montrent que les infections du pied diabétique sont dominées par les bacilles à Gram négatif majoritairement par la famille des entérobactéries et l'espèce la plus fréquemment isolée est *Staphylococcus aureus*. L'étude d'antibiogramme a montré que les bactéries isolées du pied diabétique et identifiées sont d'une très forte résistance aux antibiotiques d'où nous avons isolé 9 bactéries multirésistantes comprenant les *Proteus mirabilis*, *Proteus penneri*, *Acinetobacter baumannii*, et les *Staphylococcus aureus*.

Dans la présente étude, le chitosane a prouvé son efficacité sur les bactéries multirésistantes testées qui font partie notamment aux bactéries Grams positifs et Grams négatifs, d'où nous avons enregistré des diamètres de zone d'inhibition qui diffère d'une espèce à une autre, notant que l'activité du chitosane devient plus importante avec l'augmentation de la concentration et dans les faibles volumes. Les résultats montrent que les souches les plus sensibles au chitosane sont : *Staphylococcus aureus* 3 avec un diamètre de zone d'inhibition (DZI) allant de 36-40 mm dans le $V_1 = 20$ ml et de 23-24 mm dans le $V_2 = 100$ ml, suivi par *Proteus mirabilis* 1 qui présente un DZI de 27-33 mm dans le volume $V_1 = 20$ ml, cependant dans le $V_2 = 100$ ml, le diamètre va du 23-30 mm.

Comme perspective davantage de recherche sera nécessaire, nous rapportons à produire des pansements et des gels à base de chitosane et à évaluer leur effet en tant qu'antibactérien vis-à-vis des germes du pied diabétique aussi son rôle dans la microcirculation et la formation de la matrice extracellulaire et évaluer l'effet direct sur le processus curatif. Ces investigations requerront une étude formellement prévue avec un plus long suivi dans des sujets diabétiques, ce qui pourra être une bonne alternative thérapeutique pour la gestion du traitement des plaies chroniques du pied diabétique.

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE SAAD

DAHLAB BLIDA-1-



FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

LABORATOIRE DE RECHERCHE : BIOTECHNOLOGIES, ENVIRONNEMENT ET
SANTÉ

Mémoire de Projet de fin d'étude en vue de l'obtention du Master

Option : Microbiologie

Thème :

**PROFIL DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES ET AU
CHITOSANE DES BACTERIES MULTIRESISTANTES ISOLEES
DU PIED DIABETIQUE**

Présenté par :

- Melle Hedjazi Meriem
- Melle Khodja Zakia

Date de soutenance : 01/07/2018

Jury :

- | | | |
|------------------------------------|-----|--------------|
| - M ^{me} EDDAIKRA A. | MAA | Président |
| - M ^{me} DEBIB A. | MCB | Examineur |
| - M ^{me} BOUDJEMA N. | MCB | Promoteur |
| - M ^{me} LARIBI-HABCHI H. | MCA | Co-promoteur |

Année universitaire 2017_2018

Conclusion

Chapitre 1.

Partie bibliographique

Chapitre II.

Matériel et méthodes

Chapitre III.

Résultats et discussion

Introduction

Annexes