

République Algérienne Démocratique et Populaire.  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.  
Université Saad Dahleb  
Faculté des sciences de la nature et de la vie.  
Département de biologie et de physiologie cellulaire



## Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master

En sciences biologiques

Option : Microbiologie –Bactériologie

## Thème

Isolement et caractérisation des bactéries à partir du pied diabétique et leur  
profil de résistance vis-à-vis des antibiotiques et du chitosane

Présenté par :

Tali Soumia

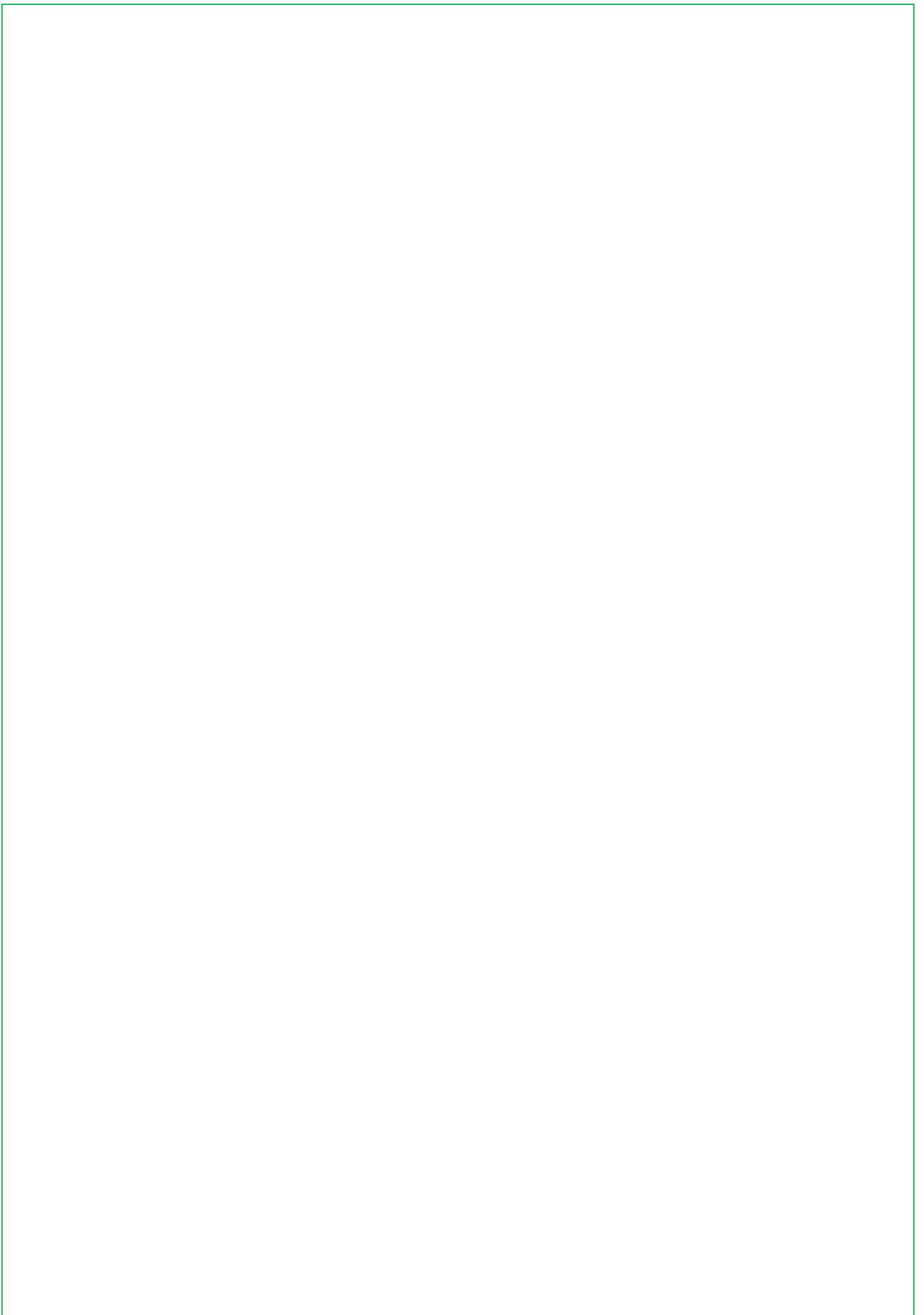
Selmi Yasmina

Date de soutenance :21 -09-2017.

Devant le jury composé de :

Mr Guedioura. A.	M.A.A	USDB 1	Président.
Mme Meklat. A.	M.C.A	USDB 1	Examinatrice.
Mme Boudjema. N.	M.C.B	USDB 1	Promotrice.

Promotion 2016/2017



## *Remerciements*

*Dans le cadre de la réalisation de ce mémoire de fin d'étude nous remercions Tout d'abord Dieu, le tout puissant et Miséricordieux, pour nous avoir donné la force, le courage et surtout la patience pour bien accomplir ce travail.*

*Nos profonds remerciements sont adressés à notre promotrice Mme Boudjema. N. Pour avoir été disponible toute au long de la réalisation de ce mémoire, pour son aide, son soutien, son orientation et ses conseils.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à Mr Guedioura. A. de nous avoir fait l'honneur de présider le jury examinant ce travail.*

*Nous tenons à adresser nos vifs remerciements à Mme Meklat. A. pour l'honneur d'examiner ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent également à tous les enseignants et les professeurs du département de biologie de l'université de Blida 1. Pour leurs efforts fournis durant toute la période d'étude ainsi qu'à tous ceux qui ont collaboré d'une façon ou d'une autre à notre formation.*

*Nous remercions infiniment Mr Tafahi Djamel pour son accueil, sa disponibilité, son aide dans la réalisation de ce travail, pour tous le temps qui il a consacré pour nous orienter sur les grands titres de notre stage ainsi nous avons eu la chance et le plaisir de travailler en collaboration avec Mme Laaribi, Docteur Lassas et Docteur Zian et acquérir de leurs expériences.*

*Notre profonde reconnaissance à l'équipe du laboratoire d'analyses médicales et à l'ensemble du personnel de l'EPH de Boufarik.*

*Ainsi la réussite de notre stage repose sur l'aide du personnel de l'EPH et la bienveillance de Aami Rabah au niveau de l'unité des soins du pied diabétique de Boufarik toutes en les remercions.*

*Nous remercions aussi tout ce qui ont contribué de près au de loin à l'élaboration de ce travail.*

## ***Dédicaces***

*C'est avec une profonde gratitude que je dédie ce modeste travail réalisé grâce au Dieu :*

*À celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse de courage de responsabilité et d'amour, votre prière, votre bénédiction, et votre patience qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite. Que dieux te garde, te comble de santé, et te donne longue vie ma douce maman HOURIA*

*A mon père MOUHAMED qui ma donnée toujours le courage, l'espoir et la chance d'atteindre mes butes, qui ma toujours et d'un grand secours par son soutien et son encouragement pendant les moments difficiles*

*A mon très cher marie MOUHAMED AMINE, pour son soutien, ses conseils, sa patience et sa confiance. Avec tout mon amour, merci pour tout*

*A mes très chère sœurs LAMIA et HANANE que j'aime, Je souhaite simplement que Dieu nous accorde une longue vie et une bonne santé pour que nous puissions cheminer ensemble sur la route du destin avec amour, honnêteté, sincérité, respect mutuel, solidarité, dignité comme nous l'ont enseigné nos parents.*

*A mes nièces MAROUA et SAFAA, votre innocence et gaieté mon donner une bouffé d'énergie. Que Dieu fasse que vous suiviez mes traces et que vous fassiez plus que moi. Je vous aime*

*A Ma chère amie intime et binôme SOUMIA qui m'a toujours aidé et encouragé et qui m'a accompagné durant tout ces années.*

*À tous mes professeurs: Leur générosité et leur soutien m'oblige de leurs témoigner mon profond respect et ma loyale considération.*

*À tous mes amis et mes collègues : Ils vont trouver ici le témoignage d'une fidélité et d'une amitié infinie.*



**YASMINE**





## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*L'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir à toi mon père.*

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.*

*C'est avec beaucoup d'affection et de respect que je vous écris ces quelques mots, tout en sachant que jamais je ne pourrai vous remercier assez pour tout ce que vous avez sacrifié pour moi. Puisse Dieu, le tout puissant, vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.*

*A mes très chères sœurs*

*Nour El Houda et Faiza qui allument ma vie ; les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.*

*A mon beau frère*

*Aissa vous étiez toujours présent pour les bons conseils. Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours. Je vous remercie profondément.*

*A ma nièce Mirale et mon neveu Mohammed charaf el din*

*A Ma très chère amie et binôme Yasmina*

*Qui m'a encouragé et accompagné durant tout ces années. Merci beaucoup Yasmina, je te souhaite beaucoup de bonheur et de réussite.*

*A Mes chères tantes et mes chers oncles.*

*A Mes chères cousines et mes chers cousins.*

*A Mes chères amies et mes chers amis.*

***Soumia***



## ***Résumé***

La présente étude a pour objectif d'évaluer la fréquence des bactéries responsables de l'infection du pied diabétique et d'apprécier leurs sensibilités aux antibiotiques et au chitosane. Un totale de 70 prélèvements des patients diabétiques hospitalisés et externes ont été prélevés.

Les résultats obtenus ont montré une prédominance masculine de 78,58% contre 34,28% qui représente les femmes. Les personnes les plus atteints par le pied diabétique sont hospitalisées et appartiennent à la tranche d'âge de 45-65 ans et au diabète de type II. Parmi les 64 cultures positives, 45 sont polybactériennes et 19 monobactériennes. Sur 105 germes isolés, les entérobactéries occupent le premier rang (57,16%), en second les *Staphylococcus aureus* (21,90%) suivi par les *Streptococcus* (13,33%) et en dernier les *Pseudomonas* (7,61%).

L'étude de l'antibiogramme a révélé une augmentation de la résistance de l'ensemble des entérobactéries et des souches de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques notamment à ceux de la famille des  $\beta$ -lactamines.

Face à l'ampleur de cette antibiorésistance des germes responsables de l'infection du pied diabétique, l'utilisation du chitosane comme un traitement alternatif sur les bactéries isolées a montré son efficacité. Ce biopolymère a marqué un bon effet antibactérien envers la plupart des souches testées avec la méthode de diffusion par puits par apport à celle de la diffusion par disque. *Staphylococcus aureus* a exprimé la meilleure sensibilité par la méthode de diffusion par puits avec un DZI de 64mm alors qu'un DZI de 18mm a été noté avec celle de la diffusion par disque. Cependant la résistance a été marquée uniquement avec *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter sakazakii*.

**Mots clés :** Activité antibactérienne, Antibiorésistance, Chitosane, Infection bactérienne, Pied diabétique.

## ***Abstract***

The aim of this study is to assess the frequency of bacteria responsible for diabetic foot infection and to assess their susceptibility to antibiotics and chitosan. A total of 70 samples of inpatient and outpatient diabetic patients.

The results showed a male predominance of 78.58% whereas a frequency of 34.28% represents the women. The people most affected by the diabetic foot are hospitalized and belong to the age group of 45-65 years and type II diabetes. Of the 64 positive cultures, 45 are polybacterial and 19 are monobacterial. *Staphylococcus aureus* (21.90%) followed by *Streptococcus* (13.33%) and lastly the *Pseudomonas* (7,61%).

The study of the antibiogram revealed an increase in the resistance of all enterobacteria and strains of *Staphylococcus aureus* and of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics in particular to those of the  $\beta$ -lactam family.

In view of the magnitude of this antibiotic resistance of the germs responsible for the diabetic foot infection, the use of chitosan as an alternative treatment on the isolated bacteria has proved its effectiveness. This biopolymer exhibited a good antibacterial effect on most of the strains tested with the well diffusion method in comparison with that of the disk diffusion of which *Staphylococcus aureus* expressed the best sensitivity by the diffusion method per well with a DZI of 64 mm while a DZI of 18mm was noted with that of the diffusion per disc. However, resistance was marked only with *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter sakazakii*.

**Key words:** Bacterial infection, Diabetic foot, Antibiotic resistance, Chitosan.

## ملخص

الهدف من دراستنا هو تقييم وتيرة البكتيريا المسؤولة عن عدوى القدم السكري وتقييم قابليتها للمضادات الحيوية و الكيتوزان. تم جمع 70 عينة قيح أخذت من أرجل مرضى السكري المتواجدين في مصلحة مرضى السكري وخارجها بينت النتائج المتحصل عليها خلال دراستنا أن أغلبية المصابين هم من فئة الذكور بنسبة 78.58% في حين أن نسبة 34.28% مثلت النساء لاحظنا أن الأشخاص المسعفين هم الأكثر تضررا من القدم السكري ينتمون إلى الفئة العمرية 65-45 سنة ويحملون النوع 2 من السكري . من بين 64 عينة ايجابية 45عينة كانت أحادية البكتيريا و 19 عينة كانت متعددة البكتيريا من مجموع 105 بكتيريا معزولة احتلت العصيات ذات الغرام السالب المرتبة الأولى بنسبة (57.16%) تليها *Staphylococcus aureus* متبوعة ب بنسبة 21,90% تليها

(13,33%) *Streptococcus* واخيرا (*Pseudomonas*) بنسبة 7,61%

أظهرت دراسة المضاد الحيوي زيادة في مقاومة كل من إنتيروباكتيريا وسلالات المكورات العنقودية الذهبية و بسيودوميناس إروجينوسا للمضادات الحيوية وخاصة لتلك التي من عائلة  $\beta$  لاكتام .

وبالنظر إلى حجم هذه المقاومة للمضادات الحيوية للجراثيم المسؤولة عن عدوى القدم السكري، فإن استخدام الكيتوزان كعلاج بديل للبكتيريا المعزولة أثبت فعاليته. أظهر هذا البوليمر الحيوي تأثير جيد كمضاد للجراثيم على معظم السلالات المختبرة بواسطة تقنية النشر لكل بئر بالمقارنة مع تقنية الانتشار بالقرص.

أعربت المكورات العنقودية أفضل حساسية عن طريق طريقة النشر لكل بئر مع قطر منطقة تثبيط 64 ملم في حين لوحظ ان قطر منطقة تثبيط يساوي 18ملم بواسطة تقنية الانتشار من القرص . إضافة إلى انه ، تم وضع علامة على المقاومة فقط مع بسيودوموناس أيروجينوسا و إنتيروباكتير ساكازاكي .

**الكلمات المفتاحية:** العدوى البكتيرية، القدم السكري، مقاومة المضادات الحيوية، الكيتوزان

## *Glossaire*

**Amputation :** Un geste chirurgical signifie la résection d'un segment de membre passant au travers d'un os.

**Artériopathie :** Pathologie due à une atteinte artérielle touchant les membres inférieurs et aboutissant à une diminution voire à un arrêt de la circulation dans les artères concernées.

**Athérosclérose :** C'est une maladie artérielle chronique caractérisée par des dépôts de lipides dans les artères en rapport avec un taux de cholestérol trop élevé dans le sang provoquant un épaissement de la paroi artérielle.

**Coronaropathie :** Affection des artères qui vascularisent le cœur, elle entraîne une insuffisance du sang nommée ischémie myocardique.

**Claudiction :** Douleur du pied, de la cuisse ou du mollet survenant à la marche et soulagée par le repos, due à l'artériopathie.

**Erythème:** Décoloration rouge ou rosée qui blanchit plus ou moins à la compression.

**Gangrène :** Nécrose de la peau et des structures sous-jacentes avec destruction irréversible résultant d'un arrêt de la circulation sanguine au niveau d'un tissu.

**Hyperkératose :** Affection de la peau qui se révèle par un épaissement de la couche superficielle de l'épiderme.

**Hypoxie :** C'est une diminution de la quantité d'oxygène apportée aux organes par le sang.

**Insulinodépendant :** Qualifie une forme de diabète qui ne peut être réduite que par l'administration d'insuline, l'insulinodépendance caractérise un diabète nécessitant un traitement à l'insuline.

**Ischémie :** Arrêt ou insuffisance de la circulation sanguine dans une partie du corps ou un organe, qui prive les cellules d'apport d'oxygène et entraîne leur nécrose.

**Macro angiopathie :** Est l'atteinte des artères de moyen et gros calibre.

**Micro angiopathie :** Est l'atteinte des petits vaisseaux sanguins (artérioles, capillaires).

**Nécrose** : Correspond à la mort anormale et non programmée d'une cellule ou d'un tissu.

**Néphropathie diabétique** : Est l'atteinte des petits vaisseaux des reins qui participent à leur fonctionnement, entraînant à terme une insuffisance rénale et une dialyse.

**Neuropathie** : L'atteinte du système neurologique, affecte le fonctionnement du système nerveux périphérique et du système nerveux autonome ; elle est responsable de douleurs, de troubles sensitifs ou de mal perforant plantaire.

**Phlegmon** : Est une inflammation grave, due à des bactéries, de tissu conjonctif, avec formation de pus, celui-ci se diffuse ne créant donc pas d'abcès, lequel peut néanmoins apparaître ensuite.

**Plaie chronique** : Est une plaie dont le délai de cicatrisation est allongé. Une plaie est considérée comme chronique après 4 à 6 semaines d'évolution, selon son étiologie.

**Polynévrite** : Est l'atteinte du système nerveux entraînant une dégradation de la myéline (substance grasse formant la gaine des cellules nerveuses : neurones) du système nerveux périphérique.

**Rétinopathie diabétique** : Est l'atteinte de la rétine, fine membrane essentielle à la vue qui recouvre la partie arrière de l'œil, cette atteinte peut entraîner à terme une baisse de la vue.

**Sepsis** : Terme remplaçant septicémie est défini comme l'ensemble des symptômes générés par l'organisme en réponse à une inflammation systémique. Après une infection, la propagation de celle-ci se fait par voie sanguine et un ensemble de signes cliniques en découlent.

**Ulcération** : la perte localisée de substance des couches superficielles de la peau, ou des muqueuses particulièrement difficiles à cicatriser.

## *Liste des abréviations*

ADH : Arginine dihydrolase.  
ADN : Acide désoxy-ribo-nucléique.  
API : Analytical profil index.  
ATB : Antibiotique.  
ATCC : American type culture collection.  
BGN : Bacilles à gram négatif.  
BGT : Bouillon glucosé tamponné.  
BHIB : Bouillon cœur cerveau.  
BLSE :  $\beta$  lactamase à spectre élargi.  
BMR : Bactéries multirésistantes.  
CHU : Centre hospitalier universitaire.  
CGP : Cocci à Gram Positif.  
CIT : Citrate perméase.  
CMI : Concentration minimale inhibitrice.  
DDA : Degré de désacétylation.  
DHB : Dermo-hypodermite bactérienne.  
DHBN : Dermo-hypodermite bactérienne nécrosante.  
DID : Diabète insulino-dépendant.  
DNID : Diabète non insulino-dépendant.  
DO : Densité optique.  
DZI : Diamètre de la zone d inhibition.  
EPH : Etablissement public hospitalier.  
FN : Faciite nécrosante.  
GLU : Glucose.  
GN : Gélose nutritive.  
GSC : Gélose au sang cuit.  
GSF : Gélose au sang frais.  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'Hydrogène.  
H<sub>2</sub>S : Hydrogène Sulfuré.  
HGPO : Hyperglycémie Provoquée par Voie Orale.  
LDC : Lysine décarboxylase.

MAN: Mannitol.  
Mel: Melibiose.  
MH: Muller hinton.  
MRSA : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.  
MSSA : Methicillin-sensible *Staphylococcus aureus*.  
N<sub>2</sub> : Azote.  
NA Cl : Chlorure de sodium.  
NO<sub>2</sub> : Nitrites.  
NO<sub>3</sub> : Nitrates.  
ODC : Ornithine décarboxylase.  
OMS : Organisation mondiale de la santé.  
ONPG: Ortho-nitro-phenyl-galactosidase.  
PLP : Proteine liant les pénicillines.  
PM : Poids Moléculaire.  
RHA : Rhamnose.  
RM : Rouge de méthyle.  
SAC : Saccharose.  
SOR : Sorbitol.  
TDA : Tryptophane désaminase.  
TSI : Triple Sugar Iron.  
URE : Uréase.  
USB : Unité de soin Boufarik.  
VP : Réaction de Voges-Proskauer.

## Liste de Figure

<b>Figure 1 :</b> Diagnostic biologique du diabète sucré.....	2.
<b>Figure 2 :</b> Structure chimique de la chitine et du chitosane.....	14.
<b>Figure 3 :</b> Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie .....	34.
<b>Figure 4 :</b> Schéma de détection de BLSE par le test du double disque .....	35.
<b>Figure 5 :</b> Etapes de préparation de la chitine et du chitosane.....	37.
<b>Figure 6 :</b> Répartition des patients en fonction du sexe.....	40.
<b>Figure 7:</b> Répartition des patients en fonction de l'âge.....	41.
<b>Figure 8 :</b> Répartition des patients en fonction du sexe et d'âge.....	41.
<b>Figure 9:</b> Répartition des patients en fonction du type du diabète.....	42.
<b>Figure 10:</b> Répartition des patients selon hospitalisation et non hospitalisation.....	42.
<b>Figure 11:</b> Répartition des prélèvements positifs et négatifs.....	43.
<b>Figure 12:</b> Répartition des prélèvements selon la nature des cultures obtenues.....	44.
<b>Figure 13:</b> Répartition des résultats selon les groupes de germes identifiés.....	44.
<b>Figure 14:</b> Répartition des résultats selon les germes identifiés.....	45.
<b>Figure 15:</b> Répartition globale des différentes espèces isolées.....	46.
<b>Figure 16 :</b> Répartition des résultats de l'antibiorésistance chez les Entérobactéries.....	47.
<b>Figure 17:</b> Répartition des résultats de l'antibiorésistance chez les souches de <i>Proteus mirabilis</i> .....	48
.	
<b>Figure 18:</b> Répartition des résultats de l'antibiorésistance des souches d' <i>Escherichia coli</i> .....	49.
<b>Figure 19:</b> Répartition des résultats de l'antibiorésistance des souches de <i>Morganella morgannii</i> .....	50.
<b>Figure 20:</b> Répartition des résultats de l'antibiorésistance chez les souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	51.

<b>Figure 21:</b> Répartition des résultats de l'antibiorésistance chez les souches de <i>Streptococcus</i> .....	52.
<b>Figure 22:</b> Répartition des résultats de l'antibiorésistance chez les souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	53.
<b>Figure 23:</b> Répartition des résultats de l'antibiorésistance chez les souches des <i>Staphylococcus aureus</i> .....	54.
<b>Figure 24:</b> Répartition des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> selon la résistance à la méhticilline (MRSA).....	54.
<b>Figure 25:</b> Activité antibactérienne du chitosane sur les différentes souches isolées du pied diabétique avec les concentrations C1, C2 et C3 respectivement dans V1 par la méthode de diffusion par puits.....	58.
<b>Figure 26:</b> Activité antibactérienne du chitosane sur les différentes souches isolées du pied diabétique avec les concentrations C1, C2, C3 respectivement dans V2 par la méthode de diffusion par puits .....	60.
<b>Figure 27:</b> La moyenne de diamètre de zone d'inhibition mesurée en fonction de concentrations du chitosane testée chez certaines bactéries à Gram- et les bactéries à Gram+.....	62.
<b>Figure 28 :</b> Fiche de renseignement.....	Annexe II.
<b>Figure 29 :</b> Diagramme de l'examen cyto bactériologique de pus .....	Annexe II.
<b>Figure 30 :</b> Appareillage, verreries, réactifs et solutions.....	Annexe II.
<b>Figure 31 :</b> Les principaux milieux de culture utilisés .....	Annexe II.
<b>Figure 32:</b> Activité antibactérienne du chitosane sur les souches isolées du pied diabétique par la méthode de diffusion par disque.....	Annexe III.



## Liste des tableaux

- Tableau 1 :** Domaines d'application du chitosane.....15.
- Tableau 2 :** Echantonnage de pus de pied diabétiques dans les hôpitaux et l'unité de soins.....18.
- Tableau 3 :** Effet antibactérien du Chitosane sur les différentes souches isolées du pied diabétique par la méthode de diffusion par puits.....56.
- Tableau 4 :** Activité antibactérienne du chitosane sur les souches isolées du pied diabétique par la méthode de diffusion par disque.....61.
- Tableau 5 :** Classification des lésions du pied en grades de gravité (d'après Wagner).....Annexe I.
- Tableau 6:** Classification des stades de gravité du pied diabétique selon le Consensus International sur le Pied Diabétique.....Annexe I.
- Tableau 7 :** Classification de la sévérité de l'infection selon le consensus Internationale de travail sur le pied diabétique.....Annexe I.
- Tableau 8 :** Gradation du risque d'ulcération des pieds chez le diabétique selon le Groupe international de travail sur le pied diabétique.....Annexe I.
- Tableau 9 :** Corrélation clinico-biologique entre les types de plaies et les germes impliqués et identifiés.....Annexe I.
- Tableau 10 :** Principales familles d'antibiotiques et leur mode d'action.....Annexe I.
- Tableau 11 :** Tableau de la lecture de la galerie miniaturisée Api20E.....Annexe II.
- Tableau 12 :** Liste des antibiotiques utilise au cours de notre stage .....Annexe II.
- Tableau 13 :** Valeur critique des diamètres des zones d'inhibition et des CMI Pour Les Entérobactéries.....Annexe II.
- Tableau 14 :** Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI Pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter sp*.....Annexe II.
- Tableau 15 :** Valeur critique des diamètres des zones d'inhibition et des CMI Pour *Staphylococcus sp* .....Annexe II.
- Tableau 16 :** Répartition des patients selon le sexe.....Annexe III.

<b>Tableau 17</b> : Répartition des patients selon les tranches d âge.....	Annexe III.
<b>Tableau 18</b> : Répartition des patients selon le sexe et l'âge.....	Annexe III.
<b>Tableau 19</b> : Répartition des prélèvements selon le type de diabète .....	Annexe III.
<b>Tableau 20</b> : Répartition des prélèvements selon les patients hospitalisation et Non hospitalisation.....	Annexe III.
<b>Tableau 21</b> : Répartition des résultats selon la positivité et la négativité des Prélèvements De pus.....	Annexe III.
<b>Tableau 22</b> : Répartition des prélèvements selon la nature des cultures obtenus.	Annexe III.
<b>Tableau 23</b> : Répartition des résultats selon le Groupes de germes Identifiés.....	Annexe III.
<b>Tableau 24</b> : Répartition des germes identifiés .....	Annexe III.
<b>Tableau 25</b> : Répartition globale des espèces identifiées.....	Annexe III.
<b>Tableau 26</b> : Profil de l'antibiorésistance chez les Entérobactéries .....	Annexe III.
<b>Tableau 27</b> : Profil de l'antibiorésistance chez les souches de <i>Proteus mirabilis</i> .....	Annexe III.
<b>Tableau 28</b> : Profil résultats de l'antibiorésistance chez les souches <i>Escherichia coli</i> .....	Annexe III.
<b>Tableau 29</b> : Profil de l'antibiorésistance chez les souches de <i>Morganella morganii</i> .....	Annexe III.
<b>Tableau 30</b> : Profil l'antibiorésistance chez les souches de <i>Klebsiella Pneumoniae</i> .....	Annexe III.
<b>Tableau 31</b> : Profil de l'antibiorésistance chez les souches des <i>Streptococcus</i> .....	Annexe III.
<b>Tableau 32</b> : Profil de l'antibiorésistance chez les souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	Annexe III.
<b>Tableau 33</b> : Profil de l'antibiorésistance chez les souches des <i>Staphylococcus aureus</i> .....	Annexe III.

**Tableau 34 :** Répartition des souches de *Staphylococcus aureus* selon la résistance à la méricilline (MRSA).....Annexe III

**Tableau 35 :** Profil de l'antibiorésistance chez les souches des MRSA..... Annexe III

# Sommaire

Introduction .....	1
<b>Chapitre I : Revue bibliographique</b>	
1. Généralités sur le diabète.....	
1.1. Définition .....	
1.2. Classification .....	
1.2.1. Diabète de type I .....	
1.2.2. Diabète de type II .....	
1.3. Complications de diabète .....	
1.3.1. Complications micro-angiopathiques .....	
1.3.2. Complications macro-angiopathiques.....	
2. Pied diabétique.....	
2.1. Epidémiologie.....	
2.2. Facteurs pathogénique.....	
2.3.1. Facteurs pathogénique internes .....	
2.3.1.1. La neuropathie diabétique périphérique.....	
2.3.1.2. Artériopathie diabétique des membres inférieurs.....	
2.3.1.3. Infection.....	
2.3.2. Facteurs pathogéniques externes .....	
3. Infections nosocomiales .....	
3.1. Germes en cause.....	
4. Généralités sur le pus.....	
4.1. Définition.....	
4.2. Mécanisme de formation.....	
4.3. Principaux germes responsables de l'infection du pied diabétique.....	
5. Antibiotiques et antibiorésistance.....	
5.1. Différents types de résistance bactérienne.....	
5.1.1. Résistance naturelle (intrinsèque).....	
5.1.2. Résistance acquise.....	
5.2. Mécanisme de la résistance bactérienne aux antibiotiques.....	
5.3. Evaluation de l'antibiorésistance.....	

6. Chitosane et activité antibactérienne.....	
6.1. Définition du chitosane.....	
6.2. Systématique .....	
6.3. Structure chimique .....	
6.4. Propriétés physico-chimiques et biologiques du chitosane.....	
6.4.1. Propriétés physico-chimiques du chitosane.....	
6.4.2. Propriétés biologiques du chitosane.....	
6.5. Applications du chitosane.....	

## Chapitre II : Matériel et Méthodes

### 1. Matériel

1.1. Matériel biologique	
1.2. Matériel non biologique.....	

### 2. Méthodes.....16

2.1. Prélèvement du pus.....	16
2.2. Examen cytbactériologique de pus .....	17
2.2.1. Étude cytologique .....	17
2.2.2. Etude bactériologique .....	17
2.3. Identification des bactéries.....	
2.3.1. Tests biochimiques (Galerie classique) .....	
2.3.2. Mini galerie API 20E .....	
2.4. Antibiogramme par diffusion des disques.....	
2.4.1. Préparation de l'inoculum .....	
2.4.2. Application des disques d'antibiotiques.....	
2.5. Recherche complémentaire.....	
2.5.1. Détection phénotypique de la méthicillino-résistance des <i>Staphylococcus aureus</i> .....	
2.5.2. Recherche de $\beta$ lactamase à spectre élargi.....	
2.5. Etude de l'activité antibactérienne de chitosane.....	
2.6.1. Extraction de chitosane.....	
2.6.1.1. Préparation de la chitine.....	
2.6.1.2. Préparation du chitosane.....	
2.6.2. Préparation des solutions de chitosane.....	
2.6.3. Techniques utilisées (effet antibactérien).....	

## Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Résultats .....	1
1.1. Répartition des résultats selon les facteurs étudiés .....	2
1.2. Résultats de l'analyse microbiologique.....	4
1.3. Résultats de l'antibiorésistance.....	
1.4 .Etude de l'effet antibactérien de chitosane.....	
III.2. Discussion.....	
Conclusion.....	
Recommandations.....	
Références bibliographiques.....	
Annexes.	

# Introduction

## ***Introduction***

Le diabète est une maladie métabolique, caractérisée par une hyperglycémie chronique, liée à une déficience de la sécrétion d'insuline, de son activité ou des deux phénomènes associés (**Durand, 2012**).

Le diabète est mondialement répandue, dont la prévalence est importante et en augmentation (8,5% de la population mondiale souffre de la maladie) (**Chevenne et Fonfrède, 2001**). En Algérie 5 millions de personnes sont atteintes par le diabète, soit 15% de la population et entre 5 et 10% de ces diabétiques souffrent de lésions aux pieds, dont 6 à 8% d'entre eux subissent une amputation (**Khiati, 2016**). Une étude menée à oran montre que seul le pied diabétique représente près de 10% des hospitalisations, avec une mortalité de 9,1% et une amputation chez un tiers des cas (**Malek, 2001**). De part ses multiples complications : neurologiques, artériopathiques et cutanées ; le diabète fait du pied une cible privilégiée d'atteintes multiples : mécaniques, neurologiques, artérielles et infectieuses. Ces complications étant la plupart du temps associées (**Andrew, 2006**).

En effet, l'infection d'une ulcération d'un pied diabétique multiplie le risque d'amputation par un facteur de 10 (**Richard et Schuldiner, 2008**) et reste parmi les principales causes d'hospitalisation des diabétiques (**Lavigne et al., 2008**). La prise en charge de cette pathologie infectieuse nécessite une collaboration multidisciplinaire (médicale, chirurgicale et biologique). Le but commun est d'obtenir une cicatrisation des lésions et en réduisant d'émergence de bactéries multirésistantes, et si possible la restitution d'un pied fonctionnel en évitant l'amputation (**Got, 2001**).

L'infection du pied diabétique avec la spécificité de sa localisation (pied fragilisé) et un statut immunitaire générale affaiblie (diabète) constitue un motif fréquent de prescription d'antibiotiques (**Cunha et Ankle, 2000**). Cependant l'utilisation abusive et exagéré de ces derniers a permis d'augmenter le spectre de résistance pour la majorité des bactéries, pour cela nous avons fait appelle à une autre approche thérapeutique en utilisant les déchets de crevette ; la carapace pour l'extraction d'une biomolécule : le Chitosane.

Le chitosane est une molécule biologique qui présente une capacité de fonctionnalisation très variée qui l'amène à être utilisé dans une grande gamme d'applications notamment l'application médicinale. Plusieurs travaux ont démontré les propriétés

antibactériennes du chitosane qui font de lui un des biopolymères qui suscite beaucoup d'intérêt dans le traitement des infections bactériennes (**Shanidi et al.,1999 ; No et al.,2002 ; Omura et al., 2003 ; Zivanovic et al., 2004 ; Rejane et al.,2016 ; Abdelhamid,2016**).

Dans ce sens, notre étude a été orientée dans cet axe dont l'objectif d'évaluer l'effet antibactérien de chitosane et donner un espoir pour trouver un remède efficace contre cette pathologie qui a tendance à augmenter au fil des années. Pour cela la présente étude est structurée comme suit :

- ✓ Isolement et identification des bactéries responsables des infections du pied diabétique de différents patients.
- ✓ Etude de l'antibiorésistance de l'ensemble des bactéries identifiées.
- ✓ Etude de l'effet antibactérien de la molécule biologique «chitosane» sur les bactéries isolées et identifiées.
- ✓ Optimiser les paramètres expérimentaux étudiés pour obtenir une meilleure activité antibactérienne du chitosane sur les souches isolées du pied diabétique.

# Chapitre I

## Revue bibliographique

## 1. Généralités sur le diabète

### 1.1. Définition

Le diabète est une maladie métabolique définie par une hyperglycémie chronique, liée soit à une déficience de la sécrétion de l'insuline soit à une insulino-résistance à des degrés variables (OMS, 2009). Depuis la révision des critères diagnostiques du diabète par l'OMS en 1999, la maladie peut être reconnue lors des quatre situations suivantes (Figure 1):

- Présence de symptômes type polyurie, polydipsie, anorexie et glycémie sur plasma veineux  $\geq 2,00\text{g/l}$  ( $11,1\text{mmol/l}$ )
- Glycémie à jeun  $\geq 1,26\text{g/l}$  ( $7,0\text{mmol/l}$ )
- Glycémie  $\geq 2,00\text{g/l}$  ( $11,1\text{mmol/l}$ ) quelque soit le moment de la mesure (et toujours sur plasma veineux)
- Glycémie mesurée deux heures après l'ingestion de 75g de glucose  $\geq 2,00\text{g/l}$  ( $11,1\text{mmol/l}$ ). Il s'agit là du test d'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO).

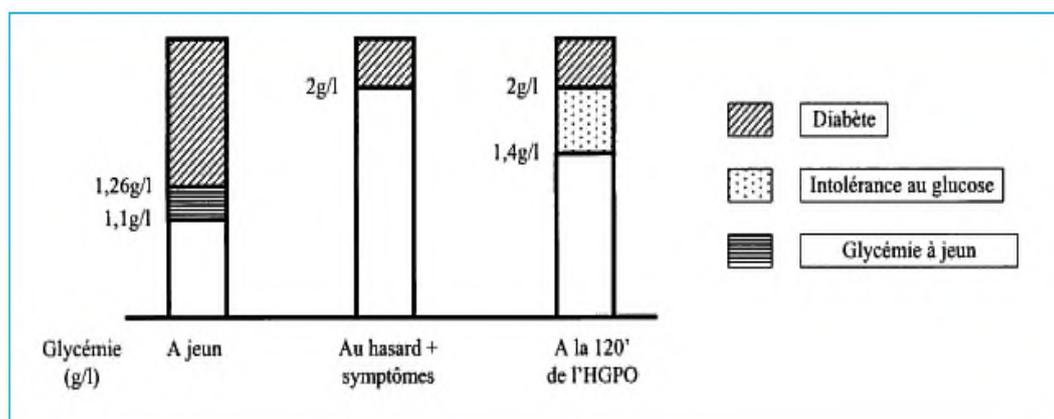


Figure1 : Diagnostic biologique du diabète sucré (Rodier, 2001)

### 1.2. Classification

Selon la classification recommandée par l'OMS en 1980, il existe deux types de diabète (Type I et II).

#### 1.2.1. Diabète de type I

Le diabète insulino-dépendant (DID), diabète juvénile, diabète maigre ou diabète cétosique, il représente 15 à 20% des diabètes, c'est une maladie auto-immune caractérisée par la destruction des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas, conduisant à un tarissement

plus au moins complet de la sécrétion d'insuline rendant l'insulinothérapie vitale (**Khalifa, 2004**). Cette réaction auto-immune est déclenchée, chez un sujet génétiquement prédisposé, par des facteurs d'environnement (**Buyschaert, 2006**).

### **1.2.2. Diabète de type II**

Le diabète non insulino dépendant, diabète de la maturité, diabète non cétosique, c'est la forme du diabète la plus fréquente : 80 à 85%, il est principalement associé à l'hérédité et les facteurs environnementaux (sédentarité et obésité) (**Khalifa, 2004**). Dans ce type du diabète l'organisme est capable de produire de l'insuline, mais soit la quantité produite est insuffisante, soit l'organisme ne réagit pas à l'action de l'insuline, ce qui entraîne une accumulation de glucose dans le sang. Cette hyperglycémie est liée à l'association, à des degrés divers, d'une insulino résistance et d'une insulino pénie.

La majorité des personnes atteintes de diabète de type II n'ont pas besoin d'une dose quotidienne d'insuline pour survivre, ils peuvent être traités au début par un régime et une activité physique seuls ou avec la prise d'un antidiabétique oral (**Rodier, 2001 ; Khalifa, 2004 ; Namhancho et al., 2013**).

On isolera encore le diabète gestationnel, au sens strict du terme c'est un diabète découvert pour la première fois au cours d'une grossesse et qui disparaît après l'accouchement pour réapparaître aux grossesses suivantes (**Khalifa, 2004**).

## **1.3. Complications de diabète**

Toute la gravité du diabète réside dans la survenue à plus au moins long terme de complications chroniques dégénératives responsables d'une surmortalité et d'une surmortalité chez les diabétiques (**Bouyahya, 2004**). Ces complications sont classées en deux catégories :

### **1.3.1. Complications micro-angiopathiques**

Elle résulte d'une atteinte diffuse de la paroi des artérioles et des capillaires. Elle touche tous les organes mais les localisations les mieux étudiées sont les vaisseaux de la rétine (rétinopathie), les capillaires des glomérules (néphropathie) et le système nerveux (la neuropathie) (**Khalifa, 2004 ; Durand, 2012**).

### 1.3.2. Complications macro-angiopathiques

Elle est liée à une atteinte des artères de gros et moyen calibre. Elle intéresse préférentiellement les artères coronaires (coronaropathie) et se manifeste par un infarctus de myocarde, les artères des membres inférieures réalisant une artériopathie dont l'aspect le plus évocateur est la gangrène (Khalfa, 2004 ; Durand, 2012 ; Ondoua, 2012).

## 2. Pied diabétique

Le pied diabétique est un problème médical, social et économique majeur aussi bien à l'échelle mondiale, qu'à l'échelle nationale (Pedgrift, 2011). Il regroupe l'ensemble des infections du pied, directement liées aux répercussions du diabète (Grimaldi, 2005). Il est défini comme une infection, ulcération ou destruction des tissus profonds du pied associée à une neuropathie et/ou une artériopathie périphérique des membres inférieurs chez le diabétique (Havan, 2008).

### 2.1. Epidémiologie

Le diabète est un problème majeur de santé publique depuis plusieurs années et le terme d'épidémie est souvent appliqué au diabète de type II tant sa progression est inquiétante au niveau mondial (Dunning, 2012). Selon l'OMS, en 2014 on estimait à 422 millions le nombre de personnes souffrant de diabète à travers le monde soit 8,5% de la population mondiale et environ 80% de cette population vivent dans des pays à faible et moyen revenu. L'OMS prévoit qu'en 2030, ce chiffre global sera augmenté à quelque 552 millions de personnes diabétiques à travers le monde (Fontbonne, 2010 ; Hingorani et al., 2016). Dans les pays développés, jusqu'à 5% des personnes diabétiques ont un ulcère du pied alors que dans les pays en développement, ce dernier chiffre pourrait monter jusqu'à 40%. Jusqu'à 70% de toutes les amputations des membres inférieurs sont réalisées chez des personnes diabétiques et entre 50% et 80% de ces amputations sont précédées d'un ulcère au pied (Varnado, 2015).

En Algérie, le diabète reste cependant une réalité préoccupante puisqu'il s'agit de la deuxième maladie chronique après l'hypertension. Les chiffres sur la prévalence du diabète sont approximatifs. Il y'aurait 2,5 millions, 3,5 millions et même 4 millions de personnes souffrant de cette maladie dans le pays. Les spécialistes divergent sur la quantification du diabète; qui constitue la quatrième cause de mortalité en Algérie (Chakib, 2011).

## **2.2. Facteurs pathogénique**

L'origine et le développement de plaies aux pieds chez les personnes diabétiques sont multifactoriels (**Driver et al., 2012**). Il existe des facteurs pathogènes internes et externes.

### **2.3.1. Facteurs pathogénique internes**

#### **2.3.1.1. La neuropathie diabétique périphérique**

Elle est due à l'atteinte microangiopathique des nerfs des membres inférieurs et responsable de 90% des cas d'ulcères..Le plus souvent elle est asymptomatique et induit une perte de sensibilité distale progressive et insidieuse (**Hartemann, 2008 ; Varnado, 2015**).

- **Neuropathie sensitive**

Elle se traduit par des troubles de la sensibilité (thermique, tactile, algique et profonde). La conséquence de cette anomalie est la brûlure par contact de source de chaleur mal évaluée (**Rovan et Rigalleau, 2005**).

- **Neuropathie motrice**

Se remarque par une amyotrophie des muscles intrinsèques qui entraîne des troubles statiques de pied et des déformations dynamique (**Gin et Rigalleau, 2005**). Elle est associée à une perte de mobilité articulaire, et aboutit à la formation de pieds creux et de griffes d'orteils (**Driver et al., 2012 ; Varnado, 2015**)

- **Neuropathie végétative**

Est responsable d'une sécheresse cutanée important (**Meyer et al., 2000**) et d'une hyperkératose qui favorisent le développement des durillons et des callosités (**Lushiku, 2006**). Elle réduit la vascularisation capillaire, ce qui provoque une ischémie tissulaire ainsi que la fragilisation des os (ostéopénie), causée par l'augmentation du flux sanguin dans le pied, contribue également aux difformités osseuses, aux fractures spontanées ou aux anomalies de la surface d'appui du pied (**Lushiku, 2006**) dont le stade ultime est le pied de Charcot (**Ha van et al., 1997**).

#### **2.3.1.2. Artériopathie diabétique des membres inférieurs**

L'artériopathie des membres inférieurs chez le diabétique diffère de celle des patients non diabétiques. Elle est plus fréquente, plus distale dans la population diabétique. L'atteinte est

souvent bilatérale (**Bennett, 2001**) et est due à une athérosclérose et une artériosclérose (médiacalcoses) diffuse intéressant non seulement les gros vaisseaux mais aussi les artères de moyen et petit calibre en particulier les axes artériels jambiers. La conséquence hémodynamique est une ischémie du pied. Elle se manifeste cliniquement par des claudications intermittentes à la marche et des douleurs des membres inférieurs au repos ; le plus souvent elle est asymptomatique et révélée par une gangrène sèche ou humide (**khalfa, 2009**)

- **Lésion du pied ischémique**

Les lésions sur pied ischémique se présentent sous forme d'une nécrose localisée. Il peut s'agir d'une petite zone de gangrène sèche siégeant sur un orteil et favorisée par un microtraumatisme local. La lésion initiale est superficielle, indolore et violacée. Elle est remplacée par une nécrose qui s'étend en surface et creuse en profondeur. L'extension peut être rapide et grave, avec une surinfection des tissus hypoxiques, se traduisant par des phénomènes inflammatoires locaux (rougeur, œdème, lymphangite), plus rarement une gangrène massive. L'évolution est rarement spontanément favorable, avec constitution d'un sillon en périphérie de la lésion et "perte sèche" d'une phalange ou d'un orteil (**Got et al., 1996**)

### **2.3.1.3. Infection**

L'infection correspond à une invasion tissulaire, habituellement secondaire à une lésion cutanée, par des microorganismes responsables de dégâts inflammatoires (**Voide et al., 2012**). Elle peut être superficielle mais avec un risque d'atteinte profonde pouvant menacer les tissus, les gaines et tendons, et surtout les structures osseuses. Il existe deux types d'infections superficielles et profondes.

#### **a) Infections superficielles**

Elles touchent les tissus au-dessus de l'aponévrose superficielle, séparant l'hypoderme de la couche musculaire sous-jacente, réalisant des tableaux de dermo-hypodermite bactérienne aiguë (**Ha van, 2008**).

- ✓ **La dermohypodermite bactérienne (DHB) :** est défini par l'atteinte de l'hypoderme; il n'existe pas de nécrose et les lésions n'atteignent pas l'aponévrose superficielle (**Gauzit, 2006**)
- ✓ **La dermohypodermite bactérienne nécrosante (DHBN) :** associée à une nécrose atteignant le derme et de l'hypoderme sans atteinte de l'aponévrose superficielle (**Gauzit, 2006**).

- ✓ **La fasciite nécrosante (DHBN-FN) :** dans laquelle la nécrose dépasse l'aponévrose superficielle avec des atteintes plus au moins profonds des fascias intermusculaires et des muscles. Elle se traduit par les décollements cutanés et la coloration rapidement violacée des téguments sans ni pus ni abcès (**Lipsky, 2008**).

#### **b) Infections profondes**

Elles touchent l'aponévrose, les muscles ou des structures ostéo-articulaires (**Voide et al., 2012**). Elles se présentent sous formes :

- ✓ **Les collections purulentes:** peuvent se présenter sous la forme d'abcès (forme collectée) ou de phlegmon (forme circonscrite par les structures tissulaires) dans les parties molles du pied, voire de la jambe (**Richard et al., 2007**).
- ✓ **La gangrène humide:** est définie par la présence de tissus nécrotiques noirâtres. Les lésions sont rapidement évolutives avec décollement et pus grisâtre d'odeur nauséabonde, pouvant aboutir à une dégradation rapide de l'état général avec sepsis, déséquilibre métabolique et insuffisance rénale (**Senneville, 2008**).
- ✓ **L'ostéite et l'ostéoarthrite:** il s'agit d'une infection des structures ostéo-articulaires correspondant à l'extension d'une infection et/ou des agents microbiens provenant d'une plaie du pied généralement chronique touche d'abord la corticale osseuse avant d'envahir éventuellement la médullaire diabétique (**Lipsky et al., 2004**).
- ✓ **Le mal perforant plantaire:** est l'ulcération neuropathique typique ; défini par une perte de substance à l'emporte-pièce, non douloureuse, peu étendue en surface, entourée d'un halo d'hyperkératose et siégeant préférentiellement aux zones d'hyperpression (**Richard, 2005**).
- ✓ **L'ostéoarthropathie nerveuse (pied de Charcot):**c'est une atteinte hautement destructrice et relativement indolore, le plus souvent unilatérale mais pouvant secondairement se bilatéraliser, touchant un ou plusieurs os du pied, elle est caractérisée par la lyse osseuse et articulaire avec fragmentation aboutissant à des déformations caricaturales du pied (**Richard, 2005**).

#### **2.3.2. Facteurs pathogéniques externes**

- ✓ Les chaussures inadaptées (50%) : Les chaussures étroites, neuves ou trop serrées et la présence des corps étrangers dans les chaussures sont les principaux facteurs qui

blesent le pied. Les chaussettes synthétiques avec d'épaisses coutures au niveau des orteils peuvent également léser le pied (**Reiber et al., 2004**).

- ✓ Une hygiène insuffisante (25%) : La mycose interdigitale sur une peau qui est déjà fragilisée peut entraîner une infection profonde. La marche pieds nus ainsi que le traumatisme par chute d'objet sur le pied peuvent également être impliqués dans les facteurs déclenchant (**Lashiku, 2006**).
- ✓ Des soins de pédicurie mal faits (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, lorsque la douleur apparaît, la plaie est déjà provoquée (**Lashiku, 2006**).

### 3. Infections nosocomiales

Les infections nosocomiales sont les infections contractées dans un établissement de soins (hôpital, clinique) alors qu'elle était absente au moment de l'admission du patient. Lorsque l'état infectieux du patient à l'admission est inconnu, l'infection est généralement considérée comme nosocomiale si elle apparaît après 48 heures d'hospitalisation. Si elle apparaît avant un tel délai, on considère qu'elle était en incubation lors de l'entrée dans l'établissement. Les patients diabétiques sont plus exposés que la population générale aux infections nosocomiales et en particulier à celles localisées au niveau du pied (**Lipsky et al., 2004**), Pour certains auteurs(**Lipsky et al., 2004 ; Veves et al., 2001**), la fréquence des infections nosocomiales chez le patient diabétiques est en rapport avec :

- ✓ déficit des mécanismes cellulaires de défense majoré par l'hyperglycémie capable d'altérer les fonctions des leucocytes (phagocytose, adhérence, bactéricide, chimiotactisme).
- ✓ Longue durée de l'hospitalisation : (25%) des journées d'hospitalisation diabétologies, elle peut varier de 14 à 45 jours.
- ✓ L'antibiothérapie à spectre large (ce qui peut déséquilibrer la flore bactérienne habituellement présente et sélectionner des bactéries résistantes)
- ✓ Absence de mesures aseptiques au cours du changement de pansement du pied.
- ✓ Manipulation d'actes chirurgicaux : amputation et débridement (excision des parties molles nécrosées, les tissus dévitalisés contaminés et les tissus fibreux).
- ✓ Désinfection inadéquate de la peau avant l'intervention chirurgicale ou l'emploi d'antiseptiques contaminés.

- ✓ Chronicité de la lésion et la lenteur de la cicatrisation.
- ✓ L'hypoxie est souvent impliquée, fréquente dans les ulcérations chroniques, la mort cellulaire et la nécrose tissulaire liées à l'hypoxie créent des conditions optimales à la prolifération microbienne (**Bowler, 2011**).

### 3.1. Germes en cause

L'infection nosocomiale peut être causée par les germes du patient, du personnel soignant ou de l'environnement hospitalier (**Clotilde et al., 2013**). Les bactéries liées à l'infection nosocomiale sont en majorité *Echerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* (**Vincent, 1995**). En première position on trouve les BGN et le groupe des cocci Gram positif (CGP) en particulier le *Staphylococcus aureus* vient en deuxième position (**Dridi et al., 2016**). Ces bactéries sont souvent multi-résistantes du fait de l'accumulation des résistances naturelles et /ou acquises, elles sont sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs en thérapeutique (**Tressiers et al., 2007**).

## 4. Généralités sur le pus

### 4.1. Définition

Le pus est un liquide épais de couleur blanche ou jaunâtre qui peut s'accumuler puis éventuellement s'écouler au niveau des zones subissant une infection. Il est composé d'un mélange de globules blancs altérés, de débris de cellules mortes et de bactéries. Habituellement, l'action des cellules de l'organisme participe à l'élimination de cette substance liquide, mais lorsque le pus s'accumule localement dans une cavité ou un espace cloisonné, il peut former un abcès et détruire progressivement les tissus environnants (**Hord et al., 2014**).

### 4.2. Mécanisme de formation

Le pus est constitué de cellules à activité phagocytaire et de bactéries. Les cellules phagocytaires sont attirées au foyer infectieux par diverses substances constitutives de la paroi des bactéries. Ces dernières attirent massivement les polynucléaires, le pus est alors abondant et les germes sont dits pyogènes. Les phagocytes subissent ensuite, au foyer infectieux, certaines dégradations dues à l'action de substances sécrétées par les bactéries (leucocidines). Ce pus peut se résorber grâce aux macrophages ou se collecter en abcès lorsque l'activité de ces macrophages est insuffisante (**Hord et al., 2014**).

### 4.3. Principaux germes responsables de l'infection du pied diabétique

- ✓ Bactéries aérobies à Gram positif : Dans ce groupe, *Staphylococcus aureus* est la bactérie la plus souvent mise en évidence de façon isolée ou au sein d'une population polymicrobienne lors d'infections qu'elles soient superficielles ou profondes. Les Streptocoques, notamment du groupe B, sont de plus en plus isolés au cours des infections du pied diabétique (**Couret et al., 2007**) .
- ✓ Bacilles aérobies à Gram négatif : Notamment de la famille des entérobactéries (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter cloacae*) sont retrouvés principalement dans le contexte d'une plaie chronique (**Voide et al., 2012**). *Pseudomonas aeruginosa* est typiquement rencontré lors d'hospitalisation de longue durée, d'antibiothérapie préalable ainsi que de plaies humides
- ✓ Bactéries anaérobies strictes : Le plus souvent les cocci à Gram positif mais aussi bacilles à Gram négatif (*Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* sp.) sont souvent associées à des germes aérobies. Les bactéries à Gram positif anaérobies strictes sont en règle présentes dans des plaies peu profondes alors que celles à Gram négatif anaérobies sont associées à une nécrose ischémique ou à une atteinte profonde (**Ge et al., 2002**). La microbiologie des infections du pied diabétique est particulière. Il existe une corrélation entre les bactéries isolées et le tableau clinique (Annexe I). Il s'agit, dans plus de la moitié des cas, d'infections polymicrobiennes.

## 5. Antibiotiques et antibiorésistance

Un antibiotique est une substance antibactérienne naturelle ou synthétique d'origine microbienne ou synthétisée chimiquement, capable d'inhiber spécifiquement la croissance d'autres micro-organismes par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux du germe (**Gognyetal., 2001**);Un antibiotique est bactériostatique lorsqu'il inhibe la multiplication des bactéries sans les tuer, et est bactéricides lorsque son action va jusqu'à la destruction de la cellule bactérienne(**Danan, 2006**).

La résistance aux antibiotiques résulte d'une évolution par sélection naturelle, les antibiotiques exerçant une pression sélective très forte, en éliminant les bactéries sensibles. On suppose que le cas le plus fréquent est une adaptation rapide des bactéries à un nouvel écosystème, qui naît de mutations génétiques aléatoires leur permettant d'y survivre, et de continuer à se reproduire (**Carattoli et al., 2001**).

### 5.1. Différents types de résistance bactérienne

La résistance bactérienne d'un antibiotique est d'origine génétique. Les gènes de résistance se trouvent soit dans le chromosome (résistance chromosomique) soit dans les éléments mobiles comme plasmides, éléments transposables ou intégrons (résistance extra-chromosomique). La résistance bactérienne peut être soit naturelle soit acquise (**Mandell et al., 2009**).

### **5.1.1. Résistance naturelle (intrinsèque)**

Les gènes de résistance font partie du patrimoine génétique de la bactérie, la résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. Cette résistance peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique, à une faible affinité de la cible pour l'antibiotique ou encore à l'absence de la cible. La résistance intrinsèque est permanente, stable est transmissible à la descendance (transmission verticale) lors de la division cellulaire, mais elle n'est généralement pas transférable d'une bactérie à l'autre (transmission horizontale) (**Mandell et al., 2009**).

### **5.1.2. Résistance acquise**

Les bactéries préalablement sensibles à un antibiotique, peuvent développer une résistance à cet antibiotique, ceci implique l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à cet antibiotique ou à un groupe d'antibiotique. Ce nouveau gène peut être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome qui est un phénomène rare soit par transfère d'ADN de plasmides conjugatifs ou de transposons (mécanisme le plus fréquent). Elles ne concernent que quelques souches, d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique donné (**Yala et al., 2000 ; Ojha, 2008**).

## **5.2. Mécanisme de la résistance bactérienne aux antibiotiques**

Ces résistances relèvent d'un mécanisme biochimique dont le support est génétique et elles peuvent être transmissibles à d'autres bactéries (**Wright, 2005**). Les modes de résistance connus actuellement qui résultent de la pression de sélection exercée par les antibiotiques (ATB) sont classés en quatre groupes :

### **a) Inactivation enzymatique des antibiotiques**

Par ce mécanisme, la bactérie acquiert la capacité d'inactiver l'action des ATB. par la sécrétion d'enzymes avant même qu'ils n'aient pénétré au sein du micro-organisme (**Babic et**

*al.*, 2006). Les classes d'antibiotiques visées par ces enzymes sont les  $\beta$ -lactamines les macrolides-lincosamimides-streptogramines (MLS), les aminosides et les phénicolés.

#### **b) Mécanisme d'Efflux actif**

Les systèmes d'efflux sont constitués de protéines particulières, jouant le rôle de pompes utilisant une force protons motrice pour expulser l'antibiotique dès qu'il apparaît dans la bactérie. Ces transporteurs d'efflux contribuent pour une large part à la résistance intrinsèque des bactéries à de nombreux agents antibactériens (Poole, 2004).

#### **c) Altération ou (modification) des sites 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 (Yamashita *et al.*, 2000 ; Pitout *et al.*, 2005).

#### **d) Diminution de la perméabilité cellulaire**

La réduction de la perméabilité cellulaire se produit par diminution de l'entrée de l'antibiotique sur son site, provoqué par une modification de la perméabilité de la membrane interne ou externe de la bactérie. Une altération des porines jouent un rôle important dans l'émergence d'une résistance, particulièrement à la suite d'une réduction du calibre des canaux ou du nombre des porines (Pagés, 2004).

### **5.3. Evaluation de l'antibiorésistance**

Les tests de sensibilité bactérienne les plus répandus ont pour but d'étudier l'effet bactériostatique ou bactéricide des antibiotiques (Jorgensen *et al.*, 1999). Pour chaque souche bactérienne, on peut définir une concentration minimale inhibitrice (CMI) qui correspond à la concentration minimale d'antibiotique qui inhibe la croissance visible du germe. Il existe deux grandes familles de tests pour étudier l'effet bactériostatique ou bactéricides:

- ✓ Ceux utilisant une méthode quantitative aboutissant à un résultat chiffré correspondant à une CMI : ce sont les tests par dilution,
- ✓ Ceux utilisant une méthode qualitative permettant de classer les bactéries en sensible(S), ou résistante(R) : ce sont les tests par diffusion (Ojha *et al.*, 2008).

## **6. Chitosane et activité antibactérienne**

### **6.1. Définition du chitosane**

Le chitosane est un biopolymère polycationique non toxique produit essentiellement à partir de la chitine (**Khanafari et al., 2008**), un polysaccharide le plus abondant dans la nature après la cellulose trouvé principalement dans les carapaces des crustacés (crevette ; homard) mais aussi les carapaces des insectes de même que dans les champignons et les levures (**Alvarenga, 2011**).

## 6.2. Systématique de la crevette

**Règne :** Animalia.

**Embranchement :** Arthropoda.

**Classe :** Malacostraca .

**Ordre :** Decapoda.

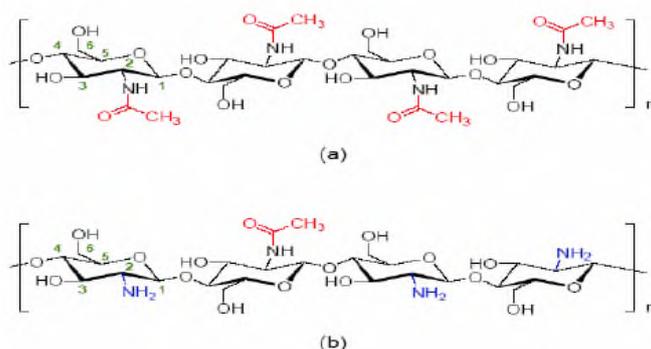
**Famille :** Penaeidae.

**Genre :** *Prarapenaeus*.

**Espèce :** *Prarapenaeus longirostris*.

## 6.3. Structure chimique

C'est un copolymère de D-glucosamine (unité désacétylé) et de N-acéty-D-glucosamine (unités acétylé) liées entre eux par des liaisons  $\beta$ -(1-4) (**Dutta et al., 2004 ; Limam et al., 2011**). Le chitosane se distingue de la chitine par l'élimination des groupements acétylé avec une réaction de désacétylation chimique (en milieu alcalin) (Figure 2). Ce changement expose la fonction amine qui peut ainsi accepter un proton et devenir chargé positivement. Cette modification permet au chitosane d'être soluble dans les solutions à pH acide (**François, 2008**).



**Figure 2 :** Structure chimique de la chitine (a), du chitosane (b) (Olteanu et Enescu, 2007)

## 6.4. Propriétés physico-chimiques et biologiques du chitosane

### 6.4.1. Propriétés physico-chimiques du chitosane

- **Le degré de désacétylation (DDA)**

C'est le pourcentage molaire de l'élimination des groupements N-acétyle, indiquant la proportion d'amines libres pouvant être chargés positivement ( $H^+$ ) après dissolution dans l'acide (indice de la charge ionique du produit) (Abdulhadi, 2013). Le DDA est un paramètre important à considérer puisqu'il influe sur toutes les propriétés physico-chimiques du chitosane, il varie de 70% à 100% selon les procédés de désacétylation (Beaulieu, 2007).

- **Le poids moléculaire (PM)**

Il correspond au nombre d'unités monomérique de D-glucosamine formant la chaîne du chitosane (Zemmouri, 2008). Le procédé de purification et de transformation de la chitine en chitosane entraîne une scission entre les monomères, réduisant significativement le poids moléculaire final en devenant de plus en plus courtes, les chaînes de chitosane peuvent se dissoudre directement dans de l'eau, sans l'aide d'un acide, permettant l'utilisation du chitosane dans certaines applications nécessitant un pH neutre (Roberts, 1992).

- **La viscosité**

Elle dépend non seulement du DDA et de PM mais aussi de pH et de la température : plus le DDA et le PM sont élevés et le pH du milieu est bas plus la viscosité de chitosane augmente. En augmentant la température le chitosane devient moins visqueux (Pa et Yu, 2001).

- **Autres propriétés physico-chimiques**

Le chitosane est doué d'autres caractéristiques physico-chimique tel que la pureté ; la solubilité ; la cristallinité et la flexibilité (Pa et Yu, 2001 ; Rinaudo, 2006).

#### 6.4.2. Propriétés biologiques du chitosane

Le chitosane présente l'avantage de réunir des propriétés très intéressantes. En effet, il inhibe la croissance de nombreux parasites et il réduit le développement des infections : c'est un bon agent antibactérien et antifongique (Shi et al., 2006). De plus, le chitosane a des propriétés anti tumorales, antivirales, ainsi que des propriétés cicatrisantes remarquables (Bacon et al., 2000). Il augmente la vitesse de cicatrisation des plaies ouvertes et la reconstruction des tissus tout en prévenant les infections microbiennes. Le chitosane présente également des propriété immunologique antithrombogène et hémostatiques (Muzzarelli et al., 2005).

#### 6.5. Applications du chitosane

Plusieurs études ont démontré l'efficacité du chitosane et son application dans plusieurs domaines (Tableau 1): agroalimentaire (Pranoto et al., 2005), biomédical (Rabea et al., 2003) et environnementale (Stohr et al., 2001).

**Tableau 1** : Domaines d'application du chitosane (Crini, 2006; Gerente et al., 2007).

Champ d'applications	Applications
<b>Agroalimentaire</b>	- Additifs alimentaires (Agent liant, émulsifiant, stabilisant, épaississant et de conservation) -Formation de films (emballage). -Enrobage des graines, Fertilisant.
<b>Biomédical et Pharmaceutique</b>	-Traitement des brûlures et des lésions épidermique : pansement, crèmes de soin, fils de suture. -Gel et implants dentaires. -Lentilles de contacts.
<b>Environnementale</b>	-Traitement des eaux (coagulation /floculation, filtration, adsorption, chélation des métaux lourds). - Traitements du sol.



# Chapitre II

## Matériels et méthodes

Notre travail est réalisé dans le but d'isoler et d'identifier les bactéries responsables des infections du pied diabétique et d'évaluer l'efficacité de l'effet antibactérien de la molécule biologique (le chitosane) sur ces bactéries. Notamment celles qui ont développé une large résistance aux antibiotiques.

La présente étude a été effectuée au niveau de laboratoire de bactériologie de l'Etablissement Public Hospitalier (EPH) de Boufarik, de Centre Hospitalier Universitaire de Mustapha Bacha (CHU) et l'Unité de Soins de Boufarik (USB) durant une période de cinq mois allant de février au juin 2017.

### 1. Matériels

#### 1.1. Matériels biologiques

Le matériel biologique est représenté par :

- Le pus : prélevé à partir des plaies du pied chez les diabétiques par écouvillonnage.
- Le chitosane : la molécule biologique dérivée de la chitine extraite à partir des carapaces des crevettes (Alger). Caractérisé par :
  - Une couleur blanche.
  - Un poids moléculaire (PM) de 69kDa.
  - Un degré de désacétylation (DDA) de 74%.
- Des souches de références (ATCC):
  - Escherichia coli* (ATCC 25922)
  - Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
  - Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

#### 1.2. Matériels non biologiques

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

### 2. Méthodes

#### 2.1. Prélèvement du pus

Le prélèvement est un acte-clé de la phase pré-analytique du diagnostic qui doit être réalisé dans les meilleures conditions d'asepsie au début des manifestations cliniques et avant toute antibiothérapie. Parmi les divers méthodes de prélèvement utilisées nous avons employé la technique d'écouvillonnage.

Nous avons réalisé 70 prélèvements de pus des pieds diabétiques issus de plusieurs établissements selon le tableau ci-dessous

**Tableau 2 :** Echantillonnage de pus du pied diabétique dans les hôpitaux et l'unité de soins.

Etablissements	EPH	CHU	USB
Prélèvements	55	10	5
Total	70		

Au niveau de l'EPH de Boufarik les prélèvements ont été effectués dans la salle de soins de service médecine interne alors qu'au niveau de CHU de Mustapha Bacha les échantillons ont été prélevés au niveau de la salle de consultation de service de diabétologie.

#### ✓ L'écouvillonnage

Lors du prélèvement de pus, il convient de réduire au minimum la contamination secondaire par les germes de la peau.

-D'abord désinfecter la peau par l'eau physiologique

-Prélever le pus à l'aide d'un écouvillon en passant sur une surface de 1cm<sup>2</sup> de la plaie, dans un mouvement de zigzag combiné d'une rotation. Ce prélèvement est effectué sur deux écouvillons l'un pour l'examen direct (cytologie) et l'autre pour la culture (microbiologie).

#### ✓ 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**).

### ✓ **Fiche de renseignements**

Tous les prélèvements réalisés ont été accompagnés d'une fiche de renseignements clinique comportant : le nom et prénom, le sexe, l'âge, le type de diabète, la date de prélèvement, le type d'infection et le traitement antibiotique déjà administré (Annexe II).

## **2.2. Examen cytobactériologique de pus**

Les prélèvements réalisés ont fait l'objet d'une étude cytologique pour la recherche des leucocytes et des hématies dans le pus, et d'une étude bactériologique pour la recherche des germes présents.

### **2.2.1. Etude cytologique**

Elle permet de faire une appréciation leucocytaires (la présence des polynucléaires et des lymphocytes) ainsi d'observer la présence des hématies dans le pus par une observation microscopique après étalement du prélèvement entre lame et lamelle. Concernant la coloration simple (bleu de méthylène) les cellules lymphocytes granulees apparaissent avec noyau au centre coloré en bleu, polynucléaire de noyau bilobé coloré en bleu.

### **2.2.2. Etude bactériologique**

C'est un examen sur lequel repose le diagnostic de l'infection. Il constitue l'examen de certitude car il permet la mise en évidence de la bactérie elle-même, de sa culture ou isolement qui permettra l'identification ultérieure ainsi que de préciser sa sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme) (**Dennis et al., 2007**).

#### **A) Examen macroscopique**

Tous les prélèvements ont fait l'objet d'un examen macroscopique, permet de fournir des renseignements suivants :

- ✓ La couleur : la couleur du pus va des jaune-vert, ainsi la couleur rouge brun est éventuellement sanglant et généralement dues à un mélange de sang ou l'hémoglobine, la couleur bleu-vert élaboré par pyocyanique. on peut évoquer des anaérobies devant un pus marron et fétide.

- ✓ La consistance : la consistance de pus peut être allé d'un liquide trouble à une matière épaisse et collante, le pus peut être épais visqueux, élastique, mélanger ou non de sang. L'aspect granuleux, mal-lié des pus révèle la présence des Streptocoques, les pus crémeux à Staphylocoques ou à Pneumocoques.
- ✓ L'odeur : il peut être inodore ou avoir une odeur fécaloïde ou fétide ou très putride, dans ce dernier cas, la présence de bactérie anaérobie (**Charles et al., 2005**).

### **B) Examen microscopique**

L'examen microscopique permet d'orienter le diagnostic, ainsi d'envisager la suite des examens à effectuer et de faire une étude morphologique des cellules microbiennes (**Dennis et al., 2007**). Il est effectué en deux états :

- Examen à l'état frais (sans coloration entre lame et lamelle des bactéries vivantes).
- Examen à l'état fixé (examen après simple coloration au bleu de méthylène et double coloration).

#### **B.1) Examen à l'état frais**

Le principe de cet examen est l'observation des bactéries vivantes, mise en évidence de leur mobilité, leur mode de regroupement et leur morphologie.

**Technique :** La technique consiste à l'observation directe du pus (à l'objectif 40) entre lame et lamelle sans fixation du prélèvement par la chaleur (**Charles et al., 2005**).

#### **B.2) Examen à l'état fixé (examen après coloration)**

- **Coloration simple au bleu de méthylène**

Elle permet d'étudier les éléments cellulaires et de préciser la forme et la disposition des bactéries.

#### **Technique**

- ✓ **Préparation d'un frottis :** À l'aide d'une pipette pasteur déposer sur une lame propre quelques gouttes du prélèvement déjà homogénéisé avec de l'eau physiologique stérile. Étaler la goutte. Puis fixer l'étalement par la chaleur en flambant sur bec bunsen.

- ✓ **Coloration** : La coloration de bleu de méthylène est réalisée en couvrant le frottis par le colorant de bleu de méthylène. Laisser agir une minute.
- ✓ Sécher à l'air ou sur une platine chauffante ou délicatement entre deux feuilles de papier filtre fin (ou buvard) après rinçage à l'eau de robinet jusqu'à élimination des colorants en excès, l'observation est réalisée au microscope optique à l'objectif x100(objectif à immersion).

**Lecture** : les bactéries apparaissent sous forme de bacille ou cocci en bleu.

### **C) Recherche et isolement des bactéries**

#### **C.1) Technique d'ensemencement**

La mise en culture de prélèvement de pus est effectuée sur différents milieux de culture (gélose au sang frais (GSF), gélose au sang cuit (GSC), gélose nutritif(GN), Hecktoen et Chapman) dans le but d'isoler les différentes bactéries contenues dans le pus. L'ensemencement est d'abord effectué en déchargeant en stries condensées l'écouvillon de prélèvement de pus. Ensuite il est poursuivi d'un ensemencement par pipette pasteur stérile en utilisant la méthode de quadrant, en faisant des stries serrés puis éloignés. Les boîtes sont ensuite incubées pour une durée de 24h à 37°C.

#### **C.2) 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 mis en route 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.

### **D) Identification des bactéries**

Les cultures positives ont fait l'objet d'une identification bactérienne et biochimique en utilisant deux types de galeries (la galerie classique et la galerie API 20E). L'identification est précédée par une étape d'orientation : la coloration de Gram.

### D.1) Coloration de Gram

La plupart des bactéries d'intérêt médical sont classées selon l'architecture de leur paroi en : bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif. La différence dans la structure de cette paroi est révélée par la coloration de Gram. Le mécanisme de coloration de Gram semble lié à l'épaisseur de la paroi et à sa perméabilité (**Robert et al., 1984**).

#### Technique

##### ✓ Préparation d'un frottis

Déposer sur une lame propre une goutte d'eau physiologique stérile et à l'aide d'une pipette pasteur stérile, prélevé une colonie bien isolée à partir de la culture bactérienne de 24 heures, en étalant bien la goutte sur la lame par un mouvement régulier et circulaire, laissant sécher le frottis en flambant sur bec bunsen (**Dennis et al., 2007**).

##### ✓ Coloration

-Coloration primaire: Couvrir la lame de violet de Gentiane et laisser agir 1 minute ; getter l'excès de colorant.

-Mordantage: égoutter sans rincer et faire de bains de Lugol pendant 1 minute.

-Décoloration: plonger la lame dans l'Alcool durant 30 secondes ; puis lavage doux et abondant à l'eau distillée.

-Coloration secondaire: Recouvrir la lame de fuchsine durant 30 secondes à 1 minute.

-Lavage à l'eau distillée puis séchage entre deux feuilles de papier filtre, puis à la chaleur.

**Lecture :** les bactéries à Gram positif apparaissent bleu-violet, alors que les bactéries à Gram négatif apparaissent rose-rouge.

### 2.3. Identification des bactéries

L'identification de différentes bactéries isolées a été effectuée par les tests biochimiques (galerie classique) et la mini galerie API 20E.

#### 2.3.1. Tests biochimiques (Galerie classique)

Le diagnostic de genre et d'espèce repose sur l'étude des caractères biochimiques :

### A) Mise en évidence du type respiratoire

- **Test de catalase**

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. La fonction principale de la catalase dans les cellules est de prévenir l'accumulation de niveaux toxiques de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) formé comme sous-produit de processus métaboliques (Denis et al., 2007). Elle catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui se dégage selon la formule suivante :



**Technique :** Déposer une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes et émulsionner un peu la colonie suspecte ou la culture obtenue sur gélose (Delarras, 2014).

**Lecture :** -Formation de bulles d'oxygène : la bactérie possède la catalase (Catalase +).

-Pas de bulle d'oxygène : la bactérie ne possède pas la catalase (Catalase -).

- **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 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.

### B) Etude de l'accepteur de minéraux

- **Recherche de nitrate réductase**

Le nitrate réductase est une enzyme qui catalyse la réaction de réduction des nitrates en nitrites dont leur mise en évidence est réalisée en utilisant le réactif de Griess. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction, jusqu'à une dénitrification comme suit:



**Technique :** Un bouillon nitraté est ensemencé avec la bactérie à étudier et incubé à 37°C pendant 18 heures. Après incubation, 3 gouttes d'une solution sulfanilique (Griess A) et 3 gouttes d'une solution de naphtylamine (Griess B) ont été ajoutées au bouillon (**Denis et al., 2007**).

**Lecture :** La présence d'une teinte rouge-orangé signifie la présence d'ions nitrites, ce qui indique que la bactérie possède une nitrate réductase et c'est le cas pour les entérobactéries.

L'absence de coloration rouge signifie que soit la bactérie testée ne possède pas de nitrates-réductase soit les nitrates sont réduits au stade azote. Dans ce cas le test est complété par l'épreuve de ZoBell en ajoutant la poudre de zinc qui est un composé capable de réduire les ions nitrates en ions nitrites :

- L'apparition d'une teinte rouge indique la formation d'ions nitrites par l'action du zinc, donc ça signifie la présence des ions nitrates dans le milieu, donc la bactérie ne possède pas de nitrate-réductase.
- A l'inverse, l'absence de coloration rouge indique qu'il n'y a plus d'ions nitrates dans le milieu pour réagir avec le zinc, donc la bactérie possède une nitrate-réductase très active qui a consommé tous les ions nitrates (**Denis et al., 2007**).

### C) Tests biochimiques du catabolisme des glucides

- **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 :** On ensemence le milieu par une pique centrale à l'aide d'une pipette pasteur stérile chargée en suspension bactérienne déjà préparée puis on l'incube à 37°C pendant 18 à 24 heures.

**Lecture :-** Si la bactérie fermente le mannitol, elle libère des produits acides qui font virer l'indicateur de pH du rouge en milieu basique au jaune en milieu acide. Donc la bactérie est de mannitol (+).

-Si la bactérie ne fermente pas le mannitol le milieu reste rouge. Lorsque la bactérie est immobile, on observe des colonies au milieu de l'ensemencement, par contre si elle est mobile on observe une répartition des colonies dans le milieu.

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

Le milieu RM-VP (bouillon Clark et Lubs) 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. La lecture se fait après 5 minutes :

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

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

- **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<sub>2</sub>S) 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<sub>2</sub>S.

**Technique :** A partir de la culture pure sur gélose nutritive, ensemercer la pente du milieu par des stries et le culot par piqure à l'aide d'une pipette Pasteur ou d'une anse bouclée préalablement stérilisée à la flamme, puis incuber à 37°C pendant 24h (**Delarras, 2014**).

**Lecture :** -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.

-Aucun sucre dégradé : pente et culot rouge.

-Production du gaz : bulle(s) de gaz, milieu complètement séparé ou soulevé

-Production de H<sub>2</sub>S : précipité noirâtre plus au moins abondant.

- **Etude de la dégradation du lactose (test d'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. 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:** Réaliser une suspension épaisse des bactéries testées en eau distillée. Ajouter un disque imprégné d'ONPG avec une pince flambée et refroidie puis incuber à 37°C pendant 24h.

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

-Absence de coloration indique un test négatif (ONPG -).

- **Utilisation de citrate comme source de carbone**

Certaines entérobactéries sont capables d'assimiler le citrate de Sodium comme seule source de carbone et d'énergie. Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone ; le Citrate et un indicateur de pH coloré le bleu de bromothymol. Les bactéries possédant l'enzyme citratase sont capables de se développer sur ce milieu. L'utilisation du citrate se traduit par une alcalinisation du milieu, ce qui fait virer le bleu de bromothymol du vert au bleu en milieu basique.

**Technique:** Ensemencer le milieu gélosé de citrate de Simmons de coloration verdâtre, par la souche à étudier par une strie sur la partie inférieure, la partie supérieure servira de témoin (**Labres, 2002**).

**Lecture :** Virage de l'indicateur de pH au bleu : il y'a eu une alcalinisation du milieu et la souche est citrate de Simmons positif (+). Pas de virage de l'indicateur de pH : il n'ya pas eu une alcalinisation et le milieu ne présente pas de culture. La souche est citrate de Simmons négatif (-).

### **D) Tests biochimiques du catabolisme des protéines**

Les bactéries peuvent assimiler et dégrader les acides aminés selon deux voies métaboliques : La désamination et la décarboxylation.

- **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 violet (phénomène due à l'alcalinisation). La réaction est négative lorsque les tubes contenant l'acide aminé et le témoin virent au jaune (acidification).

- **Mise en évidence de l'uréase du tryptophane désaminase et de tryptophanase**

- ✓ **Milieu urée-indole**

C'est un milieu synthétique; non nutritif permet la recherche des trois activités enzymatiques suivantes :

- **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**

Certaines bactéries dégradent le tryptophane grâce à une tryptophanase en formant de l'indole, de l'acide pyruvique et de l'ammoniac. Après addition du réactif de Kovacs, le

diméthyl-amino-4-benzaldéhyde contenu dans le réactif de Kovacs réagit avec l'indole, et forme un composé coloré en rouge. L'indole peut être mis en évidence en utilisant le milieu urée-indole ou l'eau peptonée exempte d'indole; c'est un bouillon qui ne contient pas d'indole, mais il contient du tryptophane pour que certaines entérobactéries puissent le dégrader en indole (**Delarras et al., 2014**).

### ○ Tryptophane désaminase (Test TDA)

Par contre certaines bactéries dégradent le tryptophane grâce à l'enzyme tryptophane désaminase (Test TDA) et cette dernière 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.

### E) Identification des *Pseudomonas* (Test de King)

Les milieux de King (milieu King A et milieu King B) permettent de différencier entre elles les différences espèces du genre *Pseudomonas*, par la mise en évidence de la production de pigments spécifiques. L'élaboration des pigments est influencée par la composition du milieu, ce qui justifie l'utilisation de deux milieux différents : King A et King B. La production de pyocyanine, due spécifiquement à *Pseudomonas aeruginosa*, est favorisée par la présence d'ions inorganiques. La recherche de la production de pyocyanine est effectuée sur milieu King A. la production de pyoverdine, est favorisée par une teneur élevée en phosphate. La recherche de la production de pyoverdine est effectuée sur milieu King B (**Delarras, 2014**).

**Technique :** A partir d'une culture sur gélose (faire une suspension en eau distillée) ou dans un bouillon, ensemercer le milieu en faisant une strie à la surface de la gélose avec l'anse (ou en déposant une goutte de suspension). L'incubation est réalisée en aérobiose à 37°C pendant 24heures (**Delarras, 2014**).

**Lecture :** couleur bleue sur le milieu King A (présence de pyocyanine).Couleur jaune-vert fluorescent sur le milieu King B sous UV (présence de pyoverdine).

### ❖ Recherche de coagulase

La mise en évidence de la coagulase libre permet la différenciation des espèces du genre *Staphylococcus*. En effet, *Staphylococcus aureus* possède une coagulase (enzyme)

capable de coaguler le plasma humain par transformation de fibrinogène en fibrine (**Panizzi et al., 2006**)

**Technique:** Dans un tube à essai, mettre 2ml de plasma humaine, ajouter 2ml d'une suspension bactérienne, puis incuber dans l'étuve à 37°C pendant 24h. Un tube témoin va servir comme un contrôle du test et pour valider le résultat (pour confirmer que le plasma est incapable de se coaguler seule) (**Joffin et Leyral, 2001**).

**Lecture :** Cette méthode est considérée comme la méthode de référence, elle a été interprétée après 2h, 4h et 18h d'incubation à 37°C. Si c'est négatif laisser jusqu'aux 24h, s'il y a une coagulation de plasma, le fibrinogène a été transformé en fibrine. La bactérie est dite coagulase positive.

### 2.3.2. Mini galerie API 20E

API 20E (Analytical profil index) est un système pour l'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif en utilisant 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données (**Lagha, 2015**).

**Principe :** Cette galerie comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés, 16 microtubes testent la fermentation d'hydrates de carbone, les quatre autres testant l'hydrolyse de l'esculine, la production d'indole, l'hydrolyse de l'urée et l'hydrolyse de la gélatine. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par un virage coloré spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (**Derafa, 2012**).

#### **Technique :**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation avec la répartition environ 5ml d'eau distillé dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, puis Retirer la galerie de son emballage individuel et on la dépose dans la boîte d'incubation.
- Préparer l'inoculum bactérien: une colonie dans 5ml d'eau physiologique, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland.

- Pour inoculer la galerie, il faut remplir à l'aide d'une pipette Pasteur les tubes et les cupules des tests CIT, VP et GEL avec la suspension bactérienne, et pour les autres tests; remplir uniquement les tubes (et non les cupules) avec la création d'une anaérobiose dans les tests: ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S en remplissant leur cupule par l'huile de vaseline stérile. Incuber à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 18-24 heures.

**Lecture :** La lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (Annexe II). L'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique.

### 2.4. Antibiogramme par diffusion des disques

L'antibiogramme a été réalisé sur milieu de Mueller-Hinton.

#### 2.4.1. Préparation de l'inoculum

- A partir d'une culture pure de 18h sur milieu d'isolement, on prend à l'aide d'une anse ou une pipette Pasteur stérile le sommet de 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans un volume 2.5ml d'eau physiologique stérile. Puis homogénéiser la suspension bactérienne.
- L'inoculum doit être ajusté en ajoutant de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.
- Ensemencer par écouvillonnage sur des boîtes de Pétri gélosées en Mueller-Hinton (sauf les bactéries exigeantes tel que *Streptococcus spp*, ensemencées sur un milieu GSF) (Canton *et al.*, 2008 ; Saen, 2011).

#### 2.4.2. Application des disques d'antibiotiques

- Déposer les disques des antibiotiques à l'aide d'une pince stérile (maximum 06 disques pour une boîte de Pétrie de 90mm de diamètre) en laissant 25 à 30mm entre eux et 15mm entre le disque et la périphérie de la boîte. Pour les bactéries exigeantes (*Streptococcus spp*, etc.), ne pas mettre plus de 4 disques par boîte de 90mm.
- Laisser les boîtes 20min à la température ambiante pour permettre une prédiffusion de l'antibiotique, puis l'incuber pendant 18-24h à  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  (Vedel, 2005 ; CA-SFM, 2010).

**Lecture :** La lecture de l'antibiogramme a été faite en mesurant à l'aide d'une règle graduée les diamètres d'inhibition (zone claire) autour des disques. Les bactéries sont classées dans l'une des catégories R (résistant), I (intermédiaire), S (sensible) par la comparaison de la zone d'inhibitions aux valeurs critiques citées dans la standardisation de l'antibiogramme à l'échelle national (Annexe II).

### 2.5. Recherche complémentaire

#### 2.5.1. Détection phénotypique de la méthicillino-résistance des *Staphylococcus aureus*

La classification des souches de *Staphylococcus aureus* en résistantes et sensible à la méthicilline est déterminée par la recherche de leur résistance à la l'oxacilline à l'aide d'un disque de cefoxitine (30µg) dans les conditions standard. La résistance est testée en réalisant l'antibiogramme standard du Staphylocoque, en prenant en considération la résistance à l'oxacilline.

Après avoir lu le diamètre des zones d'inhibitions des antibiotiques ; les souches qui présentent un diamètre d'inhibition de cefoxitine  $\leq 27$ mm et sont-elles mêmes résistantes à l'oxacilline (diamètre  $\leq 10$  mm) elles sont qualifiées comme des *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (MRSA) et lorsque le diamètre de zone d'inhibition de cefoxitine est  $\geq 27$ mm et les souches elles-mêmes ne sont pas résistantes à l'oxacilline (diamètre  $\geq 13$ mm) ces souches sont dites des (MSSA). Devant tout problème d'interprétation, faire un test de confirmation par la technique du screening à l'oxacilline (**Rasheed et al., 2010**).

- **Test de screening à l'Oxacilline pour les *Staphylococcus aureus***

L'oxacilline doit être testé de façon particulière pour majorer l'expression de la résistance.

#### **Technique**

- **Préparation de la solution d'oxacilline**

Diluer 6mg d'oxacilline (poudre injectable d'un flacon de 1g) dans 10ml d'eau distillée stérile, puis faire une solution au 1/10<sup>ème</sup> puis mettre 2ml de cette solution dans une boîte de Pétri de 90mm de diamètre, ajouter 18ml de gélose Muller Hinton, mélanger en faisant des mouvements rotatoires.

- 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 10ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit équivalente à 0,5Mac Farland, 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 toute les  $\beta$ -lactamines.

### 2.5.2. Recherche de $\beta$ lactamase à spectre élargi

Chez les entérobactéries, la production de  $\beta$ -lactamases est le mécanisme prédominant de résistance aux  $\beta$ -lactamines (**Livermore, 2003**), certaines de ces bactéries sont capables d'exprimer une  $\beta$ -lactamase à spectre élargi et sont dites multi-résistantes (**Paterson et Bonomo, 2005**). En effet ces BLSE peuvent être mises en évidence par un test de synergie et un test de confirmation (test du double disque)

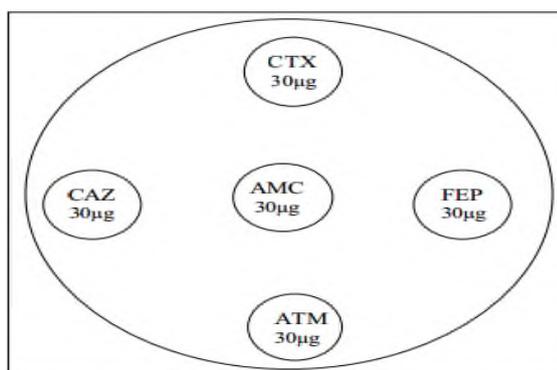
#### ✓ Tests de détection de BLSE

##### A-Test de synergie

Ce test consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de  $\beta$ -lactamase et les disques de céphalosporines de troisième génération (cefotaxime, ceftazidime et céfepime) et un monobactame (l'aztréonam) (**Jarlier et al., 1988**).

**Technique:** La recherche de  $\beta$ -lactamase à spectre étendue est faite dans les conditions standard de l'antibiogramme, puis en disposant les disques d'ATB: un disque d'amoxicilline plus acide clavulanique (AMC 20/10) et les disques de C3G (CTX 30 $\mu$ g, FEP 30 $\mu$ g, CAZ 30 $\mu$ g) et l'aztréonam (ATM 30 $\mu$ g) à une distance de 20 à 30mm sur les boîtes de Pétri. Incuber pendant 24 heures à 37°C (Figure 3).

**Lecture:** La production des enzymes BLSE se traduit par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques d'AMC et les C3G.



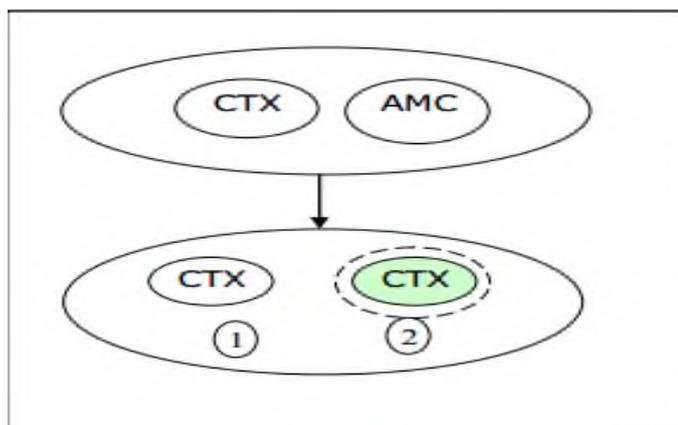
**Figure 3:** Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie (**Jarlier et al., 1988**).

### **b- Test de confirmation du double disque (test espagnol)**

Ce test consiste à rechercher une augmentation de la zone d'inhibition d'un disque de C3G, précédé par l'application d'un disque contenant l'AMC, comparé à un autre disque portant la même céphalosporine et placé côte à côte sur la gélose de Mueller-Hinton (**Rahal et al., 2005**).

**Technique :** On procède de la même manière que la technique d'antibiogramme dans la préparation de l'inoculum et l'ensemencement, puis on place deux disques d'antibiotiques : un disque d'AMC et un disque de CTX (C3G) à une distance de 25mm selon la figure 4. On laisse diffuser à la température ambiante du laboratoire pendant une heure de temps et on remplace le disque d'AMC par un disque de CTX (C3G). On incube pendant 24h à 37°C.

**Lecture:** Le test du double disque est considéré positif quand le diamètre d'inhibition du disque de céphalosporine de troisième génération appliqué après pré-diffusion du disque de l'AMC est supérieur ou égale de 4 à 5mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération.



**Figure 4 :** Schéma de détection de BLSE par le test du double disque (Rahal et al., 2005).

## 2.6. Etude de l'activité antibactérienne de chitosane

### 2.6.1. Extraction de chitosane

#### 2.6.1.1. Préparation de la chitine

- **Préparation de la matière première (carapaces)**

La matière première est constituée de carapaces de crevettes. Dès leur récupération, les carapaces sont lavées et conservées sur de la glace (3°C). Elles sont ensuite séchées dans un flux d'air à 103°C pendant 20 heures puis broyées et striées sur tamis de façon à obtenir des particules dont la taille est de l'ordre du millimètre (Abdulhadi, 2013).

- **Extraction de la chitine**

- a. Déminéralisation**

Elle permet de débarrasser les sels minéraux principalement les carbonates et les phosphates de calcium par un traitement acide. Elle s'effectue en dispersant la matière obtenue dans une solution chlorhydrique sous agitation constante pendant 1h à température ambiante. La réaction produit un violent dégagement de gaz carbonique. Théoriquement la réaction se termine lorsque il n'y a plus de dégagement gazeux. Le contenu est ensuite filtré sur papier Whatman et rincé abondamment à l'eau distillée.

- b. Déprotéinisation**

Elle permet d'extraire les protéines par un traitement alcalin. Le résidu est introduit dans un flacon en pyrex, dans lequel est ajouté du NaOH à une température de 90°C pendant 18h, le contenu du flacon est à nouveau filtré et rincé à l'eau distillée.

### c. Décoloration (blanchiment)

Elle permet d'éliminer les pigments colorés par l'utilisation d'un solvant d'extraction (agent oxydant :  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{NaOCl}$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Le contenu est rincé avec 20ml de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pour blanchir le produit, ensuite un ultime rinçage à l'acétone permet d'entraîner les impuretés lipidiques résiduelles. Le contenu du flacon est à nouveau rincé abondamment à l'eau distillée jusqu'à ce que le pH de l'eau de lavage atteigne la neutralité. Le filtrat est alors transféré dans une coupelle préalablement pesée qui sera par la suite placée dans l'étuve à  $30^\circ\text{C}$  pendant 20h et ensuite à  $90^\circ\text{C}$  pendant 12h.

La méthode standard pour préparer la chitine et le chitosane est expliquée dans la figure 7 (Onsoyen et Skaugrud, 1990).

#### 2.6.1.2. Préparation du chitosane

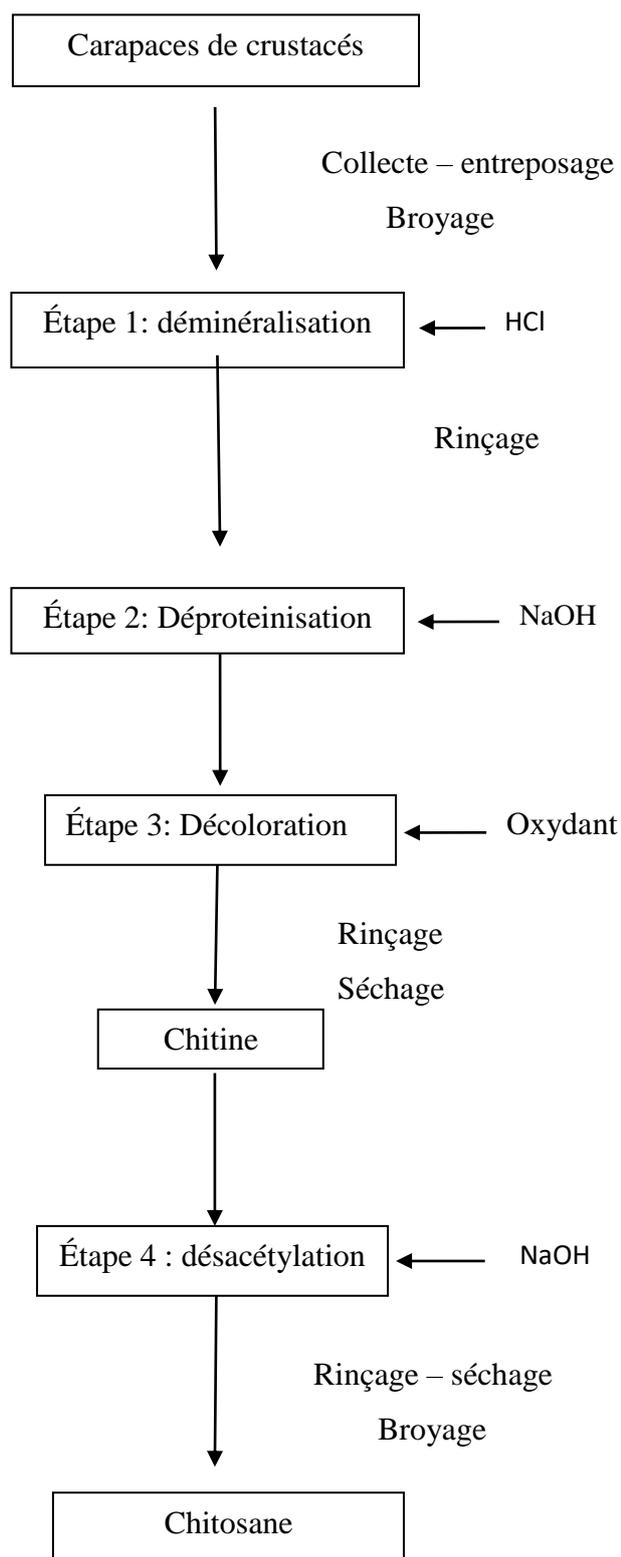
Le chitosane a été obtenu par désacétylation de la chitine extraite par une solution de soude selon le protocole suivant :

- La chitine est traitée avec une solution de soude à 50% puis elle est agitée pendant 24h à  $100^\circ\text{C}$ .
- Au terme de la réaction, la solution est filtrée, le chitosane retenu est lavé en continu, afin d'éliminer la soude résiduelle et jusqu'à ce que le pH de l'eau de lavage atteigne la neutralité ensuite séché à l'étuve à  $80^\circ\text{C}$  pendant 24h (Abdulhadi, 2013).

#### 2.6.2. Préparation des solutions de chitosane

Trois concentrations du chitosane (C1, C2 et C3 dans V1 et V2) ont été préparées en dissolvant la poudre de chitosane dans l'acide acétique (0,1% ;  $\text{pH} = 3,2$ ) et l'eau distillée puis agitées à l'aide d'un agitateur pendant une nuit à 700 tours /min à une température ambiante.

- ✓ V1=25ml ; V2=100ml.
- ✓ C1, C2 et C3 représentent les concentrations 0,5, 0,75 et 1g respectivement dans V1 et V2.



**Figure 5 :** Etapes de préparation de la chitine et du chitosane.

### 2.6.3. Techniques utilisées (effet antibactérien)

Dans notre travail nous avons utilisé deux techniques différentes afin de tester l'effet antibactérien du chitosane sur la plus part des souches isolées du pied diabétique.

- **Diffusion par disque**

C'est la première méthode adoptée dans notre travail, elle est utilisée par certains auteurs **Benjilali et al.(1986)** et **Satrani et al.(2007)** qui a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des produits à tester et de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes. Cette technique repose sur le pouvoir migratoire par diffusion de chitosane à l'intérieur d'une boîte de Pétri, dans un milieu nutritif solide. Dans cette méthode nous avons utilisé des disques à papier Wattman de 9mm de diamètre imprégnés d'une certaine quantité des concentrations de chitosane à testé (C1, C2, C3 dans V1 et V2) (2gouttes par puits, ce qui correspond à 40µL/puits) que nous disposant à la surface d'un milieu gélosé (Muller Hinton) préalablement ensemencé avec une suspension bactérienne.

La densité optique de cette dernière à été préalablement ajustée à l'aide d'un densitomètre (0,5MacFarland) afin d'obtenir une concentration de 10<sup>8</sup>g/ml. La boîte est ensuite fermée et incubée dans l'étuve à 37°C.

Chaque concentration du chitosane diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration de chitosane suffisante qui inhibe leur croissance. A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance bactérienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré et exprimé en mm.

- **Diffusion par puits sur gélose**

La deuxième méthode utilisée est celle de diffusion par puits sur gélose tel que décrite par **Berghe et Vlietinck (1991)**. C'est la technique de base utilisée pour étudier la capacité d'une substance à exercer un effet antimicrobien elle est aussi appelée la technique de dilution en gélose. Dans cette méthode des boites de pétri contenant un milieu Mueller Hinton agar (pour les bactéries) sont ensemencées aseptiquement par une suspension de 10<sup>8</sup>cellules/ml qui provient d'une culture jeune de bactéries, l'ensemencement se fait par écouvillonnage.

Après le séchage des boites, la gélose est perforée au centre à l'aide de la partie supérieure d'une pipette Pasteur stérilisée au bec benzène. Les cavités ainsi formées sont

## Chapitre II Matériels et Méthodes

---

remplies d'une certaine quantité des concentrations de chitosane à tester (C1, C2, C3 dans V1 et V2) (40µL/puits). Les boîtes sont mises à incubées dans une étuve à 37°C pendant 24h. L'action inhibitrice se manifeste par la formation d'une auréole autour des puits. La lecture des résultats s'effectue par mesure des diamètres des zones d'inhibitions. Un produit est considéré actif, si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 8mm (**Ela et al., 1996**).

# Chapitre III

## Résultats et discussion

### III. Résultats et discussion

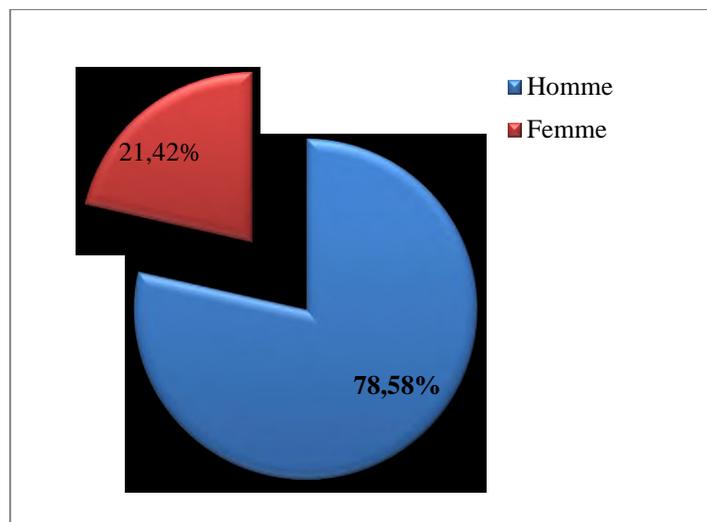
#### III.1. Résultats

##### 1. 1. Répartition des résultats selon les facteurs étudiés

Les résultats effectués sur les 70 prélèvements (patients) ont été établis en fonction des paramètres suivants : le sexe, l'âge, le type de diabète et l'hospitalisation (externe ou interne).

##### 1.1. 1. Selon le sexe

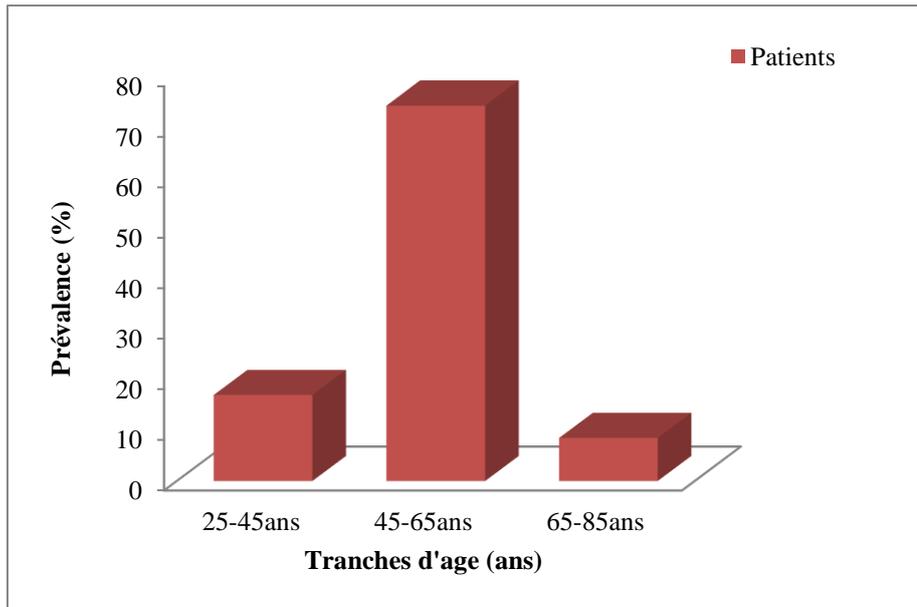
Sur les 70 prélèvements effectués nous avons remarqué une prédominance masculine avec une prévalence de 78,58% alors qu'une fréquence de 34,28% représente les femmes (Figure 6).



**Figure 6:** Répartition des patients en fonction du sexe

##### 1.1.2. Selon les tranches d'âge

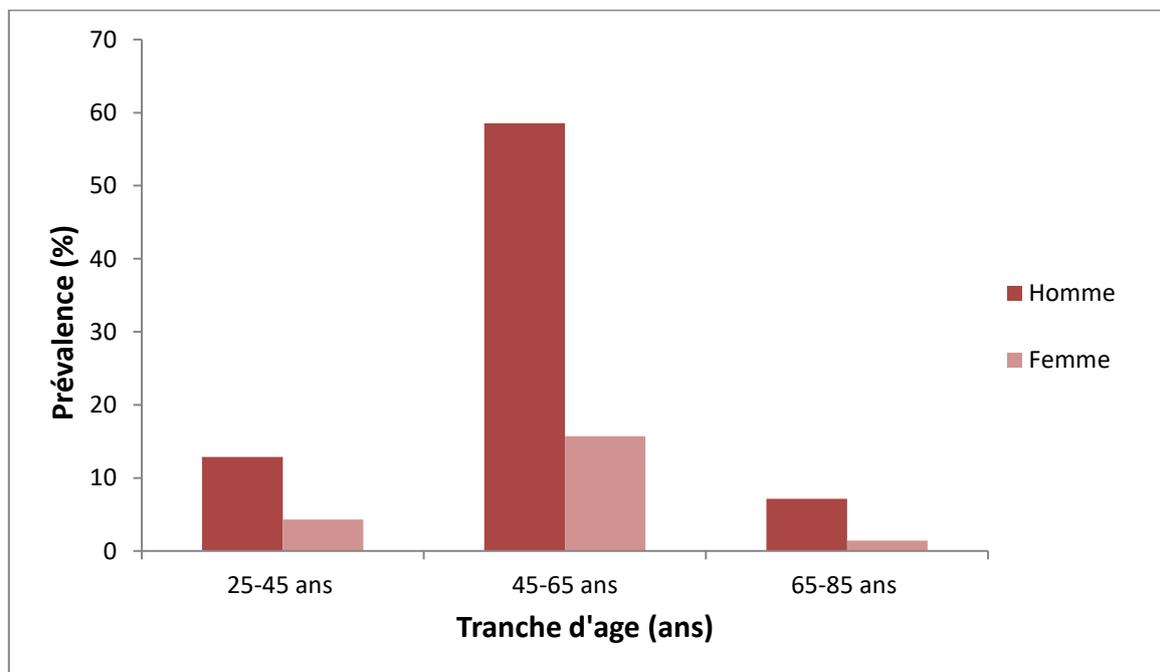
Afin de déterminer la tranche d'âge la plus touchée par les infections du pied diabétique nous avons réparti les patients en tranche d'âge de 20 ans. La figure 7 montre que les personnes les plus touchées par le problème du pied diabétique appartiennent à la tranche d'âge 45-65 ans avec un taux de 74,28% suivi par les patients de la tranche d'âge 25-45 avec une fréquence de 17,14% , les patients âgés de plus de 65 ans occupent la troisième position avec un taux de 8,58%.



**Figure 7:** Répartition des patients en fonction de l'âge

### 1.1.3. Selon le sexe et l'âge

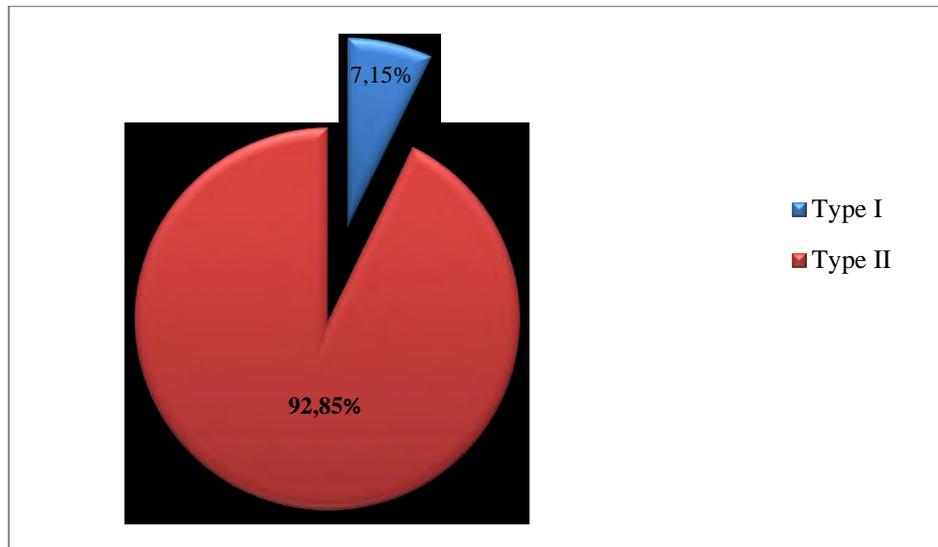
Les résultats obtenus ont montré que les hommes dont l'âge est compris entre 45-65ans représentent le taux de prélèvements le plus élevé avec une fréquence de 58,56%, alors que les femmes de la même tranche d'âge n'affichent qu'un taux de 15,71% (Figure 8).



**Figure 8:** Répartition des patients en fonction du sexe et d'âge

#### 1.1.4. Selon le type de diabète

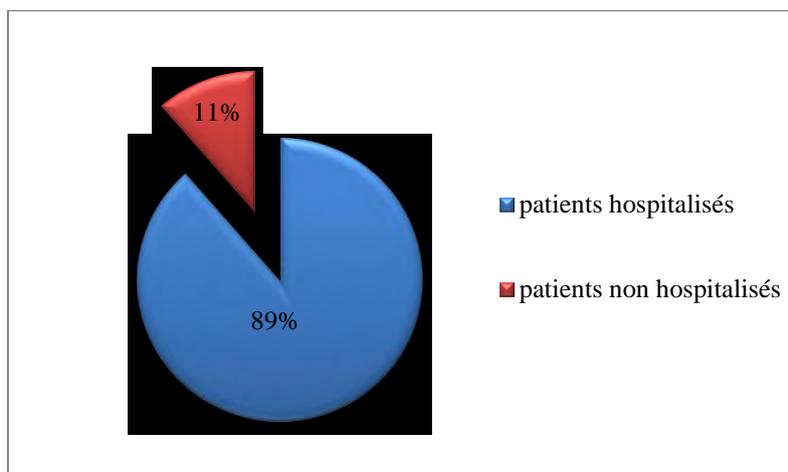
Parmi les 70 patients diabétiques, le diabète de type II est présenté chez 65 patients avec une prévalence de 92,85%. Les 5 autres patients soit 7,15% sont des patients diabétiques de type I (Figure 9).



**Figure 9:** Répartition des patients en fonction du type du diabète

#### 1.1.5. Selon l'hospitalisation

La figure 10 montre que sur les 70 patients 62 sont hospitalisés avec une fréquence de 88,57%, tandis que les 8 patients restants sont non hospitalisés (externes) avec une fréquence de 11,43%.



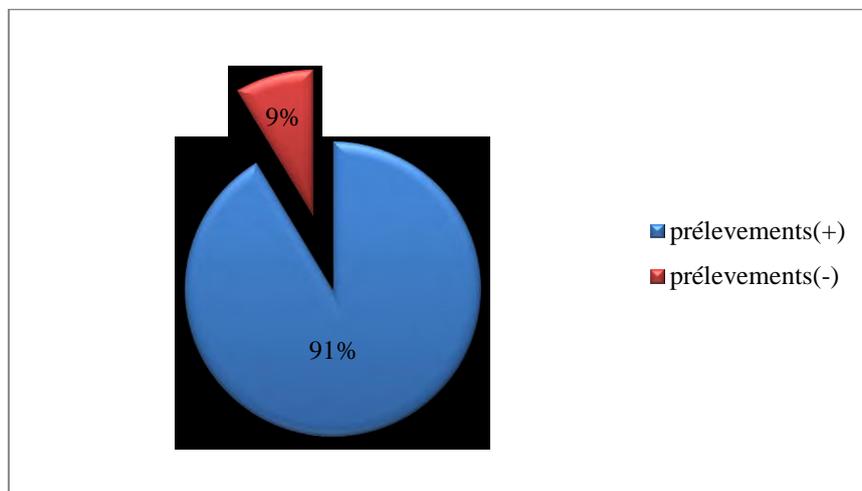
**Figure 10:** Répartition des patients selon hospitalisation et non hospitalisation

## 1.2. Résultats de l'analyse microbiologique

Les résultats de l'analyse microbiologique sont répartis selon les facteurs suivants : prélèvements positifs et négatifs, la nature de la culture bactérienne (monobactérienne ou polybactérienne) et les groupes de germes responsables de l'infection du pied diabétique.

### 1.2.1. Cas positif et négatif de pus

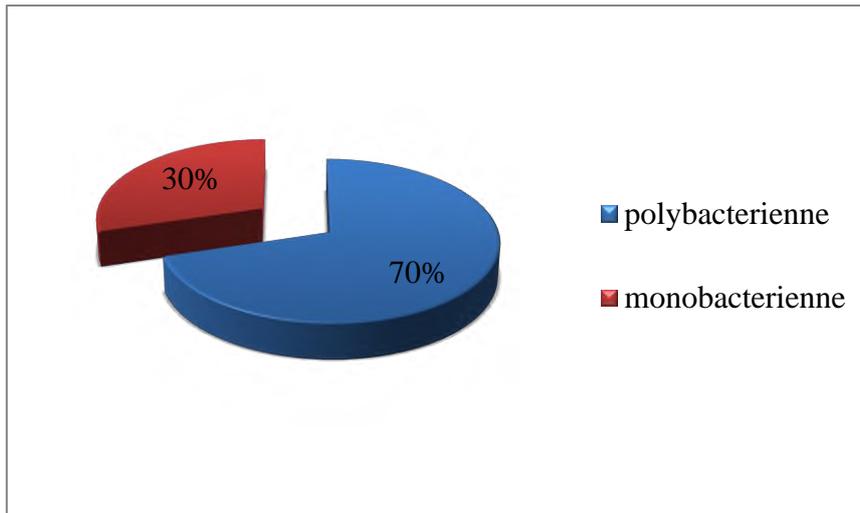
Sur les 70 prélèvements de pus effectués, nous avons recensé 64 prélèvements positifs d'où une présence de germes avec une fréquence de 91,42%, alors que les 6 prélèvements restants sont négatifs avec une prévalence de 8,58% (Figure 11).



**Figure 11:** Répartition des prélèvements positifs et négatifs

### 1.2.2. Selon la nature de cultures obtenues

La répartition des 70 prélèvements selon la nature des cultures obtenues a montré qu'une prévalence de 70,31% est des cultures polybactérienne, par contre les cultures monobactérienne sont les moins dominantes avec une fréquence de 29,69% (Figure 12).

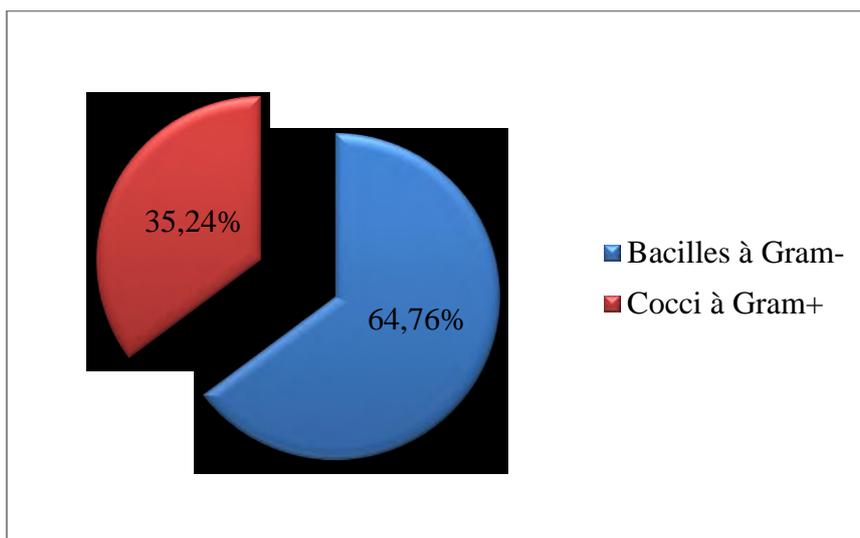


**Figure 12:** Répartition des prélèvements selon la nature des cultures obtenues

### 1.2.3. Groupes de germes identifiés

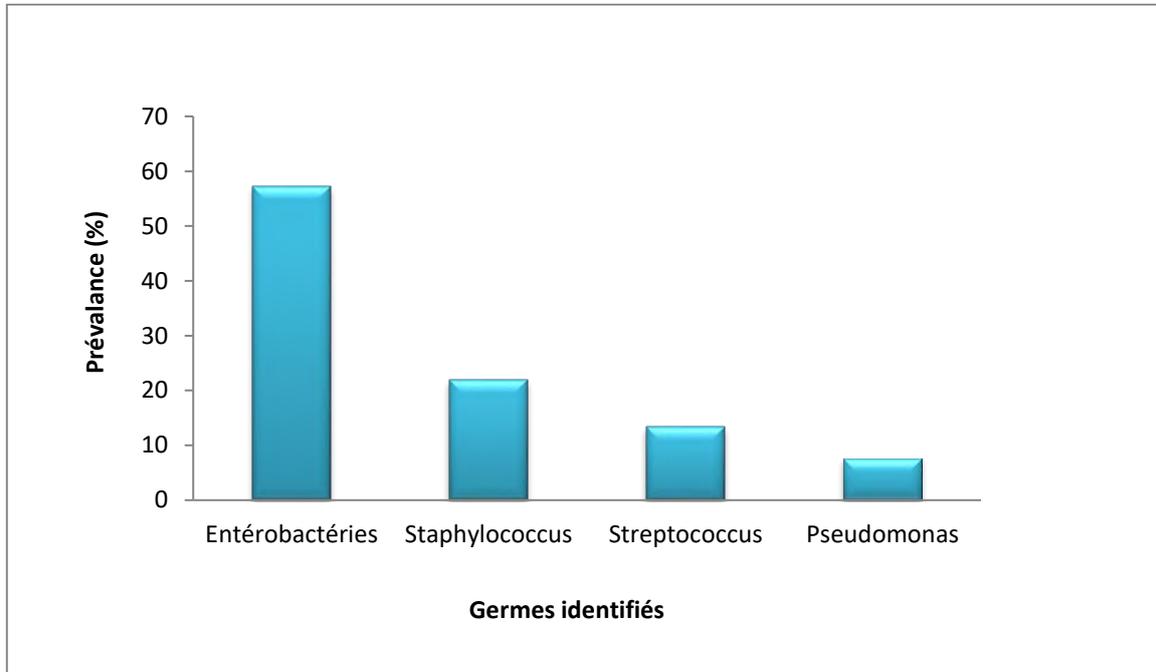
Sur les 105 souches isolées de l'ensemble des prélèvements réalisés, nous avons remarqué une prédominance des bacilles à Gram- avec un effectif de 68 souches alors que les cocci à Gram+ sont moins dominants avec un effectif de 37 souches (Figure 13).

Les résultats obtenus ont montré que les bacilles à Gram- sont les principaux germes responsables de l'infection du pied diabétique avec une fréquence de 64,76% puis les cocci à Gram+ avec un taux de 35,24%.



**Figure 13:** Répartition des résultats selon les groupes de germes identifiés

La répartition des résultats selon les différents germes identifiés ont montré que les entérobactéries prédominent et occupent la première position avec un taux de 57,16%, en second les *Staphylococcus* avec un taux de 21,90% suivi par les *Streptococcus* avec une prévalence de 13,33%.En dernier les *Pseudomonas* avec un taux de 7,61% sont les moins dominants des germes isolés de l'infection du pied diabétique (Figure14)



**Figure14:** Répartition des résultats selon les germes identifiés

#### 1.2.4. Espèces identifiées

D'après les résultats de la répartition globale des espèces (Figure 15), nous avons remarqué que la famille des entérobactéries englobe la plupart des espèces (60 souches) responsables de l'infection du pied diabétique dont *Proteus mirabilis* est l'espèce la plus dominante avec un taux de 14,29%,suivi par *Escherichia coli* avec un taux de 9,55%.*Morganella moragannii* vient en troisième position avec une fréquence de 8,57% suivi par *Klebsiella pneumoniae* avec une fréquence de 5,71%.

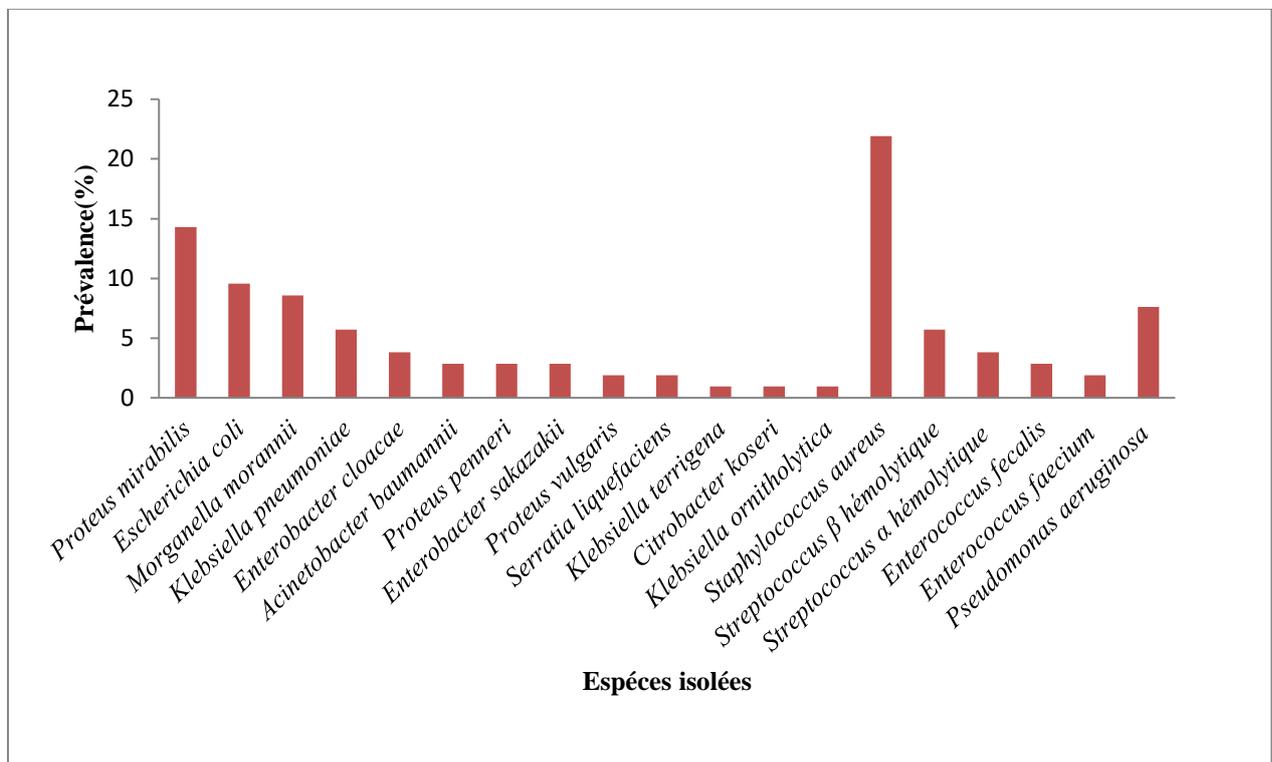
Les espèces restantes des entérobactéries présentent des fréquences moins importantes, dont nous avons noté une fréquence de 3,81% pour *Enterobacter cloacae* et des fréquences comprises entre 2,85% pour *Acinitobacter baumannii*, *Proteus penneri*, *Enterobacter sakazakii* et 1,90% pour *Proteus vulgaris* et *Serratia liquefaciens*.

*Klebsiella ornitholytica*, *Citrobacter koseri* et *Klebsiella terrigena* présentent la fréquence la plus faible est de 0,90%.

Le groupe des Staphylocoques est représenté par *Staphylococcus aureus* qui prédomine toutes les espèces avec un taux de 21,90%.

Concernant le groupe des Streptocoques, quatre espèces ont été identifiées, *Streptococcus β hémolytique* occupe la première position avec un taux de 5,71% suivi par *Streptococcus α hémolytique* avec un taux de 3,80%. En troisième position *Enterococcus faecalis* avec un taux de 2,85% et en dernier *Enterococcus faecium* avec une fréquence de 1,90%.

Le groupe de *Pseudomonas* est représenté par une seule espèce, *Pseudomonas aeruginosa* avec une fréquence de 7,61%.



**Figure 15:**Répartition globale des différentes espèces isolées.

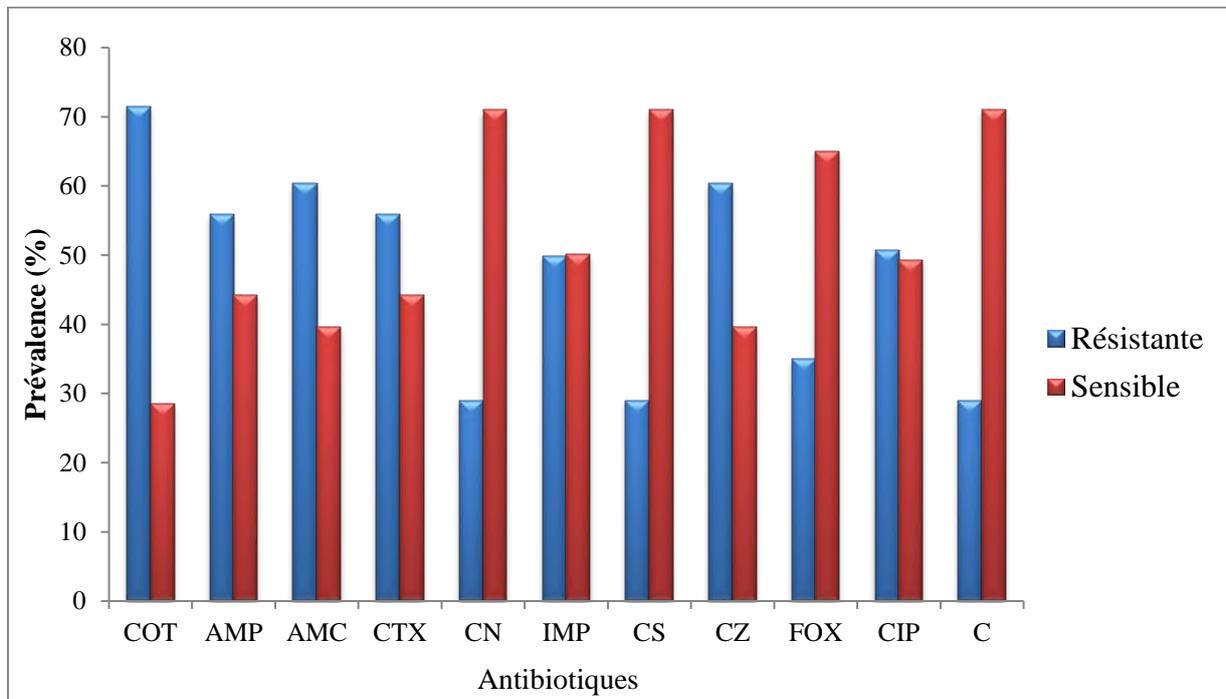
### 1.3. Résultats de l'antibiorésistance

Les résultats de l'antibiogramme de différentes espèces identifiées ont été exprimés par la lecture de diamètre de zone d'inhibition et la comparaison aux valeurs critiques des diamètres d'inhibition de chaque espèce.

- **Entérobactéries**

Les résultats de l'antibiorésistance des souches d'Entérobactéries obtenus (Figure 16) ont montré que sur les 60 souches d'Entérobactéries une résistance élevée à la Cotrimoxazole (COT) avec un taux de 71,54% ,à l'Amoxicilline+Ac.clavulanique (AMC) et la Céfazoline (CZ)avec une fréquence de 60,38% , à la Céfotaxime (CTX) et l'Ampicilline (AMP) avec une prévalence de 55,85%.

Une résistance moyenne a été enregistrée envers la Ciprofloxacine (CIP) (50,68%), l'Imipénème (IMP) (49,61%) et la Céfoxitine (FOX) (34,99%). Une sensibilité élevée des souches a été marquée vis-à-vis la Gentamycine (CN),la colistine (CS), et la Chloramphénicol(C) avec un taux de 71,06%.

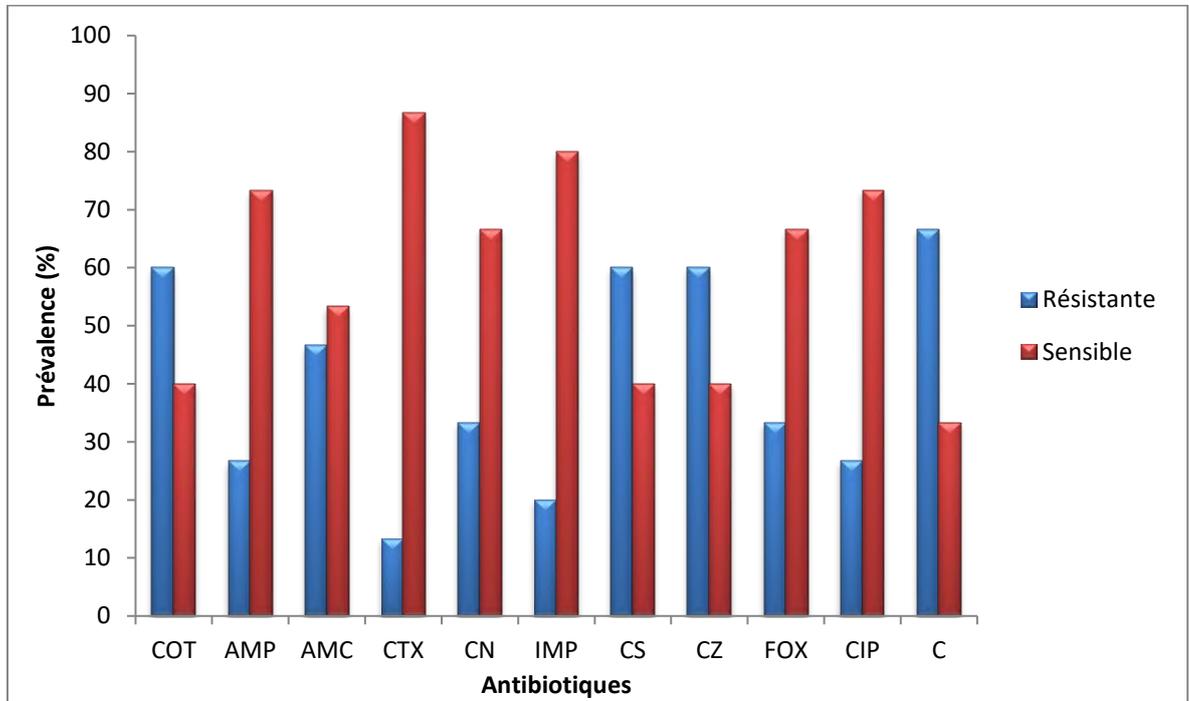


**Figure 16:**Répartition des résultats de l'antibiorésistance chez les Entérobactéries

- ***Proteus mirabilis***

Sur les 15 souches de *Proteus mirabilis* isolées du pied diabétique nous avons noté une sensibilité très élevée envers la Céfotaxime (CTX) (86,67%), l'Imipénème (IMP) (80%), l'Ampicilline (AMP) et la Ciprofloxacine (CIP)(73,34%) ainsi qu'envers la Céfoxitine (FOX) et la Gentamycine (CN) avec une fréquence de 66,67% (Figure 17). Une sensibilité

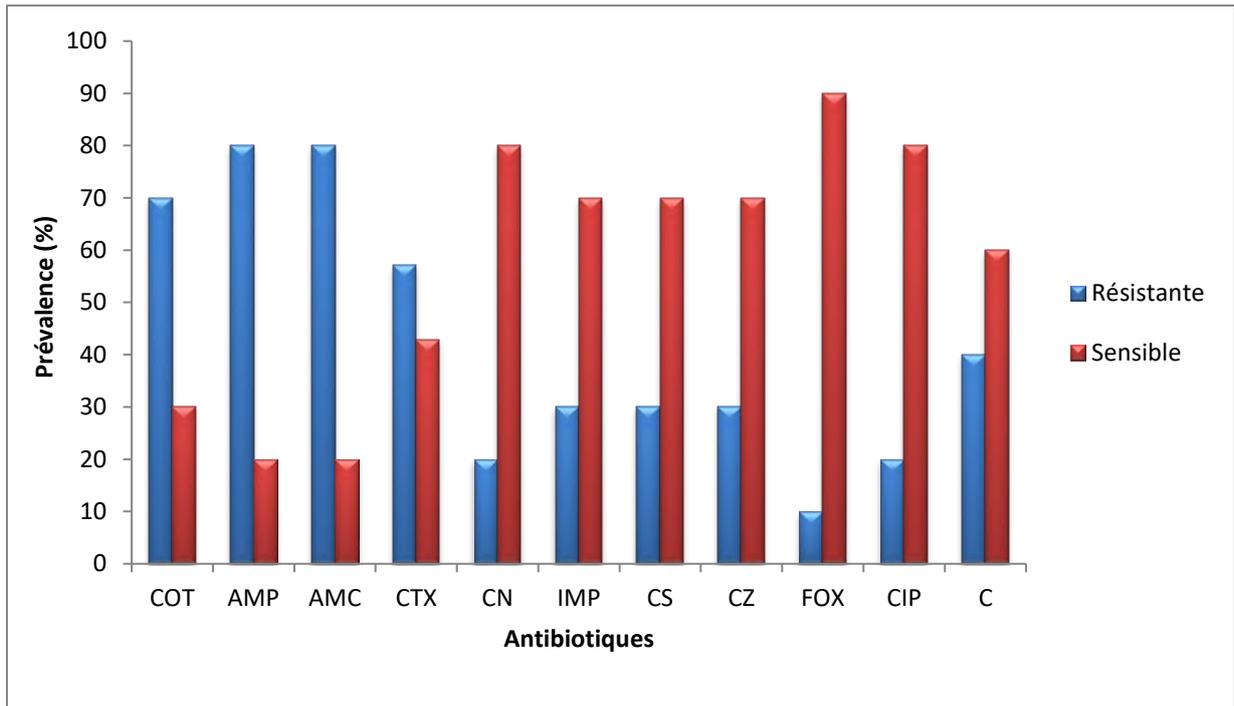
moyenne a été observée vis-à-vis l'Amoxicilline+Ac.clavulanique (AMC) (53,33%). Par contre une résistance élevée 66,66% a été enregistrée vis-à-vis la Chloramphénicol (C) suivi par une résistance à la Cotrimoxazole (COT) la colistine (CS) et la Céfazoline (CZ) avec une prévalence de 60%.



**Figure 17:** Répartition des résultats de l'antibiorésistance chez les souches de *proteus mirabilis*

- ***Escherichia coli***

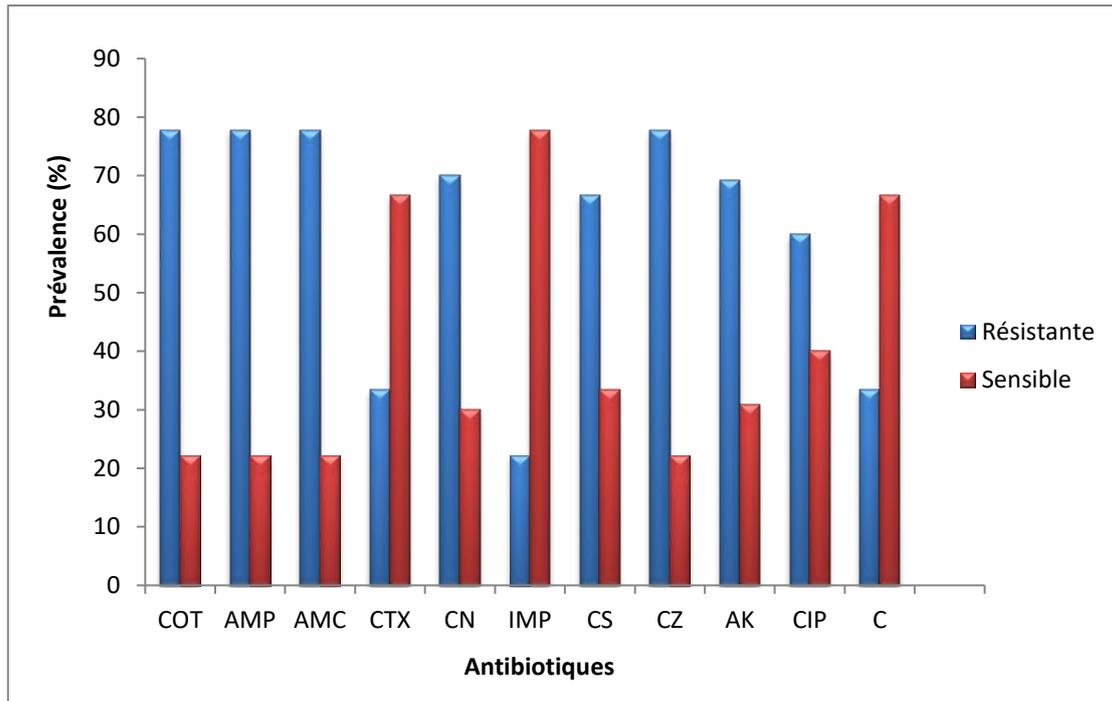
Les 10 souches d'*Escherichia coli* isolées ont montré une résistance très élevée vis-à-vis les  $\beta$ -lactamine l'Amoxicilline+Ac.clavulanique (AMC) et l'Ampicilline (AMP) (80%) et vis-à-vis la Cotrimoxazole (COT) avec une fréquence de 70% (Figure 20). Une résistance moyenne envers la Céfotaxime (CTX) (57,12%) a été aussi enregistrée. Une forte sensibilité a été marquée vis-à-vis la Céfoxitine(FOX) (90%), la Ciprofloxacine (CIP) et la Gentamycine (CN) avec un taux de (80%) ainsi qu'à l'Imipénème (IMP), la Colistine (CS) et la Céfazoline (CZ) avec une fréquence de 70%.



**Figure 18:** Répartition des résultats de l'antibiorésistance des souches *d'Escherichia coli*

- *Morganella morganii*

Les résultats de l'antibiorésistance des 09 souches de *Morganella morganii* obtenus ont montré une résistance élevée (77,77%) à la Cotrimoxazole(COT), l'Ampicilline (AMP), l'Amoxicilline+Ac.clavulanique (AMC) et la Céfazoline (CZ). Suivi par une résistance importante à la Gentamycine (CN) (70%) à l'Amikacine (AK) (69,12%), à la colistine (CS) (66,66%) et à la Ciprofloxacine (CIP) (60%). Cependant une sensibilité élevée envers l'Imipénème (IMP) (77,77%), la Céfotaxime (CTX) et la Chloramphénicol(C) (66,66%) a été enregistrée. Une sensibilité moyenne à la Ciprofloxacine (CIP) (40%) à la Colistine (CS) (33,34%), à l'Amikacine (AK) (30,88%) et à la Cotrimoxazole (la COT), l'Ampicilline (AMP) et à l'Amoxicilline+Ac.clavulanique (AMC) (22,23%) a été observée (Figure 19).

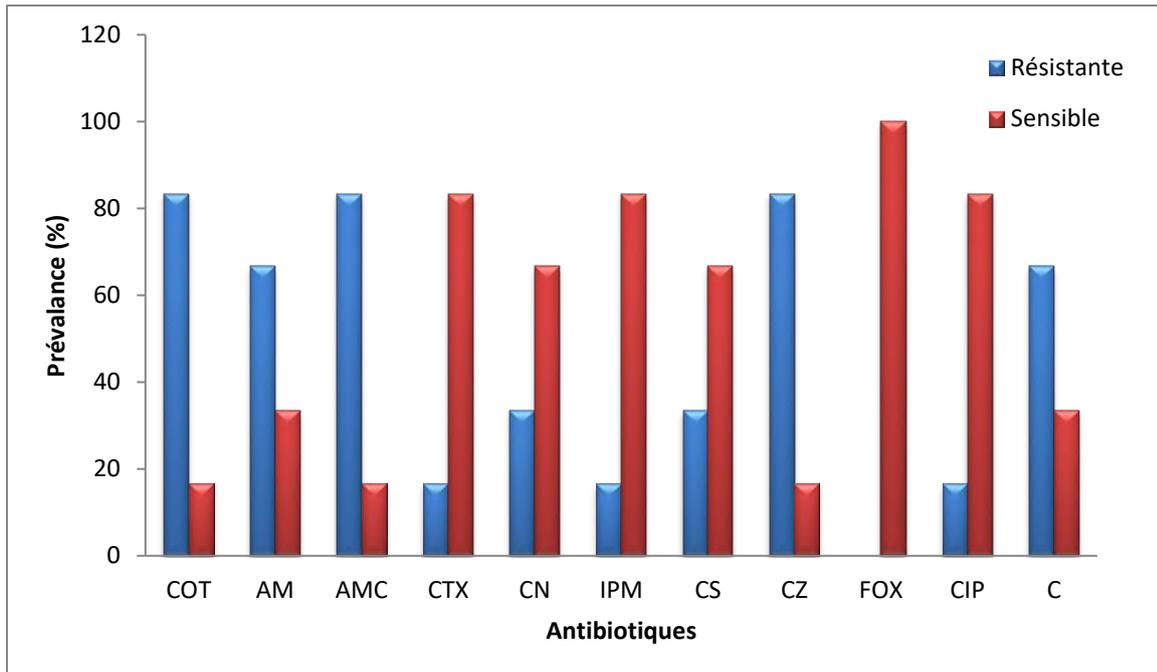


**Figure 19:** Répartition des résultats de l'antibiorésistance des souches de *Morganella morgannii*

- ***Klebsiella pneumoniae***

Les 06 souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées du pied diabétique ont montré une résistance élevée à la Cotrimoxazole (COT), la Céfazoline (CZ) et à l'association Amoxicilline+Ac clavulanique (AMC) avec un taux de 83,33%. Un effectif de 66,66% des souches ont présenté une résistance moyenne à l'Amoxicilline (AM) et la Chloramphénicol (C)

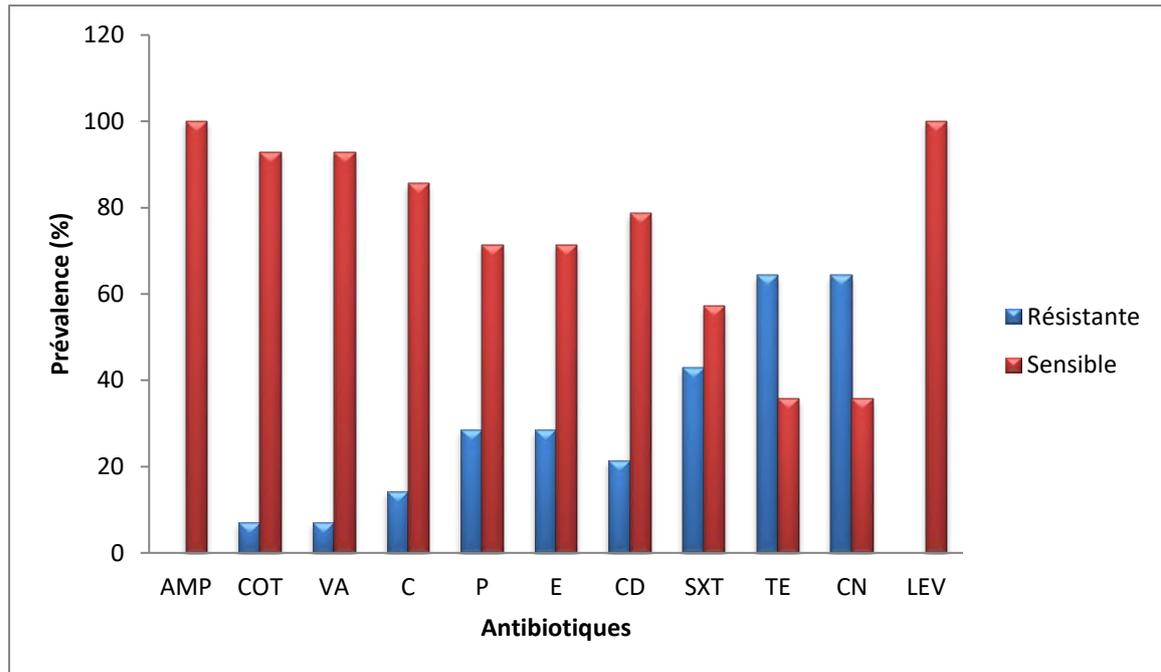
En revanche, nous avons noté une sensibilité totale (100%) au Céfoxitine (FOX), élevée (83,33%) à l'Imipénème (IPM), la Céfotaxime (CTX) et à la Ciprofloxacine(CIP) et moyenne (66,66%) à la Colistine (CS) et à la Gentamycine (CN) (Figure 20).



**Figure 20:**Répartition des résultats de l'antibiorésistance chez les souches de *Klebsiella pneumoniae*

- ***Streptococcus***

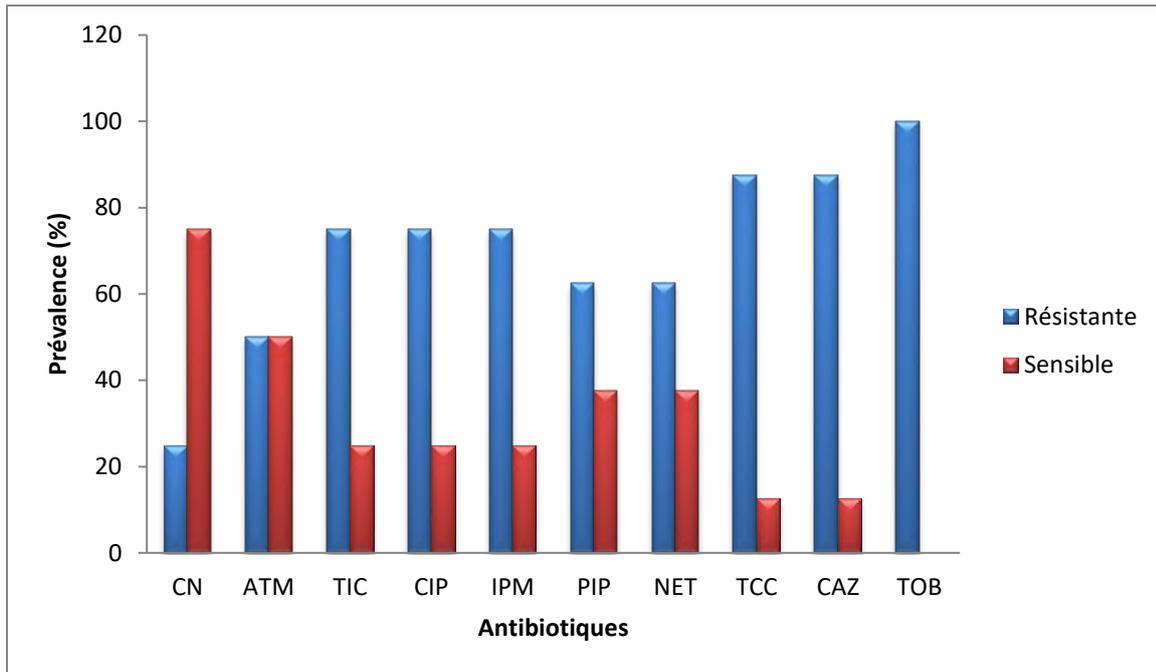
La figure 21 montre que les 14 souches de *Streptococcus* isolées ont une sensibilité très élevée vis-à-vis la Cotrimoxazole (COT), la Vancomycine (VA) (92,85%), la Chloramphénicol (C) (85,71%) et la Clindamycine (CD) (78,57%). Cette importante sensibilité concerne aussi la pénicilline (P) et l'Erythromycine (E) (71,42%).La Triméthoprim+ sulfamides (SXT) présente une sensibilité moyenne (57,14%).Une excellente activité est enregistrée pour l'Ampicilline (AMP) et la Levofloxacin (LEV) qui a marqué une sensibilité totale (100%).Cependant nous avons une résistance moyenne des souches vis-à-vis la Gentamycine (GN) et la Tétracycline (TE) qui ont manifestés le même taux de résistance (64,29%).



**Figure 21:** Répartition des résultats de l'antibiorésistance chez les souches de *Streptococcus*.

- *Pseudomonas aeruginosa*

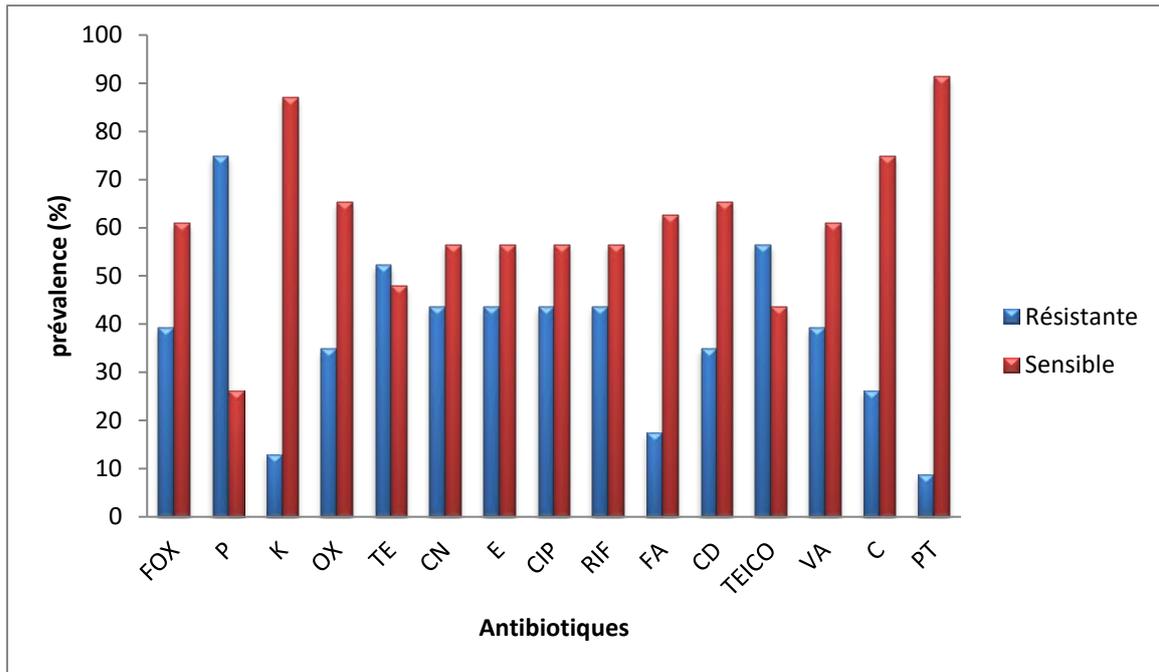
La figure 22 montre que les 08 souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées du pied diabétique sont pratiquement résistantes à une large gamme d'antibiotiques. Nous avons enregistré une résistance totale à la Tobramycine (TOB) (100%) et une forte résistance vis-à-vis la Cifazidime (CZ) et l'association Ticarcilline+ Ac clavulanique (TCC) (87,5%). Cette résistance est aussi mentionnée vis-à-vis l'Imipenème (IPM), la Ciprofloxacine (CIP) et la Ticarcilline (TIC) (75%) de même pour la Netilmicine (NET) et la Piperacilline (PIP) (62,5%). L'Aztreonam (ATM) a enregistré le même taux de résistance et de sensibilité (50%). Cependant une sensibilité élevée est noté uniquement vis-à-vis la Gentamicine (CN) (75%).



**Figure 22:**Répartition des résultats de l'antibiorésistance chez les souches de *Pseudomonas aeruginosa*

- *Staphylococcus aureus*

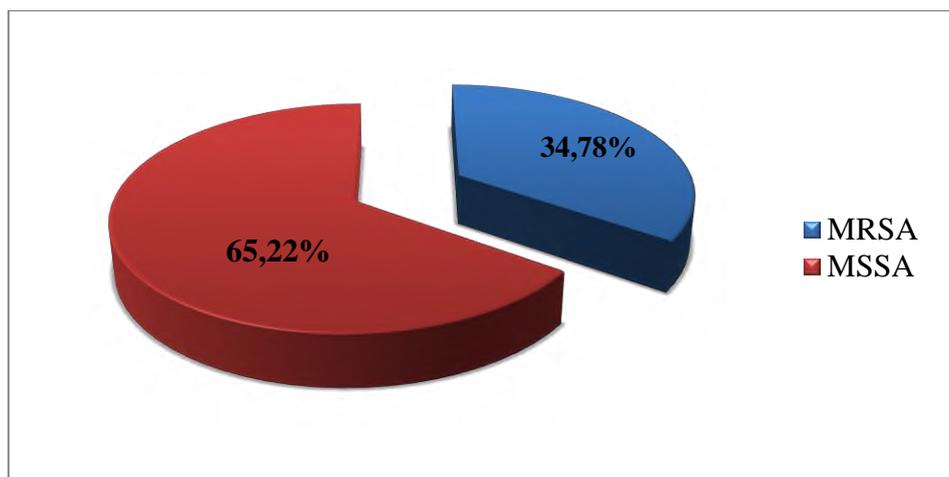
L'antibiogramme des 23 souches de *Staphylococcus aureus* a montré une sensibilité assez élevée vis-à-vis la Pristinamycine (PT)(91,30%), la Kanamycine (K)(86,95%) et la Chloramphénicol (C) (74,91%). Cette importante sensibilité concerne aussi l'Oxacilline (OX), la Clindamycine (CD) (65,21%) et l'Acide fusidique (FA) (62,6%). La Céfoxitine (FOX) et la Vancomycine (VA) ont présenté une sensibilité moyenne avec un taux de 60,86%. La Gentamycine (CN), l'Erythromycine (E), la Ciprofloxacine (CIP) et la Rifampicine (RIF) ont montré le même taux de sensibilité (56,52%). Nous avons signalé une résistance assez marqué pour la Pénicilline (P) (74,91%) et une résistance moyenne pour la Teicoplanine (TEICO) (56,52%) et les Tétracyclines (TE) (52,18%) (Figure 23).



**Figure 23:** Répartition des résultats de l'antibiorésistance chez les souches des *Staphylococcus aureus*

- *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline (MRSA)

Les résultats de l'antibiogramme des 23 souches de *Staphylococcus aureus* isolées ont montré un effectif de 34,78% des souches sont résistantes à la méticilline (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* : MRSA) tandis que les 65,22% restantes sont des souches sensibles à cette molécule (Methicillin-Sensible *Staphylococcus aureus* : MSSA) (Figure 24).



**Figure 24:** Répartition des souches de *Staphylococcus aureus* selon la résistance à la méticilline (MRSA)

#### 1.4 . Etude de l'effet antibactérien de chitosane

L'effet antibactérien des trois concentrations de chitosane C1 (0,5g), C2 (0,75g) et C3 (1g) dans V1 (25ml) et V2 (100ml) a été observé par la mesure de diamètre de zone d'inhibition (DZI).

Les résultats de l'activité antibactérienne du chitosane sur les différentes souches isolées en tenant compte des facteurs suivants (volume (V), concentration (C), méthode utilisée et le groupe bactérien) sont présentés dans les tableaux (3 et 4) et les figures (25, 26 et 27)

- **En fonction de volume**

Les résultats obtenus ont révélé un effet antibactérien remarquable dans les deux volumes testés du chitosane (V1 et V2). En revanche, une meilleure activité antibactérienne a été observée avec le volume V1 par rapport à celui de V2 pour la majorité des souches testées y compris les souches de références. *Staphylococcus aureus* a montré une sensibilité presque totale d'où le diamètre de zone d'inhibition (DZI) est de 64mm (V1) et 56mm (V2), suivi par *Enterobacter cloacae* avec un diamètre de 60mm (V1) et 40mm (V2) .

- **En fonction de la concentration**

-A la plus faible concentration C1 (0,5g dans V1 et V2), nous avons noté un effet antibactérien pour la majorité des souches étudiées mais l'espèce qui a montré une grande sensibilité est *Staphylococcus aureus* dont le DZI est de 40 et 37mm, respectivement. Concernant la concentration C2 (0,75g dans V1 et V2), nous avons observé un diamètre d'inhibition plus important que la concentration C1 pour la majorité des souches testées.

-A la plus grande concentration C3 (1g dans V1 et V2), nous avons constaté que l'activité antibactérienne du chitosane augmente en augmentant la dose pour la majorité des souches testées.

Ces résultats expérimentaux ont montré que le chitosane est actif sur toutes les souches testées à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter sakazakii* qui ont montré une résistance pour toutes les concentrations testées. *Klebsiella terrigena* et *Enterobacter cloacae* ont révélé une résistance totale seulement avec les trois concentrations du volume V2.

**Tableau 3:** Effet antibactérien du Chitosane sur les différentes souches isolées du pied diabétique par la méthode de diffusion par puits

Souches	Zone d'inhibition méthode de diffusion par puits (mm)					
	Concentration (g/25ml)			Concentration (g/100ml)		
	0,5g/25ml	0,75g/25ml	1g/25ml	0,5g/100ml	0,75g/100ml	1g/100ml
<i>Serratia liquefaciens</i>	35	44	49	27	38	40
<i>Enterobacter cloacae</i>	26	37	60	R	R	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	31	43	55	28	38	43
<i>Proteus mirabilis</i>	31	44	55	26	40	51
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Enterococcus faecium</i>	37	53	56	32	45	50
<i>Staphylococcus aureus</i>	40	59	64	37	49	56
<i>Proteus vulgaris</i>	24	47	55	20	41	50
<i>Acinetobacter baumannii</i>	30	33	46	16	30	40
<i>Escherichia coli</i>	21	28	39	19	22	34
<i>Enterobacter sakazakii</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Klebsiella terrigena</i>	33	40	47	R	R	R
<i>Citrobacter koseri</i>	30	47	55	18	22	46
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	R	R	R	R	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	30	47	58	27	35	52
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	21	35	49	18	35	40



(A)



(B)



(C)



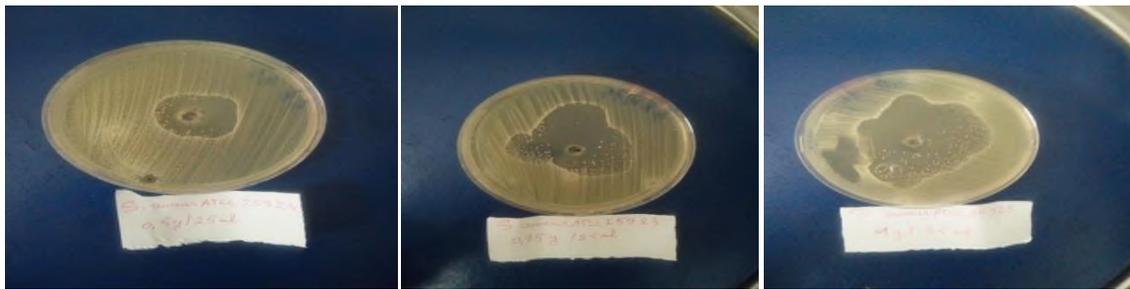
(D)



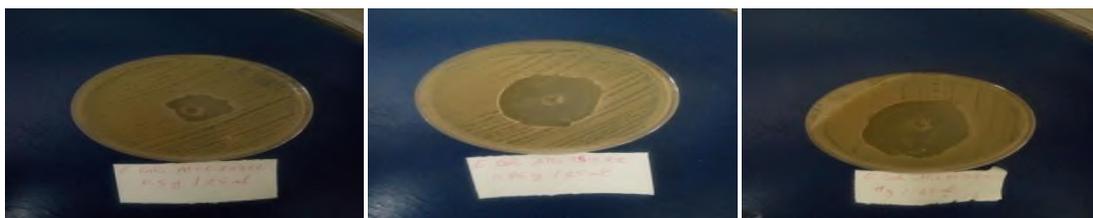
(E)



(F)



(G)



(H)

**Figure 25:** Activité antibactérienne du chitosane sur les différentes souches isolées du pied diabétique avec les concentrations C1,C2 et C3 respectivement dans V1 par la méthode de diffusion par puits A) *Staphylococcus aureus* ; B) *Proteus mirabilis* ;C) *Serratia liquefaciens* ; D) *Klebsiella pneumoniae* ; E) *Proteus vulgaris* ; F) *Escherichia coli* ; G) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ;H) *Escherichia coli* ATCC 25922.



(A)



(B)



(C)



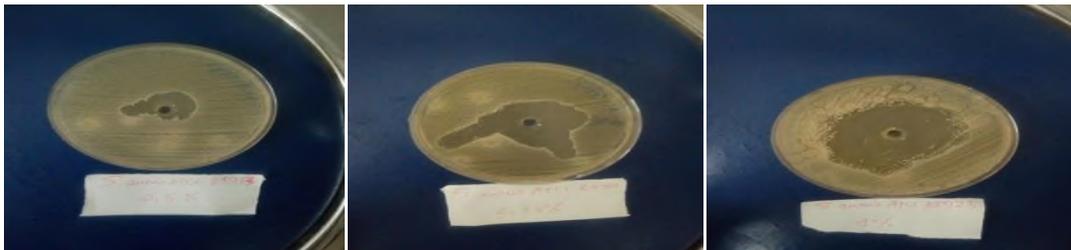
(D)



(E)



(F)



(G)



(H)

**Figure 26:** Activité antibactérienne du chitosane sur les différentes souches isolées du pied diabétique avec les concentrations C1,C2 et C3 respectivement dans V2 par la méthode de diffusion par puits A) *Staphylococcus aureus* ; B) *Proteus mirabilis* ;C) *Serratia liquefaciens* ; D) *Klebsiella pneumoniae* ; E) *Proteus vulgaris* ; F) *Escherichia coli* ; G) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ;H) *Escherichia coli* ATCC 25922.

• **En fonction de la méthode utilisée**

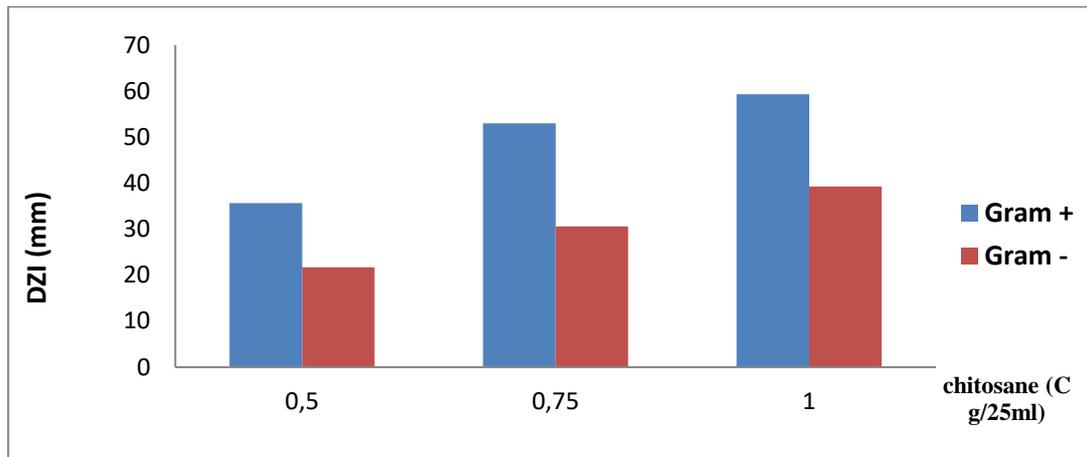
Les résultats comparatifs de la méthode de diffusion par disques et la méthode de diffusion par puits sur gélose obtenus ont montré qu'une meilleure activité antibactérienne du chitosane a été observée avec la méthode de diffusion par puits. D'après les tableaux 3 et 4, l'ensemble des souches isolées du pied diabétique ont montré une meilleure sensibilité avec la méthode de diffusion par puits par rapport à celle de diffusion par disque. *Staphylococcus aureus* a montré une sensibilité remarquable vis-à-vis toutes les concentrations du chitosane testées notamment la concentration C3 (dans V1 et V2) dont le DZI est de 64mm (V1) et 56mm (V2) avec la méthode de diffusion par puits alors que des DZI de 18mm (V1) et 14mm (V2) ont été observé avec la même concentration du chitosane dans la méthode de diffusion par disque.

**Tableau 4 :** Activité antibactérienne du chitosane sur les souches isolées du pied diabétique par la méthode de diffusion par disque

Souches/concentrations	Concentrations de chitosane Diffusion par disques (mm)					
	Concentration (g/25 ml)			Concentration (g/100 ml)		
	0.5g/25 ml	0.75g/2 ml	1g/25 ml	0.5g/100 ml	0.75g/100 ml	1g/100 ml
<i>Serratia liquefaciens</i>	13	15	17	10	12	14
<i>Enterobacter cloacae</i>	15	17	20	13	15	18
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	20	23	12	12	18
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	16	18	10	12	14
<i>Proteus mirabilis</i>	18	20	23	15	18	20
<i>Escherichia coli</i>	17	19	20	13	15	20

- **En fonction de groupe bactérien**

La figure 27 représente les moyennes des diamètres de zone d'inhibition mesurée dans V1 chez l'ensemble des bactéries à Gram+ et à Gram-. Les résultats ont montré une différence de la sensibilité entre les deux groupes bactériens dont nous avons constaté que le chitosane a un effet antibactérien plus important sur les bactéries à Gram+ que sur les bactéries à Gram-. Chez les bactéries à Gram+ la moyenne de DZI est de 35,66mm (C1), 53mm (C2) et 59,33mm (C3) alors que chez les bactéries à Gram-, les DZI sont respectivement de 21,69mm, 30,61mm et 39,23mm.



**Figure 27:** La moyenne de diamètre de zone d'inhibition mesurée en fonction de concentrations du chitosane testée chez certaines bactéries à Gram- et les bactéries à Gram+





### III.2. Discussion

Au cours de notre étude et sur les 70 prélèvements de pus traité 64 cas sont positifs soit un taux de 91,42%, les 6 prélèvements restant sont négatifs avec une fréquence de 8,58%. Selon **Ha Van (2002)** les prélèvements bactériologiques des plaies du pied diabétique sont dans la plupart des cas positifs. Dans cette étude les cultures négatives peuvent être expliquées soit par :

- La quantité de prélèvement : les prélèvements superficiels à l'écouvillon sont moins précis et souvent contaminé par une flore banale de surface (**HA Van, 1994**).
- Une prescription d'antibiotique fait augmenter dans plusieurs cas le taux des cultures négatives; selon **Grimaldi (2005)** si l'antibiothérapie est installée en urgence avant les résultats de prélèvement elle est dite (probabiliste) c'est-à-dire susceptible de couvrir tous les germes probablement en cause et donc à large spectre.
- Il peut s'agir aussi d'un germe exigeant qui nécessite des milieux de cultures spéciaux et une atmosphère spéciale (**Denis et al., 2007**).

La répartition des sexes a été très hétérogène dans notre série avec une nette prédominance des hommes (78,58% hommes pour 21,42% de femmes). Nos résultats sont comparables à ceux de **Zouhair (2014)** qui a objectivé une prédominance des hommes avec un taux de 72,18% mais différents de ceux trouvés par **Samake (2005)** à Mali et **Diagne (2001)** à Dakar qui ont rapporté respectivement 63% et 55% en faveur des femmes. Les diabétiques du sexe masculin auraient 2 fois plus de risque de développer un pied diabétique que les diabétiques du sexe féminin. Selon **Grimaldi (2005)** la prédominance masculine peut être expliquée par :

- Le port des chaussures fermées toute la journée dans lesquelles la transpiration est importante crée un environnement chaud et humide favorable pour une prolifération microbienne. Des chaussures inadaptées sont considérées comme la cause principale des ulcères du pied chez le diabétique (**Kavan, 2004**).
- Les risques professionnels associés aux emplois occupés par les hommes. Ces derniers occupent plus souvent des emplois dangereux ou difficiles physiquement, des secteurs où le risque de blessure découlant d'un traumatisme est plus important. D'après **Mohamed (2008)**, les hommes sont plus disposés à avoir des lésions à cause de l'hyperactivité qui les caractérise par rapport au sexe opposé.

## Résultats et Discussion

---

- La différence de comportement vis-à-vis du tabac entre les hommes et les femmes peut expliquer le taux élevé des infections du pied chez le sexe masculin. Selon **Bertoglio (2004)**, un diabétique fumeur multiplie les facteurs de risque vasculaire. D'après les travaux de **Ferdenrich et al. (2004)**, le tabac intervient dans l'installation et la progression de l'artériopathie des membres inférieurs.
- Le fait que les femmes sont plus assidues et minutieuses dans les soins (**Younes, 2016**).

Dans notre étude, les diabétiques de type II ont été beaucoup plus nombreux que ceux de type I. En effet, 92,85% de nos patients ont présenté un diabète de type II alors que 7,15 % des patients sont de type I. Nos résultats sont conformes aux données de CHU d'Oran qui ont rapporté une fréquence de 92,11% des patients atteints de diabète type II. Cette répartition qui a montré une nette prédominance du diabète de type II, est bien conforme aux proportions habituellement observées dans la population générale qui placent le taux de prévalence du diabète de type II à plus de 90% de l'ensemble des diabétiques dans le monde (**Lange, 2004**).

Selon **Annick (2012)** le nombre de personnes diabétiques type II connaît une forte hausse en raison essentiellement de l'augmentation de la prévalence du surpoids, la réduction de l'activité physique, l'urbanisation croissante ainsi que du vieillissement de la population par allongement de la durée de vie des patients. A noter qu'au CHU Med VI Marrakech, le diabète de type I a été prédominant d'un taux de 65% (**Bertal et al., 2009**). Cela est peut être dû à un biais de recrutement : l'échantillon de départ est choisi au hasard en faveur des diabétiques type I.

Concernant la tranche d'âge, les résultats obtenus au cours de notre étude ont montré que la tranche d'âge la plus touchée par le problème du pied diabétique est celle de 45 à 65ans (74,28%). Ce résultat est similaire à celui de **Boutoille et al. (2000)** ont trouvé que les patients appartenant à la tranche d'âge de 45 à 65 ans sont les plus concernés par les ulcères du pied diabétique. Tandis que les données de **Halmi et al. (1993)** ont montré que la fréquence des lésions du pied chez ces patients dans les pays développés concerne la population de plus de 65ans, alors que certaines études surtout en Afrique ont trouvé une moyenne d'âge entre 50 et 55 ans (**Sano, 1999**).

## Résultats et Discussion

---

Selon **Zouhair (2014)** l'apparition des complications chroniques (artériopathie et neuropathie) de diabète survient chez les patients âgés de plus de 45 ans. En effet, le risque de survenue et de surinfection des lésions trophiques du pied diabétique augmente avec l'âge (**Got, 2008**). D'après **Sano (1999) et Dorsey et al. (2009)** l'âge avancé est un facteur classique de risque vasculaire et d'immunodépression ou par le fait que les diabétiques âgés vivent, dans la plupart des cas, seuls et leur acuité visuelle est diminuée, ils vont être donc victimes de traumatismes au niveau des pieds surtout si leurs mouvements sont limités.

Au sein de notre étude, sur les 70 patients étudiés, 62 sont hospitalisés avec une fréquence de 88,57%. Contrairement à une étude faite au Maroc à l'hôpital militaire de Rabat qui a marqué une fréquence de 7,5% des patients hospitalisés. Selon **Senneville (2008)** l'infection du pied diabétique représente la cause d'environ un quart des hospitalisations des patients diabétiques. Une étude a démontré que le risque d'hospitalisation est 56 fois plus important pour les patients diabétiques présentant une infection du pied que pour ceux qui en étaient exempts (**Lavery, 2006**). D'après **Lipsky et al. (2004)** la sévérité de l'infection jugée par son retentissement vital et fonctionnel et la nécessité de recourir à une antibiothérapie par voie parentérale, constituent les principales indications à l'hospitalisation au cours des infections du pied diabétique. Le risque de survenue d'un trouble trophique du pied peut atteindre 25% des patients diabétiques au cours de leur vie. Ce risque élevé est la conséquence de plusieurs mécanismes physiopathologique dont la neuropathie diabétique qui est très fréquente et responsable de 60 à 80% des ulcères. Elle multiplie par 16 le risque d'hospitalisation des patients diabétiques (**Blanc, 2001**).

Les traumatismes dus à la neuropathie sont indolores et parfois minimes (frottements dans les chaussures, chocs, brûlures, coricides, etc.) et vont conduire à un retard diagnostique des lésions et à une négligence, sources de conséquences lésionnelles sévères, ce qui nécessite une hospitalisation en urgence (**Lushiku, 2006**). Du fait d'importants délais de cicatrisation, les lésions ulcérées du pied nécessitent souvent des hospitalisations très prolongées, suivies de soins ambulatoires et d'interruption d'activité prolongés (**Peter et al., 1996**).

L'infection du pied diabétique est une complication fréquente et redoutable. Elle constitue un facteur de risque majeur d'amputation (**Lipsky, 2012**). Selon le **Groupe International de Travail sur le Pied Diabétique (2011)**, 70% de toutes les amputations des membres inférieurs sont réalisés chez les personnes diabétiques et 85% de toutes les amputations sont précédées par un ulcère et près de 70% de ces sujets décèdent dans les cinq

## Résultats et Discussion

---

ans qui suivent l'amputation (**Bakker et al., 2011**). La plupart des auteurs s'accordent à ce que le diabétique amputé soit candidat à d'autres amputations itératives en particulier du membre controlatéral en moyenne 42% sont amputés à la jambe. Dans une étude américaine, 56% des diabétiques amputés d'un orteil seront réopérés dans l'année (**Lipsky, 2012**).

La répartition des 70 prélèvements selon la nature des cultures obtenues a montré que 70,31% sont des cultures polybactériennes. Ce résultat est presque équivalent à celui retrouvé dans la série du CHU du Sétif avec un taux de 83% et au CHU de Strasbourg avec une fréquence de 60% qui représentent une flore polymicrobienne (**Hannat, 2008**). Par contre une étude menée par **Guira et al. (2015)** à Ouagadougou (Burkina Faso) a trouvé que sur 71 échantillons, 85,5% de cultures ont été monobactériennes. Selon **Lipsky et al. (2004)** l'infection du pied diabétique est la plupart du temps polybactérienne avec trois à six souches par lésion, et inclut les bacilles Gram+, Gram- et les anaérobies, surtout dans les cas chroniques.

Les résultats de l'analyse bactériologique de l'ensemble des prélèvements réalisés ont montré que les bacilles à Gram négatif (BGN) sont les principaux germes responsables de l'infection de pied diabétique avec un taux de 64,76%. Parmi les BGN nous avons noté la prédominance des Entérobactéries qui représentent un taux de 57,16% suivi par les *Pseudomonas* avec un taux de 7,61%. Notre étude est similaire à une étude prospective réalisée à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V, qui a objectivé la prédominance des BGN avec une fréquence de 61,2% (**Ge et al., 2002 ; Shankar et al., 2005**). Selon **Hannat (2008)** les BGN sont responsables de la majorité des infections du pied (64,4%) avec une dominance des Entérobactéries. D'après les études de **Toumi et al. (2011)** les Entérobactéries sont essentiellement rencontrées en cas d'infections chroniques ou déjà traitées par des antibiotiques. *Pseudomonas aeruginosa* peut être isolée dans certaines conditions (hospitalisation de longue durée, pansements humides).

La répartition des BGN est liée à des facteurs environnementaux climatiques, à la prise préalable d'antibiotiques ou aux pratiques d'hygiène personnelle ou de chaussage (**Uçkay et al., 2014**). Des facteurs techniques de prélèvements ou de culture pourraient également être à l'origine de cette répartition des BGN.

Concernant le groupe des cocci à Gram positif le taux d'isolement est moins important avec 35,24%. Dans ce groupe, *Staphylococcus aureus* est la bactérie la plus souvent mise en évidence avec un taux de 21,90% suivi par les *Streptococcus* avec une fréquence de 13,33%.

## Résultats et Discussion

---

Nos résultats sont presque équivalents à ceux de **Noviello et al. (2012)**, ont trouvé une prédominance des cocci à Gram positif avec un taux de (32,39%) dominé par *Staphylococcus aureus* avec une fréquence de 20,14% et *Streptococcus* avec un taux de 13,7%. Selon **Uçkay et al. (2014)** les infections communautaires légères sont surtout causées par des coques à Gram positif aérobies, en particulier *Staphylococcus aureus* et dans une moindre mesure, par des streptocoques (souvent du groupe B).

D'après nos résultats la famille des Entérobactéries englobent la plupart des espèces responsables de l'infection du pied diabétique, dont *Proteus mirabilis*, *Escherichiacoli*, *Morganella moragannii* et *Klebsiella pneumoniae* sont les espèces les plus dominantes avec des taux de 14,29%, 9,55%, 8,57% et 5,71% respectivement. *Proteus mirabilis* est l'espèce la plus fréquemment retrouvée parmi les BGN et la deuxième parmi tous les germes. Ces résultats sont proches de ceux rapportés à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V, où *Proteus mirabilis* est le deuxième pathogène le plus fréquemment isolé, après *Staphylococcus aureus*, avec un taux d'isolement de 12,2%. D'après l'étude de **Bernard et al. (2011)** au cours des infections du pied diabétique les bacilles aérobies à Gram- sont isolées. Parmi ces BGN les Entérobactéries (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Morganella moragannii*, *Klebsiella ssp*, *Serratia ssp* et *Citrobacter ssp*,) sont retrouvés surtout en cas d'infection chronique.

Dans le groupe des cocci à Gram positif (CGP) la prédominance revient à *Staphylococcus aureus* avec un taux de 21,90%. Ce taux est proche à celui rapporté par une étude réalisée à Marrakech par **Youness (2016)** et au CHU de Sétif où *Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus fréquemment isolée avec des taux de 20,2% et 17,28% respectivement. Selon **Stahl et al. (2007)** *Staphylococcus aureus* est la bactérie la plus souvent mise en évidence dans les infections du pied diabétique de façon isolée ou au sein d'une population polymicrobienne.

Au sein du même groupe les Streptocoques qui occupent la deuxième position sont représentées par quatre espèces *Streptococcus β hémolytique*, *Streptococcus α hémolytique*, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* avec des taux de 5,71%, 3,80%, 2,85% et 1,90% respectivement. Les souches de *Streptococcus spp* sont reconnues parmi les principaux pathogènes de l'infection du pied diabétique (**Rao et al., 2007**). Selon **Catherine et al. (2005)** les infections sévères du pied diabétique, surtout celles à Streptocoque du groupe B surviennent souvent sur un terrain fragilisé par l'immunodépression et l'artériopathie.

## Résultats et Discussion

---

Concernant le dernier groupe des *Pseudomonas*, il est représenté par une seule espèce, *Pseudomonas aeruginosa* avec une fréquence de 7,61%. Ce résultat est proche à celui rapporté par **Youness (2016)** avec un taux de 6,7%. Cette bactérie est isolée avec des taux plus élevés dans les études menées dans des pays comme l'Inde et la Turquie (**Turhan et al., 2013**). *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie ubiquitaire de l'environnement qui doit être considérée la plupart du temps comme non pathogène. Cependant, elle est isolée après des hospitalisations de longue durée, l'application de pansements humides, des bains de pieds ou le port de bottes en caoutchouc (**Lipsky et Pecoraro, 1990**), et peut être à l'origine d'infections graves sur des terrains fragilisés (**Toumi et al., 2011**). D'après **Zouhair (2014)** leur présence semble plus fréquente en cas d'ostéomyélite ou de nécrose.

L'étude de l'antibiorésistance de différentes souches bactériennes ont montré que ces bactéries ont développé des mécanismes de résistance, leur confèrent une résistance aux antibiotiques, ce qui pose un problème majeur dans la thérapeutique. Les résultats de l'antibiogramme ont montré que les Entérobactéries présentent une large résistance aux  $\beta$ -Lactamines notamment à l'Amoxicilline+Ac.clavulanique (AMC) et la Céfazoline (CZ) (60,38%) et à l'Ampicilline (AMP) (55,85%). Ceci est probablement dû à la production des  $\beta$ -Lactamases. Selon **Livermore (2003)** chez les Entérobactéries, la production de  $\beta$ -lactamases est le mécanisme prédominant de résistance aux  $\beta$ -lactamines. Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes hydrolysant les  $\beta$ -lactamines en ouvrant le cycle bêtalactame et menant à la perte d'un groupement carboxyle, provoquant l'inactivation de l'antibiotique en question (**Ambler, 1980**). La Gentamycine (CN), la Colistine (CS), et la Chloramphénicol (C) sont en général les antibiotiques les plus efficaces avec un taux de sensibilité de 71,06%. Par conséquent ces observations sont tout à fait en accord avec celles rapportées par l'étude de **Turhan et al. (2013)**. D'après **Ha Van (2008)** dans les infections du pied diabétique, l'ensemble des entérobactéries est plus au moins résistants à l'AMC et sensible à l'IMP et la CN. *Proteus mirabilis* par son phénotype sauvage est naturellement sensible à toutes les  $\beta$ -lactamines.

Les 15 souches de *Proteus mirabilis* isolées dans notre série possèdent une sensibilité à toutes les  $\beta$ -lactamines sauf la Céfazoline (CZ) qui a donné un phénotype résistant (60%), ceci qui peut être due à une mutagénèse ou un transfert de gènes exprimant une céphalosporinase inhibant l'antibiotique (**Goubau et Gompel, 2000**). Une bonne sensibilité et

## Résultats et Discussion

---

aussi observée avec les Aminocyclitolides (CN) et l'association Amoxicilline+Ac.clavulanique (AMC), ces résultats sont comparables à ceux de **Mandaci (2015)**.

Les 10 souches isolées de *Escherichia coli* ont montré une forte sensibilité aux  $\beta$ -lactamines (FOX, IMP, CZ, CS), aux Aminocyclitolides (CN) et aux Quinolones (CIP). Ces résultats sont proches à ceux obtenus par **Hamdan et al. (2011)**.

*Escherichia coli* est une bactérie qui appartient au groupe 1 des Entérobactéries qui sont naturellement sensibles à l'ensemble des  $\beta$ -lactamines, les Aminocyclitolides et les quinolones (**Saidani, 2013**). Une résistance élevée a été marquée vis-à-vis certains  $\beta$ -lactamines : l'Amoxicilline+Ac.clavulanique (AMC) et l'Ampicilline (AMP) (80%) ainsi pour la Cotrimoxazole (COT) (70%). Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par **Diakite (2010)**. La résistance d'*Escherichia coli* aux  $\beta$ -lactamines est due à une inactivation de l'antibiotique par l'acquisition d'enzymes. Trois principaux types d'enzymes sont répertoriés : les pénicillinases, une enzyme dite TRI (pour TEM résistant inhibiteur) et les Céphalosporinases (**Saidani, 2013**).

Les résultats de l'antibiorésistance des 09 souches de *Morganella morganii* obtenus montrent une résistance élevée à l'ensemble des  $\beta$ -lactamines (l'Ampicilline (AMP), l'Amoxicilline+Ac.clavulanique (AMC) et la Céfazoline (CZ). Ce Phénomène est lié à la production d'une  $\beta$ -lactamase. Selon **Goubau et Van Compel (2000)**, les espèces indole-positives (*Morganella morganii*) produisent une  $\beta$ -lactamase constitutionnelle, responsable de la résistance à l'Ampicilline.

Les 6 souches de *Klebsiella pneumoniae* présentent une résistance élevée à la Cotrimoxazole (COT), à l'association Amoxicilline+Ac.clavulanique (AMC) et à la Céfazoline (CZ) ainsi à l'Amoxicilline (AM). Nos résultats se rapprochent à ceux de **Hamdan et al. (2011)** a montré des résistances importantes des souches de *K. pneumoniae* aux  $\beta$ -lactamines, notamment à l'Amoxicilline et à l'Amoxicilline + Acide clavulanique. Selon **Vilde et Nauciel (2005)** *Klebsiella pneumoniae* est naturellement résistante à l'Aminopénicilline (l'ampicilline, Amoxicilline) par production d'une  $\beta$ -lactamase. Une sensibilité totale a été enregistrée avec la Céfoxitine (FOX). Ce résultat est conforme à celui de **Sekhri (2011)**. Une bonne activité a été aussi observée avec l'Imipénème (IPM), la Céfotaxime (CTX) et à la Ciprofloxacine (CIP). D'après **Ayan et al. (2003)**; **Rebuck et al. (2000)** et **Husseïn et al. (2007)** les  $\beta$ -lactamines (Céfotaxime, Céfoxitine et Imipénème) sont les antibiotiques de premier choix pour le traitement des infections à *Klebsiella pneumoniae*.

## Résultats et Discussion

---

Les 08 souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées du pied diabétique sont pratiquement résistantes à une large gamme d'antibiotiques notamment aux  $\beta$ -lactamines : les Céphalosporines de la première génération (CZ) et les Pénicillines (TCC, TIC, IPM, PIP). Ce résultat rejoint celui rapporté par **Gadepalli et al. (2006)**. Par contre des souches multisensibles ont été rapportées par **Youness (2016)**. Chez *Pseudomonas aeruginosa* la faible perméabilité de sa membrane externe, la production constitutive d'un système d'efflux actif polyvalent, ainsi que l'expression inductible d'une  $\beta$ -lactamase à large spectre expliquent sa résistance élevée à de nombreuses  $\beta$ -lactamines. D'après **Toumi et al. (2011)** la Ciprofloxacine possède la meilleure activité contre *Pseudomonas aeruginosa*. Dans notre étude la Gentamicine (CN) semble la seule molécule efficace avec une sensibilité de 75%.

Le profil de résistance des 14 souches isolées constituant le groupe de Streptocoques a montré une sensibilité très élevée à la Pénicilline (P), aux Sulfamides (COT), aux Glycopeptides (VA) et aux Macrolides (CD et E). Cependant l'Ampicilline (AMP) et la Levofloxacine (LEV) sont les antibiotiques les plus actifs avec une sensibilité totale (100%). Des résultats similaires ont été rapportés par **Diakite (2010)** et **Adil et al. (2014)**. Selon **Adil et al. (2014)** en dehors de la pénicilline G les Streptocoques et les Entérocoques sont généralement multisensibles aux antibiotiques lors d'une infection de pied diabétique. Par contre une résistance des souches a été marquée vis-vis la Gentamicine (CN) et la Tétracycline (TE). La résistance aux aminosides est due à un défaut de pénétration à travers la paroi cellulaire streptococcique (**Perez et al., 2001**).

Les 23 souches de *Staphylococcus aureus* ont exprimé un taux de résistance élevée à la pénicilline G (75%). Nos résultats confirment ceux de **Antandou (2002)** et **Youness (2016)** avec une résistance de 90% et 85% à la pénicilline G respectivement. Cette résistance est due à la production d'une pénicillinase staphylococcique. D'après **Zygmunt et al. (1992)** plus de 90% des souches de *Staphylococcus aureus* sont résistantes à la pénicilline G par production de pénicillinase. D'après **Quincampoix et Mainardi (2001)** la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez les Staphylocoques repose sur deux grands types de mécanismes: un mécanisme de résistance extrinsèque par production d'enzymes inactivant l'antibiotique et un mécanisme de résistance intrinsèque par modification des protéines de liaison à la pénicilline (PLP) ou par acquisition de nouvelles PLP. A l'opposé, l'efficacité des antibiotiques contre cette souche a été notée pour une large gamme citant les Macrolides (PT, E, CD), les Aminosides (K, CN),

## Résultats et Discussion

---

les Glycopeptides (VA) les Céphalosporines (FOX), l'Acide fusidique (FA), l'Oxacilline (OX) et la Chloramphénicol (C).

Dans notre étude, les MRSA (Méthicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) représentent 34,78% des isolats de *Staphylococcus aureus*. Cette incidence relativement faible des SARM concorde avec celle trouvée par **Adil et al. (2014)** ont rapporté un taux de 34,23% des SARM. Par contre, une étude menée par **Djahmi et al. (2013)** a objectivé un taux de MRSA plus élevé, il représente 85,90% des isolats de *Staphylococcus aureus*. Parmi les BMR, *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) vient en premier lieu. L'isolement des SARM constitue un problème de première importance quoi qu'il puisse s'agir d'un germe colonisant et non responsable de l'infection. Même s'il est souvent d'origine nosocomiale, le SARM peut être d'origine communautaire chez les personnes vivant en institution (**Richard et al., 2008**). D'après **Richard et al. (2008)** chez certains malades, il existe un risque réel d'isoler des bactéries multirésistantes (BMR). Il s'agit souvent de malades ayant séjourné à l'hôpital avec un risque de transmission croisée. D'autres facteurs de risque tels qu'une infection chronique du pied diabétique et une antibiothérapie antérieure (**Lipsky, 2008**).

Les Staphylocoques hospitaliers, et plus récemment communautaires, ont développé une résistance croisée entre les pénicillines M (Méticilline, Oxacilline) et les autres  $\beta$ -lactamines par la production d'une protéine, la PLP2a, liant les pénicillines (PLP) et ayant une faible affinité pour ces composés. Le gène codant la PLP2a, *mecA*, est porté par un élément chromosomique qui contient également d'autres gènes de résistance aux métaux lourds et à d'autres antibiotiques, ceci expliquant le profil de multirésistance des SARM hospitaliers (**Oana et al., 2010**).

Tous les SARM isolés dans notre étude ont été sensibles à la Vancomycine. Le même résultat a été rapporté par **Youness (2016)**. D'après **Hasseinbey et Soum (2006)** pour les MRSA, les Glycopeptides, et particulièrement la Vancomycine, s'imposent en monothérapie ou en association avec d'autres molécules actives telles que Fosfomycine, Rifampicine, Quinolones systémiques ou l'Acide Fusidique.

Le traitement antibiotique doit tenir en compte essentiellement deux paramètres dont l'efficacité vis-à-vis un ou des germes pathogène et la capacité à éviter la sélection des

## Résultats et Discussion

---

bactéries multirésistantes car une mauvaise stratégie d'antibiothérapie chez ces patients peut participer à l'émergence et à la diffusion des souches bactériennes multirésistantes (**Toumi et al., 2011**).

Lorsque l'infection du pied diabétique est confirmée, l'antibiothérapie doit souvent être prescrite sans délai en raison du risque d'une évolution rapidement défavorable. Il s'agit dans la majorité des cas d'une antibiothérapie probabiliste (**Lipsky et al., 2004**).

Concernant les essais réalisés pour l'effet antibactérien du chitosane sur l'ensemble des souches isolées du pied diabétique, les résultats obtenus ont montré une grande activité vis-à-vis les souches de *Staphylococcus aureus* et la majorité des Entérobactéries. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par **Benhabiles et al. (2012)**.

Notre étude a montré que le chitosane est actif sur toutes les souches testées à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter sakazakii* qui ont montré une résistance totale pour toutes les concentrations testées. Par contre, une étude menée par **Benhabiles et al. (2012)** a montré son efficacité sur les souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Ceci est probablement dû à la densité de charge sur la surface de la cellule.

Cependant, l'efficacité de chitosane sur les bactéries à Gram négatif et Gram positif est toutefois controversée. Le chitosane semble avoir des effets bactéricides plus forts contre les bactéries à Gram positif que contre les bactéries à Gram-négatif. Selon **Li et al. (2007)** ; **Zhong et al. (2008)** l'action du chitosane sur les bactéries à Gram négatif est moins importante que celle sur les bactéries à Gram positif. Ce résultat est probablement dû à des différences dans la structure de l'enveloppe cellulaire. La paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif est constituée d'une fine couche de peptidoglycane et d'une membrane externe. Cependant, la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif est seulement composée d'une épaisse couche de peptidoglycane sans membrane externe. En raison de cette structure, la membrane externe fonctionne comme une barrière imperméable contre les macromolécules et les substances hydrophobes. Elle pourrait être responsable de la prévention de la pénétration du chitosane dans la cellule (**Coma et al., 2003**).

A l'inverse, Certains auteurs ont déclaré que le chitosane a montré des effets plus forts pour les bactéries à Gram négatif que pour les Gram positif (**Devlieghere et al., 2004** ; **Rejane, 2009**).

## Résultats et Discussion

---

Le facteur clé de l'activité antimicrobienne du chitosane est sa charge positive (**Helander et al., 2001**). D'après **Devlieghere et al. (2004)** ; **Liu et al. (2001)** ; **Peng et al. (2005)** la formation de liaisons électrostatiques entre les charges positives du chitosane et les phospholipides de la membrane cellulaire qui ont une charge négative, perturbe les échanges entre la cellule microbienne et le milieu extérieur provoquant ainsi des déséquilibres osmotiques internes et par conséquent inhibant la croissance des micro-organismes. Une meilleure activité antibactérienne du chitosane a été observée avec les souches de *Staphylococcus aureus*. Ce résultat concorde à celui rapporté par **Rejane et al. (2015)**.

Au cours de nos essais, nous avons constaté que l'activité antibactérienne diminue avec l'augmentation du volume de 25 à 100ml pour la majorité des souches testées. En effet, une bonne sensibilité a été observée avec le volume V1 (25ml) par rapport à celui de V2 (100ml). Par contre, en augmentant la concentration de chitosane de 0,5 à 1g/25ml et dans 100ml l'activité antibactérienne augmente. Ceci est démontré aussi par **Zheng et Zhu (2003)** plus la concentration en polymères de chitosane est élevée plus l'activité antimicrobienne est observée. Le chitosane est connu comme auxiliaire technologique, mais son utilisation en solution requière des concentrations élevées, il est connu pour son effet antimicrobien, quand il est utilisé en solution avec des acides organiques, en général à pH acide, et à des concentrations de l'ordre de 0.5 à 1,5% (**Aurélie, 2014**).

**Wang (1992)** a rapporté que l'augmentation de la concentration de chitosane de 0,5% à 2,5% augmente l'efficacité contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Cependant, la relation entre la concentration de chitosane et l'efficacité d'inhibition ne peut pas être toujours déterminée. **Papineau et al. (1991)** ont montré que 0,02% et 0,1% de chitosane sont plus efficaces contre *Escherichia coli* que 0,5%. D'après **Sudarshan et al. (1992)** ce phénomène est dû au fait que le chitosane polycationique à faible concentration pourrait probablement se lier à la surface bactérienne chargée négativement pour provoquer une agglutination, tandis qu'à des concentrations plus élevées, le plus grand nombre de charges positives peut avoir donné une charge positive nette aux surfaces bactériennes pour les maintenir en suspension.

Les résultats comparatifs de la méthode de diffusion par disques et la méthode de diffusion par puits sur gélose ont montré que le chitosane présente une activité antibactérienne avec les deux méthodes utilisées. Selon **Jones et al. (1990)** il existe une

## Résultats et Discussion

---

corrélation entre la méthode de diffusion par disque et la méthode de diffusion par puits, la sensibilité et l'efficacité est observée avec les deux techniques. En revanche, une meilleure activité antibactérienne du chitosane a été observée avec la méthode de diffusion par puits par rapport à celle de diffusion par disque et cela peut être expliqué par la propriété visqueuse du chitosane qui a limité sa diffusion dans la gélose lorsqu'il est absorbé par le disque.

D'après **Fauchère et Avril (2002)** dans la méthode de diffusion par disque le contacte entre le chitosane et la culture bactérienne se fait par l'intermédiaire du disque du papier imprégné d'une certaine quantité du chitosane. Ce qui permet au disque d'absorber toute la quantité de ce polymère visqueux et limite sa diffusion dans la gélose. Les travaux de **Rayn et al. (1996)** ont apporté que le chitosane se diffuse radialement à partir du puits en créant une zone d'inhibition circulatoire à la surface de la gélose.

L'infiltration rapide du chitosane dans le milieu de culture avec la méthode de diffusion par puits rend le polymère dans un cadre très efficace et donc très fiable pour toute les mesures de définition ou de zone d'inhibition.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet du chitosane sur les bactéries. Le mécanisme antibactérien le plus fréquemment accepté est basé sur les interactions électrostatiques entre le chitosane et la cellule bactérienne (**Busilacchi et al. 2013**).

Le chitosane peut aussi agir de façon indirecte comme un agent chélatant qui lie sélectivement les métaux traces et inhibe la production de toxines et de croissance microbienne (**Chen et al., 2010**). Les travaux de **Kong et al., (2008)** ont rapporté que les microsphères de chitosane chélatent les ions  $Mg^{2+}$  de la membrane externe d'*Escherichia coli*, provoquant une déstabilisation de la cellule. L'action du chitosane peut aussi se faire par formation de liaison avec l'ADN des bactéries induisant l'inhibition de la synthèse des ARN messager (**Liu et al., 2001 ; Devlieghere et al., 2004**).

D'après la littérature l'activité antibactérienne du chitosane est affectée par des facteurs intrinsèques liés au chitosane (PM, DDA, la concentration du chitosane, etc.) et des facteurs extrinsèques liés à la nature de la bactérie (souche bactérienne, phase de croissance, structure de la paroi, etc.).

## Résultats et Discussion

---

D'après nos résultats une bonne activité antibactérienne du chitosane a été observée avec un faible PM de 69 kDa et un DDA important de 74%. Selon **Zheng et Zhu (2003)** l'activité antibactérienne du chitosane augmente avec la diminution du PM. **Park et Kim (2001)** ont observé que le chitosane avec un PM de 224 et 1106 kDa possédait une activité antibactérienne faible ou nulle par rapport au chitosane avec un PM de 28kDa. Tandis que **Non et al., (2006)** ont rapporté qu'un chitosane de 1110 et 2025 kDa a un effet bactéricide suffisant pour supprimer complètement la croissance bactérienne.

L'effet antibactérien du chitosane peut aussi varier en fonction de son degré de désacétylation, elle augmente par l'augmentation de son degré de désacétylation (**Liu et al., 2001**). **Park et al., (2004)** ont montré que le chitosane ayant un degré de désacétylation de 75% a permis une meilleure activité antimicrobienne contre des bactéries Gram-positives et des bactéries Gram-négatives comparativement au chitosane avec un degré de désacétylation de 50%.

# Conclusion

## *Conclusion*

Les complications du pied sont parmi les complications les plus graves et coûteuses du diabète. Parmi les facteurs qui menacent les pronostics fonctionnel et vital du diabétique, figurent les lésions du pied qui sont pourvoyeuses d'environ 70% des amputations non traumatiques, souvent justifiées par la composante infectieuse.

Les résultats obtenus au cours de notre étude nous a permis de définir les différents facteurs qui influent sur les infections du pied diabétique : une prédominance de sexe masculin ; la tranche d'âge de survenue est de 45-65ans et la majorité des patients sont des diabétiques de type II.

D'après cette étude, nous avons constaté que les germes les plus responsables des infections du pied diabétique sont les bacilles à Gram négatifs où la majorité des cultures sont de nature polybactérienne.

L'étude de l'antibiorésistance des souches isolées a montré une résistance assez élevée des Entérobactéries aux  $\beta$ -lactamines et des *Staphylococcus aureus* à la pénicilline (74,91%) et à la Tétracyclines (52,18%). 34,78% des souches de *Staphylococcus aureus* isolées sont des MRSA (Méthicilin-Resistant *Staphylococcus aureus*).

L'étude de l'activité antibactérienne du chitosane a montré que cette molécule biologique présente une bonne activité sur toutes les souches isolées à l'exception *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter sakazakii*. Tandis que *Staphylococcus aureus* a présenté le taux de sensibilité le plus élevé.

Pour conclure, le Chitosane pourra servir comme un bon traitement à application cutanée pour les différentes lésions superficielles du pied diabétique grâce à son fort pouvoir antibactérien.

# **Recommendations**

## *Recommandations*

Le pied diabétique apparaît donc comme une pathologie complexe, d'abord difficile, nécessitant une approche multidisciplinaire et une coopération de nombreux acteurs de santé. Seuls le dépistage et la prévention permettront de diminuer le poids énorme que représente cette pathologie. Cette prévention passe par des mesures générales et d'autres plus focalisées sur le pied :

Les mesures générales et particulières :

- L'obtention d'un équilibre glycémique optimal.
- Lavez quotidiennement les pieds à l'eau tiède avec du savon neutre et les essuyez soigneusement en particulier entre les orteils avec une serviette sèche.
- N'utilisez pas de source de chaleur directe (bouillottes, cheminées, couverture chauffante, radiateur) pour réchauffer les pieds
- vérifiez à chaque fois afin de chaussez qu'il n'y a pas d'objets étrangers à l'intérieur (en passant la main jusqu'au bout de la chaussure, ou en la secouant)
- Faites très attention à la coupe de vos ongles : Coupez-les droit, au carré, en utilisant des ciseaux droits à bouts ronds.

Afin d'améliorer cette étude :

- ✓ Une étude approfondie est nécessaire sur les composants du Chitosane.
- ✓ Etablir une formule biologique, une crème d'application cutanée à base de Chitosane qui sera complétée par une étude toxicologique.
- ✓ Réalisation des essais d'application cutanée sur des lésions du pied diabétique pour mieux démontrer son efficacité sur cette pathologie.

-

## **Références bibliographiques**

## ***Références bibliographiques***

**Abdelhamid A. 2016:** Caractérisation de l'effet antibiofilm et antibactérien du chitosane sur les souches de *Staphylococcus aureus* responsables des mammites bovines. Université de Sherbrooke, Québec, Canada. p : 34.

**Abdulhadi A. 2013:** Fonctionnalisation enzymatique du chitosane par des composés phénoliques : évaluation des propriétés biologiques et physico-chimiques de ces nouveaux biopolymères, Université de LORRAINE. p : 65.

**Adil Z., Mohamed T., Abdellatif., Tarik L., Mustapha B., Mostafa E., Cherqui H. 2014:** Profil bactériologique du pied diabétique et son impact sur le choix des antibiotiques, The Pan African Medical Journal. v :7. p: 4-491.

**Alvarenga E.S.D. 2011:** Characterization and Properties of Chitosan, in Biotechnology of Biopolymers, Prof. Magdy Elnashar. p:19-35.

**Ambler R.P. 1980:** The structure of  $\beta$ -lactamases. Phil Trans R SocLondBiol Sci. p: 321-331.

**Andrew J.M. 2006:** Boulton The diabetic foot medicine. p:34.

**Antandou J.M.S. 2002:** Nature et sensibilité de bactéries isolées au laboratoire de biologie médicale du Centre National d'Appui à la lutte contre la maladie. Thèse, Bamako. p: 68.

**Aurélié B., Sandrine G. 2014:** Utilisation de chitosane sous forme de poudre comme agent antifongique dans le traitement de liquides alimentaires d'origine végétale préparé par fermentation.p:16-28.

**Ayan M., Kuzucu C., Durmaz R., Aktas E., Cizmeci Z. 2003:** Analysis of three outbreaks due to *Klebsiella* species in a neonatal intensive care unit. J Infect Control Hosp Epidemiol.v: 24; p: 495-500.

**Babic M., Hujer A.M., Bonomo R.A. 2006:** What's new in antibiotic resistance, Focus on beta-lactamases. Drug Resist Updat. Jun.v:3.p:56-14.

**Bacon A., Markin J., Sizer PJ., Jabbal-Gill I., Hinchcliffe M., Illum L., Chatfield S., Roberts M. 2000:** Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens. Infection and Immunity.v:68 .p: 5764-5770.

**Beaulieu C. 2007:** Les effets multiples du chitosane, Canada.p: 321-354.

**Benjlali B., Tantaoui E.A., Ismaïli A.M., Ayadi A. 1986:** Méthode d'études des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plant Médicinal Phytotherapy*.p: 155-167.

**Berghe V.A., Vletinck A.J. 1991:** Screening Methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Method for Plant Biochemistry*.p: 47-68.

**Bennett M.S. 2001:** Putting our best foot forward: the pharmacist's role in preventing diabetic foot ulcers. *Journal of the American Pharmaceutical Association*.p: 338-340.

**Boutoille D., Leautez S., Maulaz D., Krempf M. 2000:** Les ulcères du pied diabétique : épidémiologie et physiopathologie : infections bactériennes et ostéoarticulaires du pied diabétique. *La presse médicale*.v :7.p: 389-392.

**Blanc C.H. 2001:** Le pied diabétique: état actuel des connaissances et perspectives d'avenir. *Médecine&Hygiène*.v: 59.p: 2526-2529.

**Bakker K., Foster A.G.M., Houtum W.H., Riley P.C. 2011:** Diabetes and Foot Care: Time to Act. *International Diabetes Federation*.p: 453-456.

**Bernard P., Bédane C., Mounier M., Denis F., Bonnetblanc J.M. 2011:** Dermohypodermites bactériennes de l'adulte : incidence et place de l'étiologie streptococcique.v:122.p: 495-500.

**Benhabiles M.S., Salah R., Lounici H., Drouiche N. 2012:** Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp. *International Journal of Food Microbiology Hydrocolloids*.p: 48-56.

**Bertoglio J. 2005:** Diabétique du sevrage tabagique chez le diabétique. *Diabètes Voice*.v: 50. p: 36-39.

**Bowler P.G., Duerden B.I., Armstrong D.G. 2001:** Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbial Rev*.v:14.p: 244-69.

**Busilacchi A., Gigante A., Mattioli-Belamonte M., Manzotti S., Muzzarelli R.A.A. 2013:** Chitosan stabilizes platelet growth factors and modulates stem cell differentiation toward tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers*.v:98.p: 665-676.

**Buysschaert M. 2006:** Diabétologie Clinique. *De Boeck Supérieur*.p :79.

**Bowler P.G., Duerden B.I., Armstrong D.G. 2001:** Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbial Rev*.v:14.p: 244-69.

**Carattoli A. 2001:** Importance of integrons in the diffusion of resistance, veterinary research.v: 32. p: 243-259.

**CA-SFM. 2010:** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.p :89.

**Catherine A.L., Laurence L. 2005:** Infections sévères à *Streptococcus agalactiae* du pied diabétique, Rôle délétère du *Streptococcus agalactiae*, La Presse Médicale.v :34.p: 4-491.

**Chakib M. 2011 :** Prévalence du diabète en Algérie : La valse des chiffres N° 01.p: 31.

**Chen L., Kung S., Chen H.H., Lin S.B. 2010:** Evaluation of zeta potential difference as an indicator for antibacterial strength of low molecular weight chitosan. Carbohydrate Polymer.v :82.p: 913-919.

**Chevenne D., Fonfrède M., 2007.** Actualités en diabétologie. Rev, Immuno-analyse et biologie spécialisée n°22 ; Masson . p: 97.

**Clotilde N., Dieudonné A., André B., Noel A., Gérald S., Basile K., Fidèle B., Romain T. 2013:** Écologie bactérienne de l'infection nosocomiale au service de réanimation de l'hôpital Laquintinie de Douala, Cameroun.v: 14.p : 87.

**Coma V., Deschamps A., Martial Gros A. 2003:** Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan Polymer - Antimicrobial Activity Assessment on Dairy-Related Contaminants. Journal of Food Science.v :68.p: 2788-2792.

**Couret G., Desbiez F., Thieblot P. 2007 :** Emergence des infections monomicrobiennes à staphylocoque doré méticilline-résistant dans les ostéites du pied diabétique.v:36.p : 851-8.

**Cunha B., Ankle S. 2000:** Antibiotic selection for diabetic foot infections: a review.v:39.p:7-253.

**Danan C., Aurore P. 2006:** Usage vétérinaires des antibiotiques bactériens et leurs conséquences pour la santé humaine, p : 10.

**David G., Armstrong, D.P.M., Lawrence A., Lavery M.P.H. 1998 :** Université du Texas Health Science Center à San Antonio et le groupe de recherche du pied diabétique, San Antonio, Texas Am Fam Physician.v :6.p: 1325-1332.

**Delarras C. 2014:** Pratique en microbiologie de laboratoire Recherche de bactéries et de levures-moisissures, Éditions Lavoisier, Paris ISBN.p : 978-2-7430-1565-7.

**Denis F., Cécile M., Martin C., Bengen E., Quentin R. 2007:** Bactériologie médicale Technique usuelles. Edition Masson. Paris.p : 573.

**Devlieghere F., Vermeulen A., Debevere J. 2004:** Chitosan: Antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*.v :21.p: 703-714.

**Diagne M. 1976:** Considérations clinique, thérapeutique et chirurgicales des gangrènes diabétiques en milieu Africain. Thèse de Médecine, Dakar .p :46-76.

**Diakite Oumou Keita. 2010:** Etude de la sensibilité aux antibiotiques des germes isolés dans les infections ostéoarticulaires, Faculté de Médecine, Université de Bamako, Mali.p :110.

**Djahmi N., Messad N., Nedjai S. 2013:** Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains isolated from inpatients with infected diabetic foot ulcers in an Algerian University Hospital. *Clinical Microbiology and Infection*.v:19.p:398-404.

**Dorsey R., Eberhardt M.S., Gregg E.W., Geiss L.S. 2009:** Control of risk factors among people with diagnosed diabetes, by lower extremity disease status. *Preventing chronic disease*.p : 450-543.

**Dridi E., Chetoui A., Zaoui A. 2006:** Prévalence de l'infection nosocomiale dans un hôpital régional tunisien.v: 18.P: 200.

**Driver, V.R., J.M. LeBretton, M.A. Landowski et J.L. Madsen.2012 :** Neuropathic wounds: The diabetic wound , in R.A. *Acute and Chronic Wounds: Current Management Concepts* (4e éd.). Louis (MO), Mosby Elsevier.p: 225-248.

**Dunning T. 2012:** Care of People with Diabetes: A Manual of Nursing Practice. 4th ed. Oxford: Wiley-Blackwell.p : 320-330.

**Durand A.C. 2012:** La sixième complication du diabète, Université de Bretagne Occidentale (UBO).p :67.

**Dutta P.K., Dutta J., Chattopadhyaya M.C., Tripathi V.S. 2004:** Chitin and chitosan: novel biomaterials waiting for future developments. *J Polym Mater*.v:21.p : 321-334.

**Ela M.A., El-Shaer N.S., Ghanem N.B. 1996:** Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and tixedolls. *Pharmazie*.v:51.p : 993-995.

**Fauchère M., Avril K. 2002:** A mechanism of antibacterial activity of chitosan against Gram-negative bacteria. *Chinese Journal of Polymer Science*.p : 148-153.

**Fontbonne A. 2010:** Epidémiologie des états diabétiques. Edition Masson .France.p : 37.

**François O.D. 2008:** Isolation et valorisation des constituants de la carapace de la crevette nordique, Université Laval, Québec.p :56.

**Fredenrich A., Bouillanne P.J., Batt M. 2004:** Artériopathie diabétique des membres inférieurs. EMC-Endocrinologie.p : 117-132.

**Gadepalli R., Dhawan B., Sreenivas V., Kapil A., Ammini A.C., Chaudhry R.A. 2006:** Clinico-microbiological study of diabetic foot ulcers in an Indian tertiary care hospital. Diabetes care.v :8.p:1727-1732.

**Gauzit R. 2006 :** Infections cutanées graves : définitions, caractéristiques cliniques et microbiologiques Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation.p : 967–970.

**Ge Y., MacDonald D., Hait H., Lipsky BA., Zosloff M., Holroyd K. 2002:** Microbiological profile of infected diabetic foot ulcers. Diabet Med.v :19.p: 5-1032.

**Gin H., Rigalleau V., 2005:** Le pied diabétique, L'observation du mouvement Sud Radio-4, place Alfonse-Jourdain 31071 Toulouse Cedex 7 .p : 5.

**Gogny M., Puyt P.J.L. 2001:** Classification des principes actifs, l'arsenal thérapeutique vétérinaire, édition le point vétérinaire. p : 165-168.

**Got I. 1996:** Sur la nécessité d'une approche multidisciplinaire du pied diabétique. J, Mal. Vasc.v :6.p : 4 -130.

**Got I. 2001:** Sur la nécessité d'une approche multidisciplinaire du pied diabétique. J, Mal. Vasc. V :26. p : 4 -130.

**Got I. 2008:** Peripheral vascular disease and diabetic foot, Revue de Médecine Interne. Suppl. v :2 .p:249-259.

**Goubau P., Van G.A. 2000:** Repères en microbiologie. Louvain Garant .p : 365-543.

**Grimaldi A. 2005:** Traité de diabétologie. Tome 03 Edition Médecine science, Flammarion. Paris. p : 733-766.

**Halmi S., Benhamou PY., Charras H. 1993:** Le coût du pied diabétique. DiabeteMetabolic.v:19.p : 518-22.

**Hamdan Z., Loretz V., Driver T. 2011:** Epidemiology of diabetic foot infections and antibiotics sensitivity among pregnant women atKhartoum north hospital.v:10.p: 98.

**Hannat S., Sahli F., Khettabi S., Chermat R., Mekideche F.Z., Malek R. 2008 :** Profil bactériologique des lésions trophiques du pied diabétique et leur résistance aux antibiotiques Médecine Interne, Centre Hospitalier Universitaire de Setif, Algérie.p : 65-78.

**Hartemann H. 2008 :** Le pied diabétique Journal des Maladies Vasculaires.p :2-34.

**Hartmann A., Marty L., Ha Van G., Grimaldi A. 2000:** Place de l'antibiothérapie dans le traitement du pied diabétique. Elsevier Masson SAS.v :26.p : 219.

**Hasseinbey., Soum. 2007:** Etude cyto bactériologique de prélèvement de pus chez les diabétiques gangréneux. Thèse soutenue le 22.02.2007. Université de Saad Dahleb de Blida.p:37.

**HA Van 1994 :** Pied diabétique. Encycl. Méd. Chirurgie-podologie. p: 16.

**HA Van G. 2008:** Le pied diabétique. Edition Masson .Paris.p: 128-129.

**Ha Van G. 2008:** Le pied diabétique. Collection abrégés. Edition Elsevier Masson. p: 201.

**HA Van G., Heurtier A., Marty L., Danan J.P., Koskas F., Grimaldi A. 1997:** Pied Diabétique.*Encyclopédien Médico-Chirurgicale*, Endocrinologie-Nutrition, Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS. P: 11.

**Helander I.M., Nurmiaho E.L., Ahvenainen R., Rhoades J. 2001:** Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*.p: 235-244.

**Hingorani A., Loretz V., Driver T., Carman M. 2016:** The management of diabetic foot: A clinical practice guideline by the Society for Vascular Surgery in collaboration with the American Podiatric Medical Association and the Society for Vascular Medicine », *Journal of Vascular Surgery*.v:63. p : 3-21.

**Horde p. 2014:** Pied du diabétique, issu de Sante-Medecine.p :34.

**Hussein K., Sprecher H., Mashiach T., Rabino G., Eluk O., Kassis I., Braun E., Oren I. 2007:** First outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella* in an Israeli university hospital. *J Infection Control and Nosocomial Infections*.p: 34-8.

**Jacqueminet S., Ha Van G., Lejeune M ., Hartemann H.A. 2002:** Prise en charge du pied diabétique infecté, Service de diabétologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.p :78.

**Jarlier V., Nicolas M.H., Fournier G. 1988:** Extended-broad-spectrum  $\beta$ - lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis*.v:10.p: 867–878.

**Jorgensen J.H., Turnidge J.D., Washington J.A. 1999:** Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods in manual of clinical microbiology, 7th ed American society for microbiology. p: 1526-1543.

**Kavan A. 2004:** Chaussures thérapeutiques en prévention des ulcères du pied chez le diabétique. *Minerva*. v: 3, n°8.p :76.

**KHalfa S. 2001:** Le diabète sucré .Algérie office publications universitaires, p: 102.

**Khalifa S. 2009:** le diabète sucré .Algérie office publications universitaires, p:116.

**Khanafari A., Marandi R., Sanatei S.H. 2008:** Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering.v :1.p: 19-24.

**Khiati. 2016:** La prévalence de diabète s'accroît, cinq millions algériens sont touchés. Le courrier d'Algérie.p:89.

**Kong M., Chen X.G., Liu C.S., Liu C.G., Meng X.H. 2008:** Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against E. coli. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.p: 197-202.

**Lange G. 2004:** L'âge moyen de découverte du diabète type .Thèse de doctorat en médecine .Université Paris7, France. p : 9.

**Lavery L.A., Armstrong D.G., Wunderlich R.P., Mohler M.J., Wendel C.S., Lipsky B.A. 2006:** Risk factors for foot infections in individuals with diabetes. Diabetes care.v :6.p:1288-1293.

**Lavigne J.P., Richard J.L, Sottob A. 2011 :** Nouvelles avancées dans les infections des plaies du pied chez le patient diabétique. Revue Francophone des laboratoires.p :434.

**Lebres H.A. 2002:** Cours national d'hygiène et de microbiologie, institut Pasteur d'Alger.p :67.

**Levine S.E., Myerson M. 2000:** Management of ulceration and infection in the diabetic foot. In: Myerson M, editor. Foot and Ankle Disorders, 1 Philadelphia: Saunders Company, P: 38-413.

**Li Y., Chen X.G., Liu N., Liu C.S., Liu C.G., Meng X.H., Yu L.J., Kenedy J.F. 2007:** Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates. Carbohydrate Polymers.v:69.p: 227-232.

**Lipsky B.A. 2008:** New developments in diagnosing and treating diabetic foot infections. Diabetes Metab Res Rev.v:24.p: 66-71.

**Lipsky B.A., Berendt A.R., Cornia P.B. 2012:** Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. Clinical infectious diseases.v:12.p:132-173.

**Lipsky B.A., Berendt A.R., Embil J. 2004:** Diagnosing and treating diabetic foot infections. Diabetes. Metab.v:20.p: 56-64.

**Limam Z., Selmi S., Sadok S., El-abad A. 2011:** Extraction and characterization of chitin and chitosan from crustacean by-products: biological and physicochemical properties. *African Journal of Biotechnology*.v:10. p : 640-647.

**Livermore DM. 2003:** Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact,” An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*.v:1. p : 11–23.

**Liu X.F., Guan Y.L., Yang D.Z., Li Z., Yao K.D. 2001:** Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*.v:79.p : 1324-1335.

**Lushiku E.B. 2006:** Le pied diabétique, les pathologies du pied, *Rev Med Brux*. Diabetic foot. Service d’orthopédie-traumatologie. Site Etterbeek-Ixelles et Molière- Longchamp, p : 316-318.

**Lushiku E.B. 2006:** Le pied diabétique *Rev Med .Bruxelles*.p : 315-323.

**Malek R; Belateche F; Laouamri S; Hamdi-Cherif M; Touabti A; Bendib W; Nechadi A ; Mekideche F.Z; Hanat S. 2001:** Prévalence du diabète de type 2 et de l’intolérance au glucose dans la région de Sétif (Algérie).*Rev, Diabetes Métab ; n° 2 .v : 27.p :165.*

**Mandaci A., Mihoubi S. 2015:** profil de sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries pathogènes, Université de frère Mentouri, Constantine.p :34.

**Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R., Mandell D.B. 2009:** Principles and practice of infectious diseases. Sixième édition, Elsevier, Churchill Livingstone, USA.p :23-54.

**Meyer R., Kessler L. 2000 :** Le pied diabétique, Première partie. *La Lettre du Rhumatologue*. p : 24-34.

**Mohamed T. 2008:** Le pied diabétique : à propos de 90 cas, Université CADI AYYAD, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Marrakech. Thèse.p: 101.

**Murra Y., Patrick R. 2003:** *Manual of Clinical Microbiology*. Washington D.C., 8<sup>th</sup> Edition. p :123-125.

**Nam Han Cho., David W., Leonor G. 2013:** *ATLAS du Diabète de la FID (Fédération Internationale du Diabète)*, 6eme édition.p :34.

**Nelson E.A., O’Meara S., Golder S., Dalton J.E., Craig D., Iglesias C. 2006:** On behalf of the DASIDU steering Group. Systematic Review of methods to diagnose infection in foot ulcers in diabetes. *Diabet Med*.v:23.p: 7-341.

**No H.K., Park N.Y., Lee S.H., Meyers S.P. 2002:** Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*.v:74.p: 65-72.

**Non ., Meyers SP., Prinyawiwatkul W. 2006:** Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. *J Food Sci.* v:72.p: 87-100.

**Ojha S. 2008:** Examination of animal and zoonotic pathogens using microarrays.veterinary research.p:4-39.

**Omura Y. 2003:** Antimicrobial activities of chitosan with different degrees of acetylation and molecular weights *Biocontrol. Sci.*v :8.p : 25-30.

**Ondoua M.J. 2012:** Je me porte bien avec mon diabète.l'Harmattan. Paris, p : 50.

**Organisation Mondiale de la Santé (OMS). 2006:** Prévention des maladies chroniques : un investissement vital, panoram de la santé 2009.

**Pa J.H., Yu T.L. 2001:** Light scattering study of chitosan in acetic acid aqueous solutions. *Macromolecular Chemistry and Physics.*v :202.p : 985-991.

**Pagés J.M. 2004:** Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. *Médecine Science.* Paris.v:20.p:346-51.

**Panizzi P.R., Friedrich P., Fuentes-Prior K., Richter P.E. 2006:** Fibrinogen substrate recognition by staphylocoagulase prothrombin complexes. *J. Biol. Chem.*p: 1179-1187.

**Papineau A.M., Hoover D.G., Knorr D., Farkas D.F. 1991:** Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. *Food Biotechnology.*p : 45-57.

**Park N., Kim L. 2001:** Effect of Mv and concentration of chitosan on antibacterial activity.p: 83-90

**Paterson D.L., Bonomo R.A. 2005:** Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *ClinMicrobiol Rev.*v :18.p: 657-686.

**Pedgrift C.K. 2011:** l'impact médical hospitalier de la prise en charge du pied diabétique, mémoire de fin d'étude master of Advanced studie en économie et management de la santé, faculté de Lausanne faculté biologie et médecine. p : 3

**Peng L., Wang B., Ren P. 2005:** Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.*v:45.p: 108-111.

**Perez E., Vicente D., Montes M. 2001:** High proportion of pharyngeal carriers of commensal streptococci resistant to erythromycin in Spanish adults. *Antimicrobial Chemother.* p : 9-225.

**Peter R.B., Assal J.P., Reiber G. 1996:** Pivotal events: a neglected field of factors leading to major diabetic foot complications. *Diabetologia.*v:39.p:265.

**Pitout J.D., Nordmann P., Laupland K., Poirel L. 2005:** Emergence of Enterobacteriaceae producing extended spectrum betalactamases (ESBL) in the community. *J Antimicrob Chemother.*v:56.p: 52–59.

**Poole K. 2004:** Efflux mediated multiresistance in Gram negative bacteria. *J clin Microbial Infect.*v:10.p:12-26.

**Pranoto Y., Rakshit S.K., Salokhe V.M. 2005:** Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *Lwt-Food Sci. Tech.*p : 859-865.

**Quincampoix J.C., Mainardi J.L. 2001 :** Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif .Service de microbiologie clinique, hôpital européen Georges-Pompidou.v :20.p : 123-125.

**Rabea E.I., Badawy M.E., Stevens C.V., Smagghe G., Steurbaut W. 2003:** Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromol.*p: 1457-1465.

**Rahal K., Belouni R., Benslimani A. 2005:** Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. *Rec de L'OMS. 4ème édition. Algérie.*p: 46-52.

**Rao N., Lipsky B.A. 2007:** Optimising antimicrobial therapy in diabetic foot infections. *Drugs.*v:67.p:195-214.

**Rasheed HA., Abdelhadi MS., Saeed IA. 2010 :** Emergence of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* as a community pathogen. *Diagn Microbiol Infect Dis.*v:40.p : 1-4

**Rebuck J.A., Olsen K.M., Fey P.D., Langnas A.N., Rupp M.E. 2000:** Characterization of an outbreak due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric intensive care unit transplant population. *J Clin Infect Dis.*v: 31.p: 1372-1386.

**Rejane G.C., Douglas B., Odilio A.B.G. 2009:** A review of the antimicrobial activity of chitosane. *São Carlos.*v:19.p:3.

**Rejane G.C., Sinara M., Odilio A.BG. 2015:** Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* growth, Revista Brasileira de Farmacognosia, p: 6.

**Reiber G.E. 2004:** Chaussures thérapeutique en prévention des ulcères du pied chez les diabétiques, Minevra.v :3. p : 126.

**Richard L. 2005 :** Le pied diabétique Service des Maladies de la Nutrition et Diabétologie Centre Médicale 30240.p : 45.

**Richard J.L., Lavigne J.P. 2007:** Prise en charge du pied diabétique infecté. Médecine interne, 29, Edition Elsevier Masson, p : 222-230.

**Richard J., Schuldiner S .2008.** Epidémiologie du pied diabétique. Rev Med Int.v :29.p : 222-230.

**Richard J.L., Sotto A., Jourdan N. 2008:** Risk factors and healing impact of multidrug-resistant bacteria in diabetic foot ulcers. Diabetes Metab.v:34.p:9- 363.

**Roberts G.A.F. 1992:** Chitin Chemistry, Macmillan, London.p:450.

**Rodier M. 2001:** Définition et classification du diabète, Endocrinologie-CHU-Nimes.v: 25.p :67.

**Rovan V.U et Rigalleau V. 2005 :** Diabète Voice, le pied d'abord, fédération international du diabète.p : 19.

**Saidani M. 2013 :** Thèse en ligne : Epidémiologie des pyélonéphrites et prostatites communautaires : Les traitements probabilistes recommandés sont-ils toujours adaptés. Université Paris Diderot - Paris 7 faculté de médecine. France.p :120-123.

**Samake D. 2005:** Etude épidémiologique-clinique des amputations consécutives aux complications du diabète dans le Service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique de l'Hôpital Gabriel TOURE. Thèse de Médecine, Bamako. n°155.p :5.

**Sano D., Tieno H., Drabo Y., Sanou A. 1999:** Prise en charge du pied diabétique à propos de 42 cas au CHU de Ouagadougou. Médecine d'Afrique Noire.v :46.p:10.

**Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Fougrach H., Bourkhiss B., Bousta D. 2007:** Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. Bulletin de la société de pharmacie de Bordeaux.p : 85-96.

**Sekhri A.N. 2011:** Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *Klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Benbadis de Constantine, thèse, Université Mentouri de Constantine.p :670.

**Senneville E. 2008:** Infection et pied diabétique, La Revue de Médecine Interne.v :29.p:48-243.

**Shanidi F., Arachchi J.K.V., Jeon Y.J. 1999:** Food applications of chitin and chitosans. Food Science and Technology.v:10.p: 37-51.

**Shankar E.M., Mohan V., Premalantha G., Srinivasan R.S., Usha A.R. 2005:** Bacterial etiology of diabetic foot infections in South India. Eur J Intern Med.v: 16.p: 70-567.

**Shi C., Zhu Y., Ran X., Wang M., Su Y., Cheng T. 2006:** Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine. Journal of Surgical Research.v : 133.p :185-192.

**Stahl J.P., Yala D., Merad A.S., Mohammedi D. 2007:** Recommandations pour la pratique clinique-prise en charge du pied en charge du pied diabétique infecté. Médecine et maladies infectieuses N° 37. p : 1-13.

**Stohr,V., Joffraud J.J., Cardinal M., Leroi F., 2001:** Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. Food Res. Int.v: 34.p : 797-806.

**Sudarshan N.R., Hoover D.G., Knorr D. 1992:** Antibacterial action of chitosan. Food Biotechnology. P: 257-272.

**Toumi A., Bernard L., Chakroun M. 2011:** Antibiothérapie des infections du pied diabétique .Revue Tunisienne d'infectiologie.v :5. p:61-67.

**Tressieres B., Savey Anne. 2007:** Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte: Réseau REA Raisin, p: 48.

**Turhan V., Mutluoglu M., Acar A. 2013:** Increasing incidence of Gram-negative organisms in bacterial agents isolated from diabetic foot ulcers. Journal of infection in developing countries.v:10.p:707-712.

**Uçkay I., Gariani K., Pataky Z., Lipsky BA. 2014:** Diabetic foot infections: state-of-the-art. Diabetes, Obesity and Metabolism.v:5.p:305-316.

**Varnado M. 2015:** Lower extremity neuropathic disease , in D.B.Doughty et L.L. McNichol *Wound, Ostomy and Continence Nurses Society–Core Curriculum Wound Management*, Riverwoods.p : 466-507.

**Vedel G. 2005:** Simple method to determine  $\beta$ -lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. Journal of antimicrobial chemotherapy.v:56.p: 657-664.

**Veves A., Falanga V., Armstrong D.G., Sabolinski M.L.G. 2001:** A human skin equivalent is effective in the management of noninfected neuropathic diabetic foot ulcers: a prospective randomized multicenter clinical trial. Diabetes Care.v :24 .p: 5-290.

**Vilde G et Nauciel C. 2005 :** Bactériologie médicale connaissances et pratique. Masson. Paris.p:121-122.

**Vincent J.L. 1995:** The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe, Results of the European prevalence of infection intensive care units (EPIC study).v:274.p: 44-639.

**Voide C., Trampuz A., Orasch .2012 :** Pied Diabétique Infecté, Service des Maladies Infectieuses1, Service de Médecine Préventive Hospitalière,Centre Hospitalier Universitaire Vaudois.p : 1431–1435.

**Wang G.H. 1992:** Inhibition and inactivation of 5 species of foodborne pathogens by chitosan. Journal of Food Protection.v:55.p: 916-919.

**Wright G.D. 2005:** Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. Adv Drug Deliv Rev.v : 57.p: 70-1451.

**Yala D., Merad A-S., Mohammedi D., Korich M-N. 2000:** Résistance bactérienne aux antibiotiques. Médecine du Maghreb, N°91, p : 13.

**Youness L. 2016:** Profil bactériologique et fréquence de résistance aux antibiotiques de l'infection du pied diabétique, Faculté de Médecine, Marrakech.p :35.

**Zheng L.Y., Zhu J.F. 2003:** Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. Carbohydrate Polymers.p: 527-530.

**Zhong Z., Xing R., Liu S., Wang L., Cai S., Li P. 2008:** Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities *in vitro*. Carbohydrate Research.v:343.p : 566-570.

**Zivanovic S. 2004:** Molecular Weight of Chitosan Influences Antimicrobial Activity in Oil-in-Water Emulsions J. Food Prot.v:67. p: 952-959

**Zouhaier Ait Lhaj Ousaid. 2014:** Prise en charge en milieu d'urgence du pied diabétique, Université Cadi Ayyad, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Marrakech.v :56.

**Zygmunt D.J., Stratton CW., Kernodle DS. 1992:** Characterization of four  $\beta$ -lactamase produced by *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother.p:420-431.

# Annexes

## Annexe I (Partie bibliographique)

---

**Tableau 5:** Classification des lésions du pied en grades de gravité (d'après Wagner)  
**(Pedgrift, 2011)**

Grade	Lésion
0	Pas de lésion ouverte, mais présence possible d'une déformation osseuse ou d'une hyperkératose
1	Ulcère superficiel sans pénétration dans les tissus profonds
2	Extension profonde vers les tendons ou l'os, les articulations
3	Tendinite, ostéomyélite, abcès ou cellulite profonde
4	Gangrène d'un orteil ou de l'avant-pied le plus souvent associée à une infection plantaire

## Annexe I (Partie bibliographique)

**Tableau 6** : Classification des stades de gravité du pied diabétique selon le Consensus International sur le Pied Diabétique (IWGDF, 2007)

Grade	Signes clinique
Grade 1	Pas de symptôme, ni de signe d'infection
Grade 2	Atteinte cutanée uniquement (sans atteinte des tissus sous-cutanés, ni systémique) avec au moins deux des signes suivants : chaleur locale, érythème de 0.5 à 2 cm autour de l'ulcère, sensibilité locale ou douleur, tuméfaction locale ou induration, décharge purulente ; les autres causes de réaction inflammatoire de la peau doivent être éliminées (p.ex. traumatisme, goutte, fracture, etc.)
Grade 3	Erythème de plus de 2 cm et une des constatations décrites ci-dessus ; infection atteignant les structures au-delà de la peau et du tissu sous-cutané ; il ne doit pas y avoir de réponse inflammatoire systémique.
Grade 4	Quelle que soit l'infection locale, si présence de signes systémiques manifestés par au moins deux des caractéristiques suivantes : température > 38°C ou < 36°C, fréquence cardiaque > 90 bpm, fréquence respiratoire > 20 cycles/mn, paCO <sub>2</sub> de < 32mHG, leucocytes > 12'000 G/l ou < 4'000 G/l ; 10% de formes leucocytaires immatures

### Symptômes de l'infection du pied diabétique

Le diagnostic de l'infection repose sur la présence d'au moins deux des signes suivants : augmentation de volume, induration, érythème péri lésionnel, sensibilité locale ou douleur, chaleur locale ou présence de pus (**Lipsky et al., 2004**). La sévérité de l'infection sera jugée d'après la classification du Consensus International sur le pied diabétique

#### (Tableau 3)

Des signes comme un tissu friable, un décollement profond ou une odeur nauséabonde sont également en faveur d'une infection (**Cavanagh et al., 2005**). La réapparition d'une douleur est un signe de gravité

**Tableau 7:** classification de la sévérité de l'infection selon le consensus Internationale de travail sur le pied diabétique (**Stahl et al., 2007**)

Grade	Caractéristiques
Grade 1	absence d'infection clinique : pas de rougeur, pas d'écoulement, pas de fièvre
Grade 2 (Infection superficielle)	infection cutanée avec rougeur < 2 cm autour de la plaie, présence de pus
Grade3 (Infection modérée)	infection sous-cutanée avec rougeur > 2 cm : atteinte profonde ostéoarticulaire, dermohypodermite bactérienne ou nécrosante, fasciite nécrosante
Grade 4 (Infection sévère)	tous les autres grades possibles mais avec des signes généraux : fièvre > 38°, hyperleucocytose > 12 000/mm <sup>3</sup> , tachycardie > 90/mn

## Annexe I (Partie bibliographique)

---

**Tableau 8:** Gradation du risque d'ulcération des pieds chez le diabétique selon le Groupe international de travail sur le pied diabétique (Monnereau *et al.*, 2007)

Grade	Définition
0	Absence de neuropathie sensitive
1	Neuropathie sensitive isolée
2	Neuropathie sensitive associée : <ul style="list-style-type: none"><li>• à une artériopathie des membres inférieurs et/ou</li><li>• à une déformation du pied</li></ul>
3	Antécédent : <ul style="list-style-type: none"><li>• d'ulcération du pied (grade 3A) et/ou</li><li>• d'amputation des membres inférieurs (grade 3B)</li></ul>

## Annexe I (Partie bibliographique)

**Tableau 9** : Corrélation clinico-biologique entre les types de plaies et les germes impliqués et identifiés (Lipsky et al., 2004)

Type de plaie	Bactéries
Plaie superficielle récente sans antibiothérapie récente	<i>S. aureus</i> , streptocoques $\beta$ hémolytiques
Plaie chronique ( $\geq 1$ mois) ou antérieurement traitée par des antibiotiques	<i>S. aureus</i> , streptocoques $\beta$ 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 $\geq 6$ mois), traitement antérieur par des antibiotiques à large spectre	Polymicrobisme : cocci à Gram positif aérobie ( <i>S. aureus</i> , streptocoques $\beta$ hémolytiques, SCN, entérocoques), corynébactéries, entérobactéries, <i>Pseudomonas spp</i> , bacilles à Gram négatif non fermentatifs $\pm$ agents fongiques
Odeur nauséabonde, nécrose, gangrène	Cocci à Gram positif aérobie, entérobactéries, <i>Pseudomonas spp</i> , bacilles à Gram négatif non fermentatifs, anaérobies stricts

## Annexe I (Partie bibliographique)

**Tableau 10:** Principales familles d'antibiotiques et leur mode d'action.

Familles antibiotiques	Mécanismes
<b>Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne</b>	
<b>Béta-lactamines</b> Pénicillines Céphalosporines Carbapénèmes Mono lactames	Elles ont une fortes affinité pour des protéines appelant PLP qui sont des enzymes responsable de la réticulation de peptidoglycane, constituant essentiel de la paroi bactérienne en se fixant sur celle-ci elles inhibent le mécanisme enzymatique, ce qui arrête la synthèse de la paroi et des lors, la multiplication de la bactérie concerne surtout les BGN ( <b>Pebert, 2003</b> )
<b>Glycopeptides</b> Vancomycines Teicoplanines	Elle inhibe la synthèse de la paroi bactérienne par blocage de la glycopeptides synthétase. Elles ont un effet bactéricide mais n'agissent que sur les germes a Gram+, surtout les Staphylocoque ( <b>Begue et Astruc, 1999 ; kayser et al., 2008 ; Reychler, 2008</b> ).
<b>Fosfomycines</b>	C'est un antibiotique naturel (dérive d'acide phosphorique) dont la structure chimique na aucune parenté avec les autres agents antimicrobiens. Elle pénètre dans la bactérie grâce à un système du transport glycérophosphate. Elle inhibe la pyruvyl-transférase, enzyme qui catalyse la synthèse de l'UDP muramyl-pentapeptide matériau de base de peptidoglycane de la paroi bactérienne ( <b>Bustany et Riffaud, 1993</b> )
<b>Antibiotique actif sur les membranes</b>	
<b>Polymyxines</b> <b>Polymyxines E</b> <b>Colistines</b>	Ce sont des polypeptides, qui ont des substances basiques possèdent une structure cyclique et acides gras. Elles se fixent sur la membrane bactérienne (en particulier la membrane externe des BGN) et les désorganisent ( <b>Ndiaye, 2005</b> ).
<b>Antibiotiques inhibant la synthèse protéique</b>	
<b>Aminosides</b> Amikacines ; Gentamycine Tobramycines ; Nétilmycine	Fixation sur la sous unité 30S de ribosome à concentration thérapeutique : inhibent de l'élongation de la chaîne peptidique en bloquant le complexe d'initiations bactéricides ( <b>Laving, 2007</b> ).
<b>Tétracyclines</b>	la structure de base de tétracyclines comprend quatre noyaux cyclique alcolés ils sont des antibiotiques essentiellement bactériostatique, ils se fixent de façon réversible sur la sous unité 30S de ribosome bactérien. Dans une position qui bloque la fixation de l'ARN, sur

## Annexe I (Partie bibliographique)

---

	le site accepteur de complexe ARNm-ribosome ( <b>Page et al., 1999</b> ).
--	---

## Annexe II (Matériels et méthodes)

**Tableau 11:** Tableau de la lecture de la galerie miniaturisée Api20E.

<b>Tableau de la lecture de la galerie miniaturisée Api 20E</b>				
<b>Tests</b>	<b>Substrat</b>	<b>Caractère recherché</b>	<b>Résultats</b>	
			<b>Négatif</b>	<b>Positif</b>
<b>ONPG</b>	Ortho-nitro-phenyl-galactosidase	Beta-galactosidase	Incolore	Jaune
<b>ADH</b>	Arginine	Arginine déshydrogénase	Jaune	Rouge/orange
<b>LDC</b>	Lysine	Lysine décarboxylase		
<b>ODC</b>	Ornithine	Ornithine décarboxylase		
<b>CIT</b>	Citrate de sodium	Utilisation de citrate	Vert pâle /jaune	Bleu-vert/vert
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Thiosulfate de sodium	Production de H <sub>2</sub> S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir
<b>URE</b>	Urée	uréase	Jaune	Rouge/orange
<b>TDA</b>	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Réactif TDA	
			Jaune	Marron foncé
<b>IND</b>	Indole	Production d indole	Réactif de KOVACS	
			Jaune	Anneau rouge
<b>VP</b>	Pyruvate de	Production	VP1+VP2/10min	

## Annexe II (Matériels et méthodes)

	sodium	d'acétone		
			Incolore	Rose/Rouge
<b>GEL</b>	Gélatine de Kohn	Gélatinasse	Non diffusion	Diffusion de pigment noir
<b>GLU</b>	Glucose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>MAN</b>	Mannitol			
<b>INO</b>	Inositol			
<b>SOR</b>	Sorbitol			
<b>RHA</b>	Rhamanose			
<b>SAC</b>	Saccharose			
<b>MEL</b>	Melibiose			
<b>AMY</b>	Amyglaline			
<b>ARA</b>	Arabinose			

**Tableau 12:** Liste des antibiotiques utilisés au cours de notre stage.

Entérobactéries		Pseudomonas		Streptocoques		Staphylocoques	
Charge de disque	ATB	Charge de disque	ATB	Charge de disque	ATB	Charge de disque	ATB
AMC 10 µg	Amoxicilline +Ac clavulanique	CN 10µg	Gentamycin e	AMP 10 µg	Ampicilline	FOX 30 µg	Céfoxitine
AM 10 µg	Amoxicilline	ATM 30 µg	Aztréonm	COT	Cotrimoxazole	P 10 µg	Pénicilline

## Annexe II (Matériels et méthodes)

AMP 30 µg	Ampicilline	TIC 10 µg	Ticarcilline	VA 30µg	Vancomycine	K 30µg	Kanamycine
CN 10 µg	Gentamycine	CIP 5µg	Ciprofloxac ine	C 30 µg	Chloramphéni c ole	OX 1 µg	Oxacilline
C 30 µg	Chloramphéni c ole	IMP 10µg	Imipenème	P 10 µg	Pénicilline	TE 30µg	Tétracycline
IMP 10µg	Imipenème	PIP 100 µg	Pipracilline	E 15 µg	Erythromycine	CN 10 µg	Gentamycine
Cs 25µg	Colistine	NET 30 µg	Netilmicine	CD 2µg	Clindamycine	E 15 µg	Erythromycin e
FOX 30 µg	Céfoxitine	TCC 75 µg	Ticarciline+ Ac clavulaniqu e	SXT 1,25 µg	Triméthopri me +sulfamides	CIP 5µg	Ciprofloxac in e
CZ 30µg	céfazoline	CAZ 10µg	Ceftazidime	TE 30µg	Tétracycline	RIF 5 µg	Rifampicine
CTX 30µg	céfotaxime	TOB 10µg	Tobramycin e	CN 10 µg	Gentamycine	FA 10 µg	Acide fusidique
COT	Cotrimoxazole			LEV 15µg	Levofloxacin e	CD 2 µg	Clindamycin e
AK	Amikacine					TEICO	Teicoplanine

## Annexe II (Matériels et méthodes)

30 µg						30 µg	
CIP 5µg	Ciprofloxacine					VA 30µg	Vancomycine
						C	Chloramphén icole
						PT 15µg	Pristinamycin e

**Tableau 13:** Les valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour les Entérobactéries

Antibiotiques testés	Signes	Charge des Disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)		
			R	I	S	R	I	S
<b>β-lactamines</b>								
Ampicilline	AMP	10µg	≤ 13	14 – 16	≥ 17	≥ 32	16	≤ 8
Amoxicilline +Ac.clavulanique	AMC	20/10µg	≤ 13	14 – 17	≥ 18	≥ 32/16	16/8	≤ 8/4
Céfazoline	CZ	30µg	≤ 19	20 – 22	≥ 23	≥ 8	4	≤ 2
Cefoxitine	FOX	30µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Céfotaxime	CTX	30µg	≤ 22	23 – 25	≥ 26	≥ 4	2	≤ 1
Imipénème	IMP	10µg	≤ 19	20 - 22	≥ 23	≥ 4	2	≤ 1
<b>Aminosides</b>								
Amikacine	AK	30µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17	≥ 64	32	≤ 16
Gentamicine	CN	10µg	≤ 12	13 – 14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4
<b>Quinolones</b>								

## Annexe II (Matériels et méthodes)

Ofloxacine	OFX	5µg	≤ 12	13-15	≥ 16	≥ 8	/	≤ 2
Ciprofloxacine	CIP	5µg	≤15	16-20	≥21	≥4	2	≤ 1
<b>Autres</b>								
Chloramphénicol	C	30µg	≤ 12	13 – 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Furanes	FT	300µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17	≥ 128	64	≤ 32
Fosfomycine	FOS	200µg	≤ 12	13 – 15	≥ 16	≥ 256	128	≤ 64
Acide nalidixique	NA	30µg	≤ 13	14 – 18	≥ 19	≥ 32	/	≤ 16
Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole1	SXT	1.25/23.75µg	≤ 10	11 – 15	≥ 16	≥ 4/76	/	≤ 2/38

**Tableau 14:** Les valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter sp* :

Antibiotiques testés	Signes	Charge des Disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)	
			R	I	S	R	S
<b>β-Lactamines</b>							
<b>Ticarcilline</b>	<b>TIC</b>	<b>75µg</b>					
<i>P.aeruginosa</i>			≤15	16-23	≥24	≥128	≤16
<i>Acinetobacter sp</i>			≤14	15-19	≥20	≥128	≤16
<b>Ticarcilline + ac.clavulanique</b>	<b>TCC</b>	<b>75 /10µg</b>					
<i>P.aeruginosa</i>			≤15	16-23	≥24	≥128/2	≤16/2
<i>Acinetobacter sp</i>			≤14	15-19	≥20	≥128/2	≤16/2
<b>Pipéracilline</b>	<b>PIP</b>	<b>100 µg</b>					
<i>P.aeruginosa</i>			≤14	15-20	≥21	≥128	≤16
<i>Acinetobacter sp</i>			≤17	18-20	≥21	≥128	≤16

## Annexe II (Matériels et méthodes)

Ceftadime	CAZ	30 µg	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8
Aztreonam	ATM	10 µg	≤15	16-21	≥22	≥32	≤8
Imipeneme	IMP	10 µg	≤13	14-15	≥16	≥16	≤4
<b>Aminosides</b>							
Amikacine	AK	30 µg	≤14	15-16	≥17	≥32	≤16
Gentamicine	CN	10 µg	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4
Tobramycine	TOB	10 µg	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4
<b>Quinolones</b>							
Ciprofloxacine	CIP	5 µg	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1
<b>Tetracyclines</b>							
Tétracycline	TE	30 µg	≤15	15-18	≥19	≥16	≤4
<b>Autres</b>							
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	SXT	1.25/23.75µg	≤10	11-15	≥16	≥8/152	≤2/38
Chloramphénicole	C	30 µg	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8
Rifampicine	RIF	30 µg	≤14	14-18	≥19	≥16	≤4

**Tableau 15 :** Les valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Staphylococcus sp* :

Antibiotiques testés	Signes	Charge des Disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)	
			R	I	S	R	S
<b>β-Lactamines</b>							
Pénicilline	P	10 UI	≤28	-----	≥29	≥0,25	≤0,12
Oxacilline	OX	1 µg	≤ 10	11 – 12	≥13	≥4	≤2
Cefoxitine	FOX	30 µg	≤21	-----	≥22	≥8	≥4
<b>Aminosides</b>							
Gentamicine	CN	10 µg	≤ 12	13 – 14	≥ 15	≥ 16	≤4

## Annexe II (Matériels et méthodes)

Kanamycine	K	30 µg	≤ 13	14 – 17	≥18	≥64	≤16
Amikacine	AK	30 µg	≤ 14	15 – 16	≥17	≥64	≤16
<b>Macrolides</b>							
Erythromycine	E	15 µg	≤13	14 – 22	≥23	≥8	≤0,5
Clindamycine	CD	2µg	≤14	15 - 20	≥21	≥4	≤0,5
<b>Glycopeptides</b>							
Vancomycine	VA	30 µg	-----	-----	≥15	≥32	≤4
Teicoplanine	TEICO	30 µg	≤10	11-13	≥14	≥32	≤8
<b>Quinolones</b>							
Ofloxacine	FOX	5µg	≤14	15-17	≥18	≥4	≤1
<b>Autres</b>							
Triméthoprime+ sulfaméthoxazole1	SXT	1.25/23.75µg	≤10	11-15	≥16	≥4/76	≤2/38
Rifampicine	RIF	5µg	≤16	17-19	≥20	≥4	≤1
Tétracycline	TE	30µg	≤14	15 – 18	≥19	≥16	≤4
Chloramphénicol	C	30µg	≤12	13 – 17	≥18	≥32	≤8
Pristinamycine	PT	15 µg	≤19	19 – 21	≥22	≥2	≤1
Acide fusidique	FA	10 µg	≤24	-----	≥24	≥1	≤1
Fosfomycine	FOS	50 µg	≤14	-----	≤14	≥32	≥32

## Annexe II (Matériels et méthodes)

N° 25  
RD

**ÉTABLISSEMENT PUBLIC HOSPITALIER DE BOUFARIK**      **BULLETIN D'ADMISSION**

---

**N° D'ADMISSION** : 17/00/000457      - ADMISSION NORMALE -

Qualité du patient vis à vis de l'assurance : MEDECINE INTERNE      MEDECINE HOMME

Nom : ..... Prénoms : ..... 14 00      Sexe : .....

Date de Naissance : 25/01/2017      Lieu de Naissance : DJAMEL      Code Wilaya : .....

Fil(le)s de : 08/07/1962      Et de : HÂMMAM MELOUANE W. BLIDA      MOHAMED

Nationalité : ZITOUNI FAATMA      Profession : .....      Code Profession : MASCULIN

Situation familiale : Marié(e)      Epoux(se) de : AZZOUZ GHANIA      Code Wilaya : .....

Adresse de résidence : Algérienne      Sans profession #      N° de Tél. : .....

Nom et Prénoms de la personne à contacter : DOUAR BENKHELLIL N°25 C/B E N K H E L L I L      Code Wilaya : (0663)93.41.85

Adresse de contact : ..... 0101

---

**IDENTIFICATION DE L'ASSURÉ**

IMMATRICULATION :        N° DE PRISE EN CHARGE S.S :        DATE :  

Nom : ..... Prénoms : .....

Date de Naissance : ..... DATE DE NAISSANCE :

Caisse D'affiliation : ..... (I) : ..... MO

---

**HOSPITALISATION**

Service d'hospitalisation :        Date d'entrée :        Heure : .....

Nom Unité : ..... N° Unité : ..... N° de lit : ..... Médecin traitant : .....

Mode d'entrée : ..... Code entrée : ..... N° prise en charge (Santé) : ..... le

Établissement d'origine : ..... Unité : ..... Code Wilaya : .....

---

**ACCIDENT**

Type d'accident : ..... NOM et Signature du déposant ou responsable de l'accident

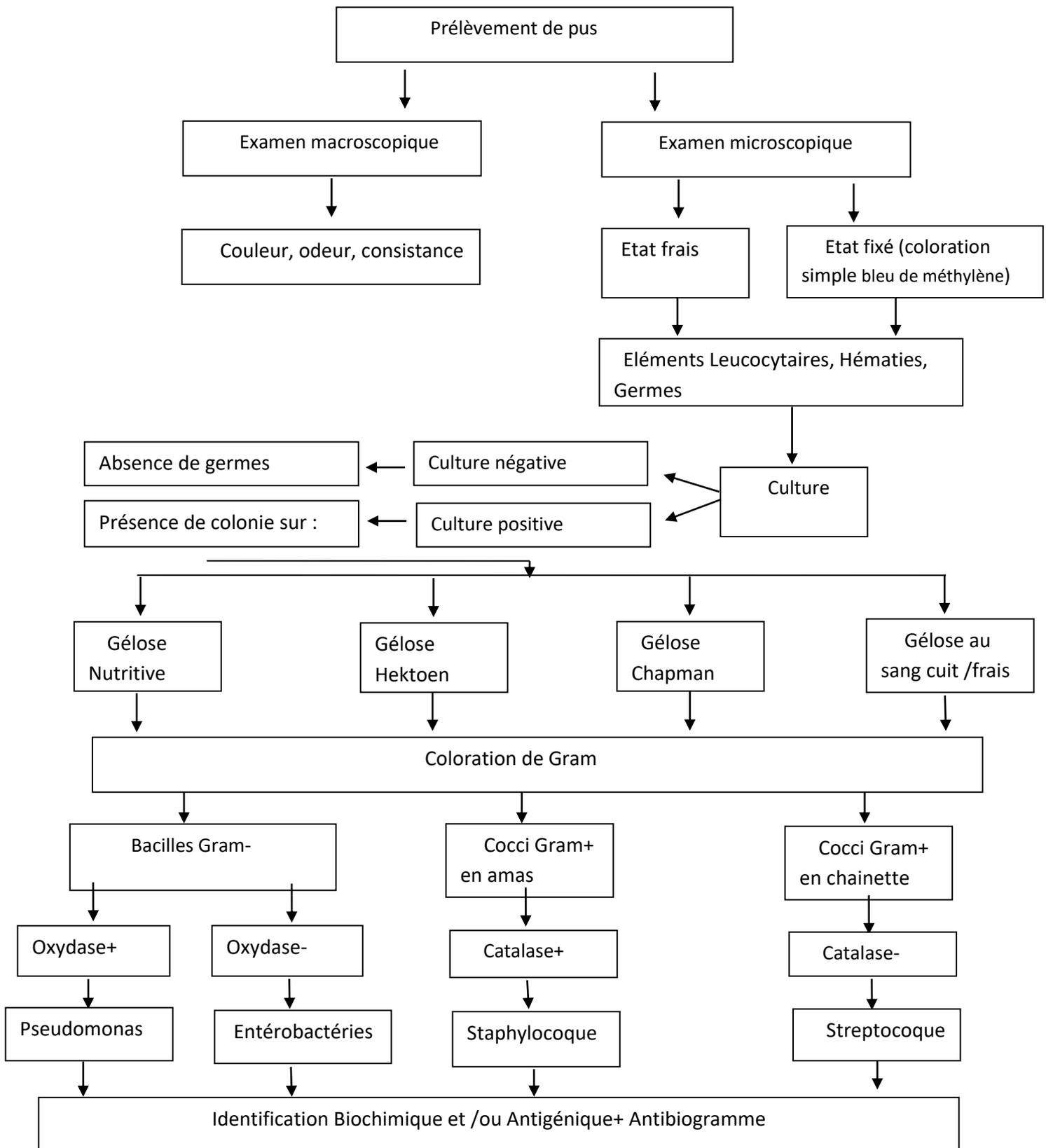
Date de l'évènement : ..... Heure : ..... Lieu : .....

Patient Transporté par ..... Références : .....

Autorité chargée de l'enquête : .....

**Figure 28 : Fiche de renseignement clinique**

## Annexe II (Matériels et méthodes)



**Figure 29:** Diagramme de l'examen cyto bactériologique de pus.

## Annexe II (Matériels et méthodes)

### Appareillage, verreries, réactifs et solutions.



Etuve d'incubation à 37°C



Microscope optique



Bec Bensen



Vortex



Ecouvillons stériles



Agitateur



Balance



Jarre d'anaérobiose



Pipettes Pasteur stériles



Boîtes de Pétri



Pince métallique



Anse de platine



Api 20E



Lames et lamelles



Antibiotiques



Eau physiologique stérile à 0,9%

## Annexe II (Matériels et méthodes)

 <p>Peroxyde d'hydrogène</p>	 <p>Eau de Javel</p>	 <p>Alcool a 95°C</p>	 <p>L'huile de Vaseline</p>
 <p>Violet de Gentiane</p>	 <p>Fuschine</p>	 <p>Lugol</p>	 <p>Bleu de méthylène</p>
 <p>Réactifs de Kovacs</p>	 <p>Réactif TDA</p>	 <p>Réactif Voges-Proskauer VP II</p>	 <p>Réactif Voges-Proskauer VPI</p>
 <p>Acide acétique</p>	 <p>Bécher</p>	 <p>Pipette graduée</p>	 <p>Réactif de la Nitrate NR1</p>

## Annexe II (Matériels et méthodes)

---



Eau distillée



Poudre de Chitosane

**Figure 30:** Appareillage, verreries, réactifs et solutions

## Annexe II (Matériels et méthodes)

Milieux				
Milieux d'isolement				
	 <p style="text-align: center;">Gélose Hektoen</p>	 <p style="text-align: center;">Gélose Chapman</p>	 <p style="text-align: center;">Gélose nutritive</p>	 <p style="text-align: center;">Gélose au sang frais</p>
Milieu d'enrichissement	 <p style="text-align: center;">Milieu bouillon cœur cerveau (BHIB)</p>		 <p style="text-align: center;">Milieu bouillon glucosé tomponné (BGT)</p>	

## Annexe II (Matériels et méthodes)

<p>Milieu d'antibiogramme</p>	 <p>Gélose Muller Hinton</p>	 <p>Gélose Muller Hinton+Sang</p>
<p>Milieux d'identification</p>		
 <p>Citrate de Simmons</p>	 <p>Virage de l'indicateur de pH au bleu : il y a eu alcalinisation du milieu et la souche est citrate de Simmons +.</p>	<p>Recherche de citrate comme seule source de carbone</p>
 <p>Mannitol mobilité</p>	 <p>milieu jaune orangé : Mannitol + La mobilité : Les bactéries très mobiles peuvent se déplacer dans la gélose molle</p>	<p>Recherche du : Mannitol Mobilité</p>
 <p>Arginine dihydrolase</p>		<p>Recherche de décarboxylase et d'hydrolase bactérienne</p>

## Annexe II (Matériels et méthodes)

	<p>-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 violet (phénomène due à l'alcalinisation).</p>	
<p>Ornithine décarboxylase</p> 	<p>- La réaction est négative lorsque les tubes contenant l'acide aminé et le témoin virent au jaune (acidification).</p>	
<p>lysine décarboxylase</p> 	 <p>-Coloration rouge de milieu traduit urée/Indole positif</p>	<p>La mise en évidence de la dégradation de l'indole et l'urée</p>

**Figure 31:** Les principaux milieux de culture utilisés.

## Annexe III (Résultats et discussion)

**Tableau 16** : Répartition des patients en fonction du sexe.

Sexe	Homme	Femme	Totale
Nombre	55	15	70
Pourcentage	78,58%	21,42 %	100%

**Tableau 17** : Répartition des patients selon les tranches d âge de 20 ans.

Age	25-45	45-65	65-85
Nombre de patient	12	52	6
Pourcentage	17,14%	74 ,28%	8,58%

**Tableau 18** : Répartition des patients selon le sexe et l'âge.

Age	25-45	45-65	65-85
Homme	9	41	5
Pourcentage	12,86%	58,56%	7,15%
Femme	3	11	1
Pourcentage	4,29%	15,71%	1,43%
Totale	12	52	6
Pourcentage	17,14%	74,28%	8,58%

**Tableau 19** : Répartition des prélèvements selon le type de diabète.

Type du diabète	Type I	Type II	Totale
Nombre	5	65	70
Pourcentage	7,15%	92,85%	100%

## Annexe III (Résultats et discussion)

**Tableau 20:** Répartition des prélèvements selon les patients hospitalisés et non hospitalisés

Patients	Nombre	Pourcentage(%)
Hospitalisation	62	88,57
Non hospitalisation	8	11,43
Total	70	100

**Tableau 21:** Répartition des résultats selon les cas positifs et négatifs des prélèvements de pus

Positivité et négativité du prélèvement	Nombre	Pourcentage(%)
Prélèvements positifs	64	91,42
Prélèvements négatifs	6	8,58
Total	70	100

**Tableau 22:** Répartition des prélèvements selon la nature des cultures obtenues

Culture	Nombre	Pourcentage(%)
Polybactérienne	45	70,31
Monobactérienne	19	29,69
Total	64	100

**Tableau 23 :** Répartition des résultats selon les groupes de germes identifiés

Bactéries	Nombre	Pourcentage(%)
Bacilles à Gram-	68	64,76
Cocci à Gram+	37	35,24
Total	105	100

## Annexe III (Résultats et discussion)

**Tableau 24:** Répartition des germes identifiés.

	Entérobactéries	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>
Nombre	60	23	14	8
Pourcentage (%)	57,16	21,90	13,33	7,61

**Tableau 25 :** Répartition globale de l'espèces identifiées.

Espèces isolées	Nombre	Pourcentage
<i>Proteus mirabilis</i>	15	14,29%
<i>Escherichia coli</i>	10	9,55%
<i>Morganella moragannii</i>	9	8,57%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	5,71%
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	3,81%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	2,85%
<i>Proteus penneri</i>	3	2,85%
<i>Enterobacter sakazakii</i>	3	2,85%
<i>Proteus vulgaris</i>	2	1,90%
<i>Serratia liquefaciens</i>	2	1,90%
<i>Klebsiella ornitholytica</i>	1	0,90%
<i>Citrobacter koseri</i>	1	0,90%
<i>Klebsiella terrigena</i>	1	0,90%
<i>Staphylococcus aureus</i>	23	21,90%
<i>Streptococcus β hémolytique</i>	6	5,71%
<i>Streptococcus α hémolytique</i>	4	3,80%
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	1,90%

### Annexe III (Résultats et discussion)

<i>Enterococcus faecium</i>	2	1,90%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	7,61%

**Tableau 26:** Profil de l'antibiorésistance des Entérobactéries.

Antibiotiques	Sensible	Résistante
COT	28,46	71,54
AMP	44,15	55,85
AMC	39,62	60,38
CTX	44,15	55,85
CN	71,06	28,94
IMP	50,09	49,91
CS	71,06	28,94
CZ	39,62	60,38
FOX	65,01	34,99
CIP	49,32	50,68
C	71,06	28,94
AK	30,88	69,12

**Tableau 27 :** Profil de l'antibiorésistance des souches de *Proteus mirabilis*

Antibiotiques	Sensible	Résistante
COT	40	60
AMP	73,34	26,66
AMC	53,33	46,67
CTX	86,67	13,33
CN	66,67	33,33
IMP	80	20
CS	40	60
CZ	40	60
FOX	66,67	33,33

### Annexe III (Résultats et discussion)

CIP	73,34	26,66
C	33,34	66,66

**Tableau 28 :** Profil de l'antibiorésistance des souches *d'Escherichia coli*

Antibiotiques	Sensible	Résistante
COT	30	70
AMP	20	80
AMC	20	80
CTX	42,88	57,12
CN	80	20
IMP	70	30
CS	70	30
CZ	70	30
FOX	90	10
CIP	80	20
C	60	40

**Tableau 29:** Profil de l'antibiorésistance des souches de *Morganella morganii*

Antibiotiques	Sensible	Résistante
COT	22,23	77,77
AMP	22,23	77,77
AMC	22,23	77,77
CTX	66,66	33,34
CN	30	70
IMP	77,77	22,23
CS	33,34	66,66
CZ	22,23	77,77
FOX	30,88	69,12
CIP	40	60

## Annexe III (Résultats et discussion)

C	66,66	33,34
---	-------	-------

**Tableau 30:** Profil l'antibiorésistance chez les souches de *Klebsiella pneumoniae*

Antibiotiques	Sensible	Résistante
<b>COT</b>	16,66	83,33
<b>AM</b>	33,33	66,66
<b>AMC</b>	16,66	83,33
<b>CTX</b>	83,33	16,66
<b>CN</b>	66,66	33,33
<b>IPM</b>	83,33	16,66
<b>CS</b>	66,66	33,33
<b>CZ</b>	16,66	83,33
<b>FOX</b>	100	0
<b>CIP</b>	83,33	16,66
<b>C</b>	33,33	66,66

**Tableau 31:** Profil de l'antibiorésistance chez les souches des *Streptococcus*

Antibiotiques	Sensible	Résistante
<b>AMP</b>	100	0
<b>COT</b>	92,85	7,15
<b>VA</b>	92,85	7,15
<b>C</b>	85,71	14,29
<b>P</b>	71,42	28,58
<b>E</b>	71,42	28,58
<b>CD</b>	78,57	21,43

### Annexe III (Résultats et discussion)

<b>SXT</b>	57,14	42,86
<b>TE</b>	35,71	64,29
<b>CN</b>	35,71	64,29
<b>LEV</b>	100	0

**Tableau 32:** Profil de l'antibiorésistance chez les souches de *Pseudomonas aeruginosa*

<b>Antibiotiques</b>	<b>Sensible</b>	<b>Résistante</b>
<b>CN</b>	75	25
<b>ATM</b>	50	50
<b>TIC</b>	25	75
<b>CIP</b>	25	75
<b>IPM</b>	25	75
<b>PIP</b>	37,5	62,5
<b>NET</b>	37,5	62,5
<b>TCC</b>	12,5	87,5
<b>CAZ</b>	12,5	87,5
<b>TOB</b>	0	100

**Tableau 33:** Profil de l'antibiorésistance chez les souches des *Staphylococcus aureus*.

<b>Antibiotiques</b>	<b>Sensible</b>	<b>Résistante</b>
<b>FOX</b>	60,86	39,14
<b>P</b>	26,09	74,91
<b>K</b>	86,95	13,05
<b>OX</b>	65,21	34,79

### Annexe III (Résultats et discussion)

<b>TE</b>	47,82	52,18
<b>CN</b>	56,52	43,48
<b>E</b>	56,52	43,48
<b>CIP</b>	56,52	43,48
<b>RIF</b>	56,52	43,48
<b>FA</b>	62,6	17,4
<b>CD</b>	65,21	34,79
<b>TEICO</b>	43,48	56,52
<b>VA</b>	60,86	39,14
<b>C</b>	74,91	26,09
<b>PT</b>	91,3	8,7

**Tableau 34:** Répartition des souches des *Staphylococcus aureus* selon la résistance à la méthiciline.

<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>MRSA</b>	<b>MSSA</b>	<b>Totale</b>
<b>Nombre</b>	8	15	23
<b>Pourcentage</b>	34,78%	65 ,22%	100%

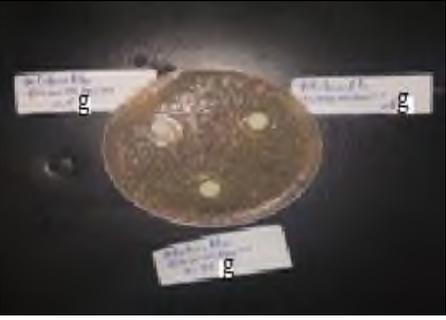
**Tableau 35:** Profil de l'antibiorésistance chez les souches des MRSA.

### Annexe III (Résultats et discussion)

Antibiotiques	Sensible		Résistante	
	Nombre	Pourcentage (%)	Nombre	Pourcentage (%)
<b>FOX</b>	0	0	8	100
<b>P</b>	0	0	8	100
<b>K</b>	6	75	2	25
<b>OX</b>	0	0	8	100
<b>TE</b>	3	37,5	5	62,5
<b>CN</b>	6	75	2	25
<b>E</b>	5	62,5	3	37,5
<b>CIP</b>	7	87,5	1	12,5
<b>RIF</b>	5	62,5	3	37,5
<b>FA</b>	1	12,5	7	87,5
<b>CD</b>	6	75	2	25
<b>TEICO</b>	3	37,5	5	62,5
<b>VA</b>	0	0	8	100
<b>C</b>	6	75	2	25
<b>PT</b>	7	87,5	1	12,5

--	--

## Annexe III (Résultats et discussion)

	C1, C2, C3 dans V1	C1, C2, C3 dans V2
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
<i>Proteus mirabilis</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		

**Figure 32:** Activité antibactérienne du chitosane sur les souches isolées du pied diabétique par la méthode de diffusion par disque

## **Annexe III (Résultats et discussion)**

---