



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen



Laboratoire De Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire Biomédical Et  
l'Environnement « LAMAABE »

## **Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de MASTER en Microbiologie Fondamentale**

**Filière : Sciences Biologiques**

Présenté par :

**Melle : Boukli Hacène Amina**

**Melle : Stambouli Naila**

**Thème**

**Détection de la formation du biofilm des souches  
bactériennes issues du pied diabétique et leurs inhibitions  
par les nanoparticules d'argent**

Soutenu le 13-06-2024, devant le jury composé de :

Présidente	Mme Hassaine Hafida	Professeur	Université de Tlemcen
Encadrante	Mme Bellifa Samia	MCA	Université de Tlemcen
Examinatrice	Mme Kara Terki Ibtissem	MCA	Université de Tlemcen

**Année universitaire 2023/2024**

# Remerciements

En tout premier lieu, nous remercions Dieu **ALLAH**, le tout puissant, qui nous a protégé, aidé et qui nous a donné la force, la patience et le courage pour accomplir ce modeste travail.

Nous souhaitons exprimer notre profonde gratitude envers notre encadrante, **Mme Bellifa Samia** maître de conférences A, pour avoir généreusement accepté de nous guider et de nous soutenir tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Sans oublier **Mr Benamar Ibrahim** maître de conférences B, pour son soutien, sa disponibilité et ses précieux conseils.

Aux membres du jury,

Présidente du jury Professeur **Hassaine Hafida** ; et examinatrice **Kara Terki Ibtissem**.

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger notre travail de fin d'études. Puisse ce travail témoigner de notre reconnaissance et de l'estime que nous portons à votre personne exemplaire.

Nous tenons également à remercier le professeur **Rebiahi Sid Ahmed** directeur du laboratoire « **LAMAABE** » de nous avoir intégré au sein de son équipe.

Nous tenons à adresser nos remerciements aux patients qui ont acceptés de prendre part à notre étude avec grande patience, priant Dieu en leurs souhaitant un prompt rétablissement.



# Dédicace

*Je tiens à dédier ce travail,*

*A mes chers parents **ma mère et mon père**. Vous avez toujours été mon école de patience, de confiance et surtout d'espoir. Vous êtes et vous resterez pour moi ma référence, la lumière qui illumine mon chemin. Ce travail est le résultat de l'esprit de sacrifice dont vous avez fait preuve. Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et encouragements. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement et votre bonté exceptionnelle. Que Dieu Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur, Vous êtes ma source de vie, d'amour et d'affection.*

*À ma sœur bien-aimée **SARRA**, dont la présence a toujours été un réconfort et une source de joie dans ma vie. Ta bienveillance est inestimable.*

*A mes chers frères **ABDELHAMID et ILYES** pour leur présence, leurs encouragements que dieu leur donne beaucoup de bonheur, santé et réussite dans la vie.*

*À toute ma famille, merci pour votre soutien et vos encouragements.*

*À tous mes amis(es) qui m'ont soutenu, aidé et encouragé tout au long de ce voyage académique.*

*A mon Binôme **NAILA**, A qui je souhaite tout le bonheur, ainsi qu'à sa famille.*

*A tous mes collègues de la promotion 2023/2024.*

*Et enfin, à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire, je vous adresse ma plus profonde gratitude. MERCI*

**BOUKLI HACENE AMINA**

# *Dédicace*

**À ceux qui ont illuminé mon chemin,**

**À mes parents, Amine et Fouzia,**

Pour leur amour inconditionnel, leur soutien et leurs encouragements constants. Leur foi en moi m'a donné la force de persévérer même dans les moments les plus difficiles. Veuillez recevoir toute ma gratitude et mon amour sincère.

**À ma sœur Ghizlène, son mari Nabil et ma nièce Nada,**

Pour leur soutien indéfectible, leurs encouragements constants et leur amour inconditionnel. Votre présence à mes côtés a été une source de réconfort et de motivation tout au long de ce parcours. Je vous remercie de tout cœur pour votre générosité et votre bienveillance.

**À Yasmina, Lotfi, son épouse Imane et à tous les autres membres de ma famille,**

Pour leur amour, leurs encouragements sans faille. Vous avez été ma source de motivation et d'inspiration à chaque étape. Veuillez recevoir toute ma gratitude et mon amour éternel.

**À mes amis(es),**

Pour leur amitié sincère, leurs conseils et leurs encouragements. Merci pour les moments de détente et de partage qui m'ont aidé à garder le cap. Votre amitié m'est précieuse et je vous en suis profondément reconnaissante.

Sans oublier mon binôme Amina pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.

Enfin, à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, je vous adresse mes plus sincères remerciements et je vous exprime toute ma gratitude. Votre aide et votre soutien ont été indispensables à l'accomplissement de ce travail.

**Stambouli Naila**

## ملخص

يمثل مرض السكري، مرض مزمن واستقلابي في الجسم، أحد أكبر التحديات الصحية في عصرنا. إذا تم علاج هذا المرض بشكل سيء أو غير كاف، فإنه يتطور في كثير من الأحيان ويتطور تدريجياً نحو مضاعفات بما في ذلك القدم السكرية أو قرحة القدم التي يتشكل عليها غشاء حيوي مقاوم للمضادات الحيوية. تتكون دراستنا من إعادة إنتاج الغشاء الحيوي من سلالات بكتيرية تم جمعها من أقدم مرضى السكري المختلفة في هياكل الرعاية المخصصة لمرضى السكر بالمستشفى الجامعي تلمسان.

أتاحت لنا هذه الدراسة أيضاً فحص فعالية جسيمات الفضة النانوية المُصنَّعة حيوياً في تثبيط هذه الأغشية الحيوية. تمت تنقية وتحديد السلالات البكتيرية المعزولة من خلال الفحوصات المورفولوجية والاختبارات البيوكيميائية، بما في ذلك معروض API Staph و API 20E. بالتوازي، تم تقييم تشكيل بيوفيلم باستخدام تقنية لوحة زراعة الأنسجة (TCP). بعد ذلك، قمنا بتقييم النشاط المضاد للميكروبات والأغشية الحيوية للجسيمات النانوية المُصنَّعة حيوياً. من بين البكتيريا الأكثر شيوعاً *Staphylococcus aureus* (41%)، الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* (25%).

تليها البكتيريا الأخرى (18%) *Serratia (marcescens and liquefaciens)*، (7%) *Proteus mirabilis*، (4%) *Micrococcus*، ثم *Acinetobacter baumannii* (3%) و *Klebsiella pneumoniae* (2%).

بالإضافة إلى ذلك، تم الكشف عن ملامح تكوين الأغشية الحيوية لهذه السلالات على النحو التالي: وجد أن *Serratia marcescens* هي أكثر السلالات تكويلاً للبيوفيلم، تليها المكورات الذهبية *Staphylococcus aureus*، *Proteus mirabilis*، و *Acinetobacter baumannii* ككائنات عالية إنتاج البيوفيلم، في حين تم تجميع السلالات الأخرى (*Pseudomonas aeruginosa*، *Klebsiella pneumoniae*، *Serratia liquefaciens*، *Micrococcus*) كمنتجات الأغشية الحيوية المعتدلة.

أظهرت الاختبارات التي أجريت لتقييم النشاط المضاد للميكروبات والمضاد للأغشية الحيوية لـ AgNPs المُصنَّعة حيوياً نشاطاً كبيراً ضد السلالة البكتيرية *Serratia marcescens*. تسلط هذه النتائج الضوء على الاهتمام المحتمل بـ AgNPs المُصنَّعة حيوياً كاستراتيجية واعدة في مكافحة الالتهابات المرتبطة بالأغشية الحيوية البكتيرية.

**الكلمات المفتاحية:** مرض السكري، القدم السكرية، الأغشية الحيوية، جزيئات الفضة النانوية

## Résumé

Le diabète maladie chronique et métabolique de l'organisme, représente l'un des plus grands défis sanitaires de notre époque. Mal traitée ou insuffisamment traitée cette maladie évolue très souvent et progressivement vers des complications dont le pied diabétique ou ulcère du pied sur lequel se forme un biofilm résistant aux antibiotiques.

Notre étude consistait à former un biofilm à partir de souches bactériennes prélevées sur différents pieds diabétiques au niveau des structures de soins dédiées aux diabétiques du CHU Tlemcen et d'examiner l'efficacité des nanoparticules d'argent biosynthétisées dans l'inhibition de ces biofilms.

Les souches bactériennes isolées ont été purifiées et identifiées grâce à des examens morphologiques et des tests biochimiques, notamment les galeries API Staph et API 20E.

En parallèle, la formation de biofilm a été évaluée en utilisant la technique de plaque de culture de tissu (TCP). Ensuite, nous avons évalué l'activité antimicrobienne et anti-biofilm des nanoparticules biosynthétisées. Parmi les bactéries les plus fréquemment retrouvées : *Staphylococcus aureus* (41%), *Pseudomonas aeruginosa* (25%).

Suivi par les autres bactéries *Serratia marcescens* et *liquefaciens* (18%), *Proteus mirabilis* (7%), *Micrococcus* (4%), puis *Acinetobacter baumannii* (3%), et *Klebsiella pneumoniae* (2%).

De plus, les profils de formation de biofilm de ces souches ont été révélés comme suit : *Serratia marcescens* s'est avérée la souche la plus fortement formatrice de biofilm, suivie de *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* et *Acinetobacter baumannii* ont été classées comme des formatrices du biofilm, tandis que les autres souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia liquefaciens*, *Micrococcus* ont été modérément formatrices du biofilm. Les tests menés pour évaluer l'activité antimicrobienne et anti-biofilm des AgNPs biosynthétisées ont mis en évidence une activité significative contre la souche bactérienne *Serratia marcescens*. Ces résultats soulignent l'intérêt potentiel des AgNPs biosynthétisées comme une stratégie prometteuse dans la lutte contre les infections liées aux biofilms bactériens.

**Les mots clés :** Diabète, Pied Diabétique, Biofilm, Nanoparticules d'argent.

## Abstract

Diabetes, a chronic and metabolic disease of the body, represents one of the greatest health challenges of our time. Poorly treated or insufficiently treated, this disease very often and progressively progresses towards complications including diabetic foot or foot ulcer on which a biofilm resistant to antibiotics forms.

Our study consisted of reproducing a biofilm from bacterial strains collected from different diabetic feet in the care structures dedicated to diabetics at Tlemcen Hospital.

This study also allowed us to examine the effectiveness of biosynthesized silver nanoparticles in inhibiting these biofilms.

The isolated bacterial strains were purified and identified through morphological examinations and biochemical tests, including API Staph and API 20E galleries.

In parallel, biofilm formation was assessed using the tissue culture plate (TCP) technique. Next, we evaluated the antimicrobial and anti-biofilm activity of the biosynthesized nanoparticles.

Among the most frequently found bacteria: *Staphylococcus aureus* (41%), *Pseudomonas aeruginosa* (25%).

Followed by the other bacteria *Serratia marcescens* and *liquefaciens* (18%), *Proteus mirabilis* (7%), *Micrococcus* (4%), then *Acinetobacter baumannii* (3%), and *Klebsiella pneumoniae* (2%).

Additionally, the biofilm formation profiles of these strains were revealed as follows:

*Serratia marcescens* was found to be the most biofilm forming strain, followed by *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* and *Acinetobacter baumannii* were classified as high biofilm producing organisms, while the other strains *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia liquefaciens*, *Micrococcus* were grouped as moderate biofilm producers.

The tests carried out to evaluate the antimicrobial and anti-biofilm activity of the biosynthesized AgNPs demonstrated significant activity against the bacterial strain *Serratia marcescens*. These results highlight the potential interest of biosynthesized AgNPs as a promising strategy in the fight against infections linked to bacterial biofilms.

**Key words:** Diabetes, Diabetic Foot, Biofilm, Silver nanoparticles.

# Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1
Synthèse bibliographique	

## Chapitre I : Généralités sur le diabète

1. Définition du diabète.....	5
2. Epidémiologie du diabète.....	5
2.1. Dans le monde.....	5
2.2. En Algérie.....	6
3. Classification du diabète.....	7
3.1. Le diabète de type 01(insulinodépendant).....	7
3.2. Le diabète de type 02(non insulinodépendant).....	7
3.3. Le diabète gestationnel.....	7
4. Complications dues au diabète.....	8

## Chapitre II : Pied diabétique

1. Définition du pied diabétique.....	10
2. Epidémiologie du pied diabétique.....	10
3. Physiopathologie du pied diabétique.....	10
3.1. La neuropathie diabétique périphérique.....	11
3.1.1. Mécanismes pathogéniques.....	12
3.1.1.1. La neuropathie motrice.....	12
3.1.1.2. La neuropathie sensorielle.....	12
3.1.1.3. La neuropathie autonome.....	12
3.1.2. Complications de la neuropathie.....	12
<input type="checkbox"/> Mal perforant plantaire.....	12
<input type="checkbox"/> Pied de Charcot.....	13
3.2. L'artériopathie.....	13
3.2.1. Complication de L'artériopathie.....	14
<input type="checkbox"/> Les troubles trophiques.....	14
<input type="checkbox"/> La gangrène.....	14
3.3. Infection.....	14

4.	Etiologie bactérienne de l'infection du pied diabétique .....	15
4.1.	Les bactéries à Gram positif responsables d'infections sur pieds diabétiques .....	16
4.1.1.	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
4.1.2.	<i>Streptococcus</i> .....	17
4.1.3.	<i>Micrococcus spp.</i> .....	17
4.2.	Les bactéries à Gram négatif (BGN) .....	17
4.2.1.	<i>Escherichia coli</i> .....	17
4.2.2.	<i>Proteus mirabilis</i> .....	18
4.2.3.	Le groupe KES ( <i>Klebsiella - Enterobacter - Serratia</i> ) .....	18
4.2.4.	<i>Acinetobacter baumannii</i> .....	19
4.2.5.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	19
5.	Implication des biofilms dans les plaies chroniques sur le pied diabétique .....	19

### **Chapitre III : Généralité sur les biofilms**

1.	Historique.....	20
2.	Définition du biofilm.....	20
3.	Structure et composition du biofilm.....	21
4.	Les étapes de la formation d'un biofilm .....	22
a.	L'attachement initial ou réversible .....	22
b.	L'attachement irréversible.....	22
c.	La formation de micro colonies.....	22
d.	La maturation ou le développement.....	23
e.	La dissémination ou le détachement de la matrice .....	23
5.	Moyen de lutte contre la formation des biofilms .....	23
a.	L'antibiothérapie.....	23
b.	Les huiles essentielles .....	24
c.	Les phages .....	24
d.	La nanotechnologie.....	24

### **Chapitre IV : Généralité sur les nanoparticules**

1.	La nanotechnologie .....	25
1.1.	Définition des nanoparticules .....	25
1.2.	Les sources de nanoparticules.....	26
1.2.1.	Les nanoparticules naturelles.....	26
1.2.2.	Les nanoparticules non manufacturées.....	26
1.2.3.	Les nanoparticules manufacturées .....	26

2.	Les nanoparticules d'argent .....	26
2.1.	La synthèse des nanoparticules d'argent .....	26
2.1.1.	Les méthodes physiques .....	27
2.1.2.	Les méthodes chimiques.....	27
2.1.3.	La synthèse biologique (synthèse-verte) .....	27
2.2.	Applications des nanoparticules d'argent.....	28
2.3.	Activité antibactérienne des nanoparticules d'argent.....	28
2.4.	Les mécanismes d'actions des nanoparticules.....	29
2.4.1.	Contact avec la paroi .....	29
2.4.2.	Génération des espèces oxydantes réactives (ROS).....	29
2.4.3.	L'inactivation des protéines et destruction de l'ADN.....	29

### **Matériel et Méthodes**

1.	Lieu d'étude .....	32
2.	Prélèvements .....	32
3.	Ensemencement et isolement .....	33
4.	Purification.....	34
5.	Identification des bactéries .....	34
6.	Conservation des souches .....	34
7.	Evaluation de la formation de biofilm <i>in vitro</i> .....	35
7.1.	Préparation des inoculums .....	35
7.2.	Standardisation des souches.....	35
7.3.	Méthode sur plaque de culture tissulaire « Tissue Culture Plate » (TCP).....	35
8.	La biosynthèse des nanoparticules d'argent .....	36
8.1.	Ensemencement des souches conservées.....	36
8.2.	Préparation de la solution de nitrate d'Argent.....	36
8.3.	Préparation des nanoparticules d'Argent .....	36
9.	Séchage .....	37
10.	Préparation de la suspension de la bactérie testée .....	39
10.1.	Evaluation de l'activité antibactérienne des AgNPs.....	39
10.2.	Evaluation de l'activité anti-biofilm .....	39

### **Résultats et Discussion**

1.	Répartition des Prélèvements.....	43
1.1.	Selon la tranche d'âge .....	43
1.2.	Selon le sexe .....	44
1.3.	Selon le type de diabète .....	45



2.	Résultats macroscopiques de l'analyse bactériologique des prélèvements .....	45
2.1.	Les bactéries Gram positives .....	45
2.1.1.	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	45
2.1.2.	<i>Micrococcus.Spp</i> .....	46
2.2.	Les bactéries Gram négatives .....	46
2.2.1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	46
2.2.2.	<i>Acinetobacter baumannii</i> .....	47
2.2.3.	<i>Proteus mirabilis</i> .....	47
2.2.4.	<i>Serratia marcescens</i> .....	48
2.2.5.	<i>Serratia liquefaciens</i> .....	48
2.2.6.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	48
3.	Identification biochimique de quelques souches isolées .....	49
4.	Résultats d'évaluation de la formation de biofilm <i>in vitro</i> .....	51
5.	La biosynthèse des nanoparticules à partir de la bactérie <i>Bacillus Spp</i> .....	55
6.	Séchage de la solution des nanoparticules d'argent .....	57
7.	L'activité antimicrobienne des nanoparticules d'argent.....	57
8.	L'activité anti-biofilm des nanoparticules d'argent .....	59
<b>Conclusion et perspectives</b>		
	Références bibliographiques .....	60
	Annexes .....	60

## Liste des abréviations

- **Ag** : Argent
- **AgNO<sub>3</sub>** : Nitrate d'argent
- **AgNP** : Nanoparticule d'argent
- **AP** : Artériopathie périphérique
- **BGN** : Bactéries à Gram négatif
- **BHIB** : Brain Heart Infusion Broth
- **CHU** : Centre Hospitalier Universitaire.
- **CMB** : Concentration Minimale bactéricide
- **CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
- **Cu** : cuivre
- **DO** : Densité Optique
- ***E. coli*** : *Escherichia coli*
- **EPS** : Substances polymériques extracellulaires
- **FID** : Fédération Internationale du Diabète
- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène
- **HE** : huile essentielle
- **HTA** : Hypertension artérielle
- ***KES*** : *Klebsiella - Enterobacter – Serratia*
- **Mg** : magnésium
- **mM** : mili molaire
- **MPP** : Mal perforant plantaire
- **nM** : nanomètre
- **NP** : Nanoparticule

- **O<sub>2</sub>** : Oxygène
- **OH** : hydroxyle
- ***P. aeruginosa*** : *Pseudomonas aeruginosa*
- ***P. mirabilis*** : *Proteus mirabilis*
- **pH** : Potentiel d'Hydrogène
- **ROS** : Espèces réactives de l'oxygène
- ***S. aureus*** : *Staphylococcus aureus*
- **SCN** : Staphylocoques à Coagulase Négative
- **SPR** : Résonance plasmonique de surface
- **Staph** : *Staphylococcus aureu*
- **TCP** : Tissue Culture Plate
- **UV-vis** : Ultraviolet visible

## Liste des figures

<b>Figure 01:</b> Répartition mondiale du diabète selon la Fédération Internationale du Diabète .....	6
<b>Figure 02:</b> Localisation des différentes complications micro et macro angiopathiques associées au diabète de type 2 .....	9
<b>Figure 03:</b> Physiopathologie du pied diabétique à risque.....	11
<b>Figure 04:</b> Physiopathologie du MPP.....	13
<b>Figure 05:</b> Observation du biofilm par microscope électronique .....	21
<b>Figure 06:</b> Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm.....	23
<b>Figure 07:</b> Gamme de tailles des nanoparticules comparées à celle des principales structures .....	25
<b>Figure 08:</b> Mécanismes d'action des nanoparticules (NP) contre les bactéries .....	30
<b>Figure 09:</b> Prélèvements à partir des plaies du pied diabétique .....	32
<b>Figure 10:</b> Prélèvements des plaies infectées dans un bouillon d'enrichissement BHIB .....	33
<b>Figure 11:</b> Nitrate d'argent (AgNO <sub>3</sub> ).....	36
<b>Figure 12:</b> Solution de nitrate d'argent .....	36
<b>Figure 13:</b> La biosynthèse des nanoparticules d'argent .....	38
<b>Figure 14:</b> L'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent .....	39
<b>Figure 15:</b> La plaque témoin .....	40
<b>Figure 16:</b> La plaque contenant AgNPs.....	41
<b>Figure 17:</b> Répartition des prélèvements selon l'âge n=10 .....	43
<b>Figure 18:</b> Répartition des patients selon le sexe. ....	44
<b>Figure 19:</b> Aspect des colonies de <i>S.aureus</i> .....	46
<b>Figure 20:</b> Test de coagulase.....	46
<b>Figure 21:</b> Aspect des colonies de <i>Micrococcus.Spp</i> .....	46
<b>Figure 22:</b> Aspect des colonies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	47
<b>Figure 23:</b> Aspect des colonies de <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	47
<b>Figure 24:</b> Aspect des colonies de <i>Proteus mirabilis</i> .....	48
<b>Figure 25:</b> Aspect des colonies de <i>Serratia marcescens</i> .....	48
<b>Figure 26:</b> Aspect des colonies de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	49
<b>Figure 27:</b> Identification biochimique (Api 20 <sup>E</sup> et API Staph) des souches isolées .....	50

<b>Figure 28:</b> Répartition des espèces bactériennes isolées à partir des prélèvements du pied diabétique.....	50
<b>Figure 29:</b> Evaluation de la formation de biofilm des souches bactériennes isolées par la technique TCP.....	52
<b>Figure 30:</b> Quantification de la formation de biofilm par les souches bactériennes isolées....	54
<b>Figure 31:</b> Résultats de la biosynthèse des AgNPs par <i>Bacillus spp</i> .....	56
<b>Figure 32:</b> Poudre de nanoparticule d'argent.....	57
<b>Figure 33:</b> L'activité antibactérienne des AgNPs contre <i>Serratia marcescens</i> .....	57
<b>Figure 34:</b> Résultat obtenue par l'analyse (Heat map) d'inhibition de <i>Serratia marcescens</i> par les AgNPs.....	58
<b>Figure 35:</b> L'activité antibiofilm des AgNPs contre de la souche la plus formatrice de biofilm ( <i>Serratia marcescens</i> ).....	59
<b>Figure 36:</b> Résultats d'activité des nanoparticules d'argent contre le biofilm formé par <i>Serratia marcescens</i> à travers l'analyse par « Heat map ».....	59

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01:</b> Comparaison entre le diabète de type 1 et le diabète de type 2.....	7
<b>Tableau 02:</b> Corrélation clinicobactériologique entre les types de plaies et les germes impliqués et identifiés.....	16
<b>Tableau 03:</b> Répartition des patients selon le type de diabète. ....	45
<b>Tableau 04:</b> Résultats de la formation de biofilm par la méthode TCP. ....	53



**Introduction  
générale**

Le diabète est un problème de santé mondial dont la prévalence est croissante dans le monde entier. Il constitue la seconde cause de mortalité en Algérie et la cinquième dans le monde (**Ahmed et al., 2015**).

Cette maladie progresse discrètement et subtilement jusqu'à ce que des complications graves se manifestent. Elle touche plusieurs systèmes et tissus du corps, particulièrement les yeux, les reins, le cœur et les vaisseaux (**Mansour, 2012**). Mais les complications associées à la maladie du pied posent un défi clinique significatif et fréquemment complexe (**Powlson et al., 2010**).

L'infection du pied diabétique est une complication fréquente silencieuse mais grave par sa mortalité, morbidité et le handicap qu'elle occasionne. Elle constitue la principale cause d'hospitalisation des diabétiques et l'une des causes majeures d'amputation des membres inférieurs (**Hammami et al., 2015**).

En effet, l'infection liée au pied diabétique résulte de la prolifération de microorganismes qui s'attachent à la surface des plaies, formant un biofilm résistant aux antibiotiques (**Zemmouri et al., 2015**).

Parmi les agents pathogènes impliqués, on trouve notamment *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et diverses entérobactéries. Les plaies diabétiques sont particulièrement vulnérables à la formation de biofilms qui sont des communautés microbiennes organisées protégées par une matrice extracellulaire. Ces biofilms sont plus difficiles à traiter que les bactéries planctoniques. Leur accumulation dans les plaies entraîne une infection persistante, retarde la cicatrisation et rend le traitement moins efficace (**Raj Sah et Venkatasubbu, 2024**).

La fabrication des nanoparticules par des méthodes biologiques représente une approche attractive en raison de son coût relativement bas, de sa rapidité et de son efficacité comparée aux méthodes chimiques classiques. Cette méthode offre une évolutivité facile à des échelles de production plus importantes et est généralement moins exigeante sur le plan technique (**Zubair et al., 2024**).

De nos jours, les progrès réalisés dans le domaine de la nanotechnologie ouvrent de nouvelles perspectives en matière de lutte contre les micro-organismes pathogènes responsables de maladies infectieuses, grâce à l'utilisation de nanoparticules métalliques. Parmi ces matériaux, les nanoparticules d'argent occupent une place prépondérante en raison de leurs remarquables propriétés antibactériennes et anti-biofilm. Toutefois, malgré leur potentiel, leur utilisation



comme agents antimicrobiens de nouvelle génération pour traiter les micro-organismes multi résistants soulève encore de nombreuses questions (**Rai *et al.*, 2016**).

L'objectif de cette étude est l'évaluation de la formation du biofilm par des souches isolées à partir de pieds diabétiques au niveau des structures de soins dédiées aux diabétiques du CHU Tlemcen.

Et en deuxième lieu ; tester l'efficacité des nanoparticules d'argent biosynthétisées dans l'inhibition de ces biofilms.

# **Synthèse bibliographique**

## Chapitre I : Généralités sur le diabète

Le diabète est un problème majeur de santé qui a atteint des proportions alarmantes, actuellement, près d'un demi-milliard de personnes dans le monde vivent avec le diabète.

C'est une menace sanitaire réelle qui ne dépend pas du statut socio-économique et ne connaît pas de frontières. Les diabétiques sont à risque de développer plusieurs complications graves et potentiellement mortelles. Ainsi, leur qualité de vie est inférieure, elles nécessitent plus de soins médicaux et cela cause un stress excessif pour leurs proches. De fréquentes hospitalisations et des décès prématurés peuvent résulter d'une mauvaise prise en charge du diabète et de ses complications. Le diabète est l'une des dix principales causes de décès à l'échelle mondiale (Fid, 2019).

### 1. Définition du diabète

C'est une maladie chronique et un problème de santé majeur dans la société moderne, touchant un adulte sur onze (Pranata *et al.*, 2021). Cette pathologie est caractérisée par un taux de glucose trop élevé dans le sang, appelé hyperglycémie. Elle se produit lorsqu'il n'y a pas d'insuline produite par le pancréas, qu'elle soit insuffisante ou inefficace. Habituellement, les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans, situées dans le pancréas, produisent de l'insuline, une hormone qui intervient dans la régulation du taux de sucre dans le sang. Lorsqu'elle est présente dans le sang, elle sert de clé pour que le glucose soit absorbé par différentes cellules de l'organisme et converti en énergie. En cas d'abîme, d'usure ou de destruction des îlots de Langerhans, une faille dans ce système de production d'insuline et de régulation se manifeste. Dès lors, la glycémie ne peut plus être gérée correctement. Un taux de glucose sanguin anormalement élevé, est donc la manifestation principale du diabète sucré (Sulmon, 2020).

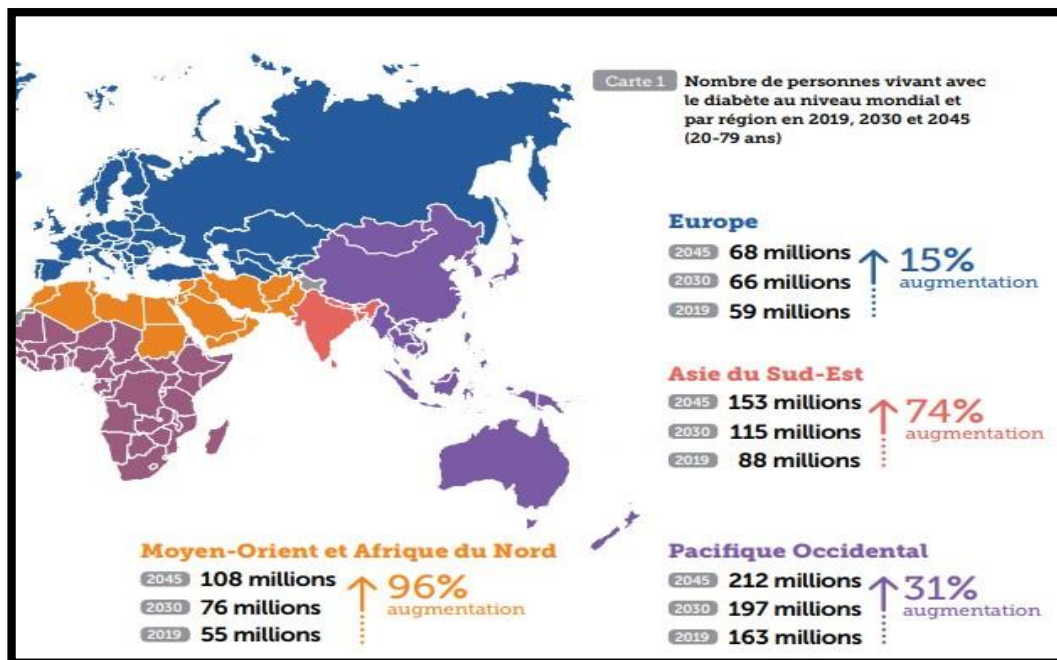
### 2. Epidémiologie du diabète

#### 2.1. Dans le monde

Le diabète est une maladie chronique qui se développe dans le monde entier. En 2021, plus de 537 millions de cas de diabète ont été signalés dans le monde, et ce nombre continue d'augmenter (Mahgoub, 2023). Soit 9,3 % de la population mondiale dans cette tranche d'âge (20 à 79 ans), sont atteints de diabète, la majorité de ces personnes vivant dans des pays à faible ou moyen revenu. 1/3 des individus ont plus de 65 ans. 50 % n'ont pas reçu de diagnostic. Environ 1 million d'enfants et d'adolescents souffrent de diabète de type 1, et son incidence augmente. Le diabète augmente de 8 fois le risque d'amputation, de 3 fois le risque

d'accident cardiaque ou cérébral et de 9 fois le risque de dialyse rénale et reste la première cause de cécité. La moitié de toutes les causes de mortalité, soit 11,3 %, se situe avant 60 ans (Jaffiol, 2021). En 2045, il est prévu que 783 millions de personnes dans le monde souffriront de diabète. On pense que la principale cause de l'augmentation de l'incidence de la maladie est la réduction de l'activité physique due à l'urbanisation, car elle est associée à des taux plus élevés d'obésité (Figure 01).

A travers ces données et selon toutes les recherches menées sur le diabète, ils ont constaté qu'il s'agit d'une maladie qui touche toutes les tranches d'âge et tous les sexes, une pathologie qui a vu un développement très rapide au cours de ces dernières années (Mahgoub, 2023).



**Figure 01:** Répartition mondiale du diabète selon la Fédération Internationale du Diabète (FID, 2019)

## 2.2. En Algérie

Le diabète se classe en deuxième position dans le classement des maladies chroniques en Algérie, juste derrière l'hypertension. En effet, le diabète est devenu un véritable problème de santé publique. En 2019, l'Algérie comptait 1 904 700 diabétiques, soit une prévalence de 7,2 %, et 1 668 300 personnes diabétiques non diagnostiquées. Le diabète est une cause majeure de mortalité et de morbidité dans la population active en Algérie, il est donc essentiel de prendre les mesures nécessaires pour arrêter ce fléau (FID, 2019).

### 3. Classification du diabète

Il existe plusieurs types de diabète dont :

#### 3.1. Le diabète de type 01(insulinodépendant)

Les diabétiques de type 1 sécrètent peu ou pas d'insuline. La glycémie, c'est-à-dire le taux de sucre dans le sang, reste trop élevée en l'absence de traitement. Au fil du temps, cette élévation continue cause des dommages, en particulier sur les petits vaisseaux sanguins de la peau, des yeux, des reins, etc. Le plus souvent, le diabète de type 1 se déclenche pendant l'enfance ou au début de l'âge adulte. Il représente dix pour cent des cas de diabète (VIDAL, 2024).

#### 3.2. Le diabète de type 02(non insulinodépendant)

L'héritage génétique joue un rôle essentiel : des antécédents de diabète de type 2 sont fréquents dans la famille. Le surpoids et le manque d'activité physique vont contribuer à l'émergence de ce diabète. Il se manifeste principalement chez les individus âgés de plus de 40 ans (Tableau01) mais il peut également affecter les adolescents et les jeunes adultes en cas d'obésité sévère. La présence d'une hyperglycémie est due à une résistance des organes cibles à l'insuline (L'insuline est là mais son message est mal transmis). La résistance à l'insuline épuise progressivement le pancréas qui ne peut plus produire suffisamment d'insuline (AJD, 2023).

**Tableau 01:** Comparaison entre le diabète de type 1 et le diabète de type 2 (Grimaldi, 2000)

Diabète de type 1	Diabète de type 2
début brutal	découverte fortuite
syndrome cardinal	asymptomatique
sujet mince	sujet avec surpoids
avant 20 ans	après 40 ans
pas d'hérédité familiale	hérédité familiale
cétonurie	HTA, hypertriglycémie

#### 3.3. Le diabète gestationnel

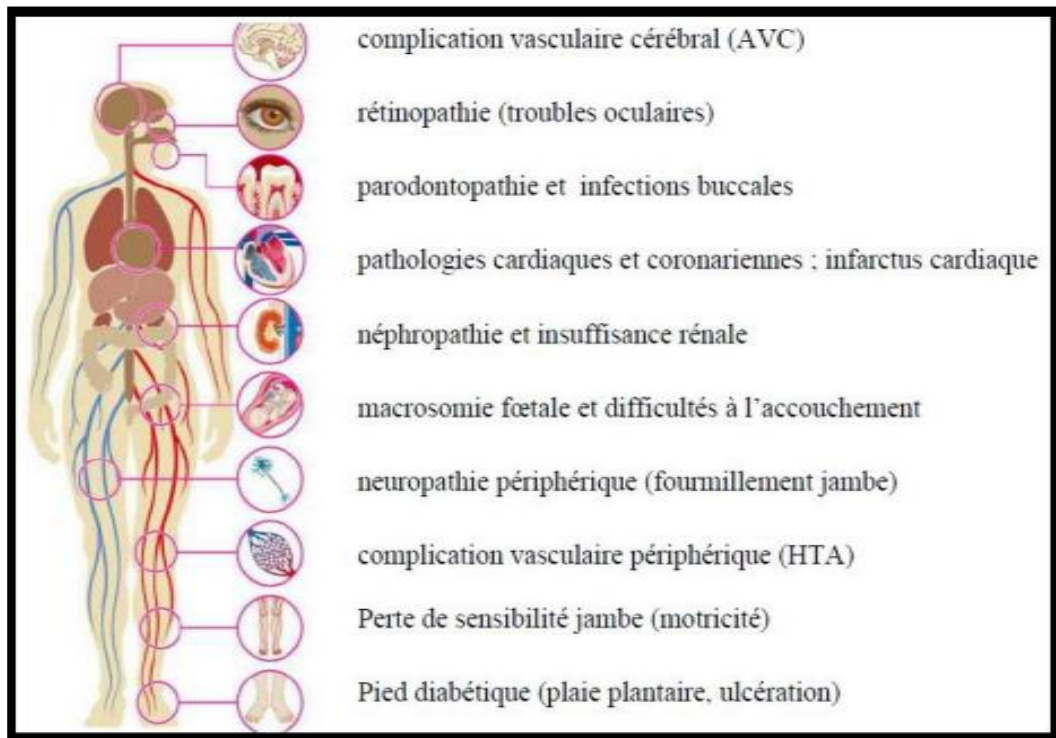
- On parle de diabète gestationnel lorsque l'on découvre une glycémie anormalement élevée (hyperglycémie) chez une femme enceinte, qui n'avait jamais présenté d'hyperglycémie avant sa grossesse. Cela fait référence à un trouble de la tolérance au

glucose provoqué par la grossesse. En effet, la grossesse augmente les besoins en insuline de la mère de 2 à 3. L'équilibre hormonal de la grossesse est responsable de cette augmentation.

- Chez certaines femmes prédisposées, le pancréas ne peut pas répondre à cette augmentation du besoin en insuline, ce qui entraîne un diabète gestationnel. La plupart du temps, le diabète gestationnel disparaît après la grossesse, mais certaines personnes ont un risque plus élevé de développer un diabète de type 2. Les femmes présentant certains facteurs de risque pour le diabète gestationnel sont systématiquement examinées : (Avoir du surpoids ou de l'obésité, l'hérédité, une grossesse précédente qui a donné naissance à un bébé de plus de 4 kg, un fœtus plus grand que son âge) (AJD, 2023).

#### 4. Complications dues au diabète

Les personnes atteintes de diabète sont plus susceptibles que les autres de souffrir de diverses complications. Ils sont 2 à 3 fois plus susceptibles de développer des maladies cardiovasculaires et jusqu'à 10 fois plus susceptibles de développer une insuffisance rénale terminale, les atteintes oculaires et les complications du pied. Les problèmes de pied sont courants, menacent la vie des patients et coûtent cher aux patients et à leurs familles, au secteur de la santé et plus largement à la société. Les patients diabétiques sont 25 fois plus susceptibles que les personnes non diabétiques de perdre une jambe. Les jeunes diabétiques risquent inévitablement de contracter des complications micro-et macro-vasculaires liées au diabète, en particulier des problèmes de pied, dès un âge relativement précoce (**Figure 02**). Ces problèmes ne causeront pas seulement des dommages personnels importants, mais ils causeront également des dommages économiques importants à la société et aux soins de santé (**Pranata et al. 2021**).



**Figure 02:** Localisation des différentes complications micro et macro angiopathiques associées au diabète de type 2 (Jolio, 2014).

## Chapitre II : Pied diabétique

### 1. Définition du pied diabétique

Le terme « pied diabétique » désigne l'ensemble des anomalies cliniques du pied chez une personne diabétique (Martini et Senneville, 2018). Il regroupe toute infection, ulcération ou destruction des tissus profonds du pied associé à une neuropathie et/ou une artériopathie périphérique des membres inférieurs chez le diabétique (Ha Van, 2014). Il s'infecte à l'occasion d'une invasion tissulaire avec multiplication de micro-organismes, qu'il y ait ou pas une réponse inflammatoire (Dalibon, 2018).

### 2. Epidémiologie du pied diabétique

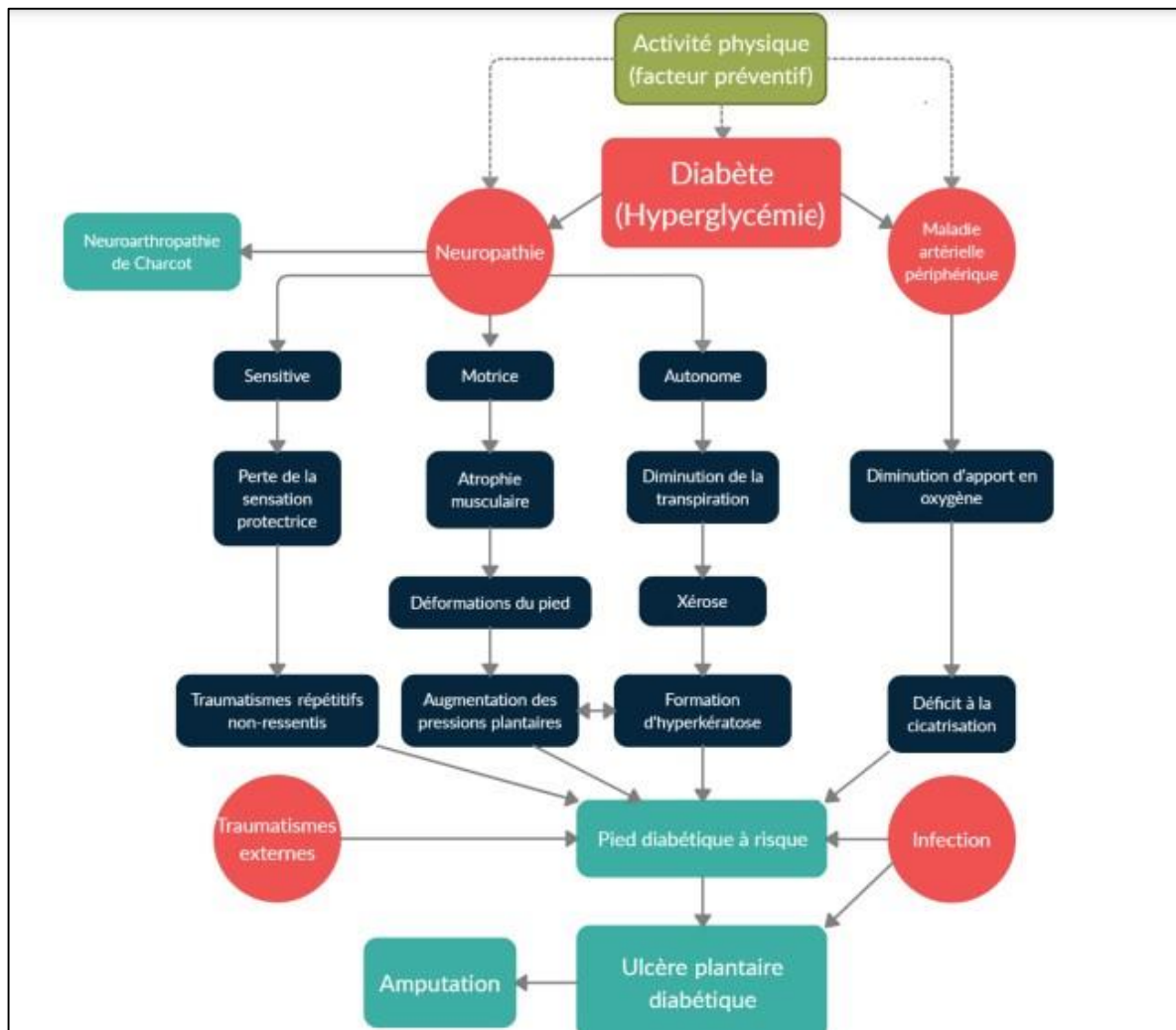
Toutes les 30 secondes, un membre inférieur ou une partie du membre inférieur est perdu quelque part dans le monde en raison du diabète.

Les principales conséquences néfastes des troubles du pied lié au diabète sont les ulcères et les amputations. Chaque année, environ 4 millions de personnes diabétiques supplémentaires sont touchées par un ulcère du pied, ce qui représente jusqu'à 85% de toutes les amputations. Ces ulcères se manifestent à la fois dans le diabète de type 1 et dans le diabète de type 2. Selon les populations, la fréquence des ulcères du pied varie de 1,5 à 10%, ce qui équivaut à une incidence de 2,2 à 5,9%. Étant donné que la majorité des informations de la littérature scientifique proviennent de populations choisies et que les définitions utilisées varient, il est difficile d'évaluer l'ampleur des problèmes de pied à l'échelle mondiale (Dumont et Richard, 2011).

### 3. Physiopathologie du pied diabétique

Bien que la prévalence de l'ulcère diabétique et l'éventail de ses manifestations varient dans les différentes régions du monde, les causes de l'apparition d'une ulcération sont les mêmes chez la majorité des patients. L'apparition de ces ulcères est souvent due à la combinaison de deux facteurs de risque ou plus chez une même personne, la neuropathie périphérique diabétique et l'artériopathie périphérique. L'infection peut être un élément supplémentaire. Ces mécanismes interviennent de manière différente, mais ils sont souvent complexes (Figure 03) (Schaper *et al.*, 2019).





**Figure 03:** Physiopathologie du pied diabétique à risque (Beauchesne, 2023).

■ Les facteurs de risque. ■ Les conséquences physiologiques. ■ Les conséquences cliniques.

### 3.1. La neuropathie diabétique périphérique

C'est une complication fréquente du diabète responsable de 60 à 80 % des ulcères. C'est le facteur de risque d'ulcération le plus important. Elle multiplie par 16 le risque d'hospitalisation des patients diabétiques (Maroselli, 2002).

C'est une conséquence de l'hyperglycémie chronique, à la suite de la destruction des vaisseaux qui irriguent les nerfs périphériques. Cela entraîne progressivement une réduction de la conduction nerveuse, notamment au niveau des pieds, car la conduction est longueur-dépendante. Elle parvient donc d'abord à la partie distale des nerfs les plus longs, de l'extrémité distale (orteils) au proximal (Beauchesne, 2023).

### **3.1.1. Mécanismes pathogéniques**

La neuropathie périphérique diabétique touche les systèmes nerveux : sensitif, autonome (végétatif), moteur (**Hartemann, 2019**).

#### **3.1.1.1. La neuropathie motrice**

Elle favorise les troubles statiques et les déformations caractéristiques du pied diabétique : pied creux, orteils en forme de griffe ou de marteau. Les points d'appui anormaux soumis à une pression inhabituelle sont causés par elle, ce qui entraîne des durillons, et des callosités. La majorité des ulcères neuropathiques se produisent dans des régions où l'hyperpression plantaire est présente (**Hartemann, 2019**).

#### **3.1.1.2. La neuropathie sensorielle**

Elle se manifeste par une incapacité à ressentir la douleur, la température ou la pression au niveau des pieds. Cette maladie affecte environ 66% des personnes atteintes de diabète. Cette perte de sensation protectrice accroît le risque de blessures provoquées, par exemple, par des chaussures mal ajustées. On sait maintenant que la neuropathie sensorielle joue un rôle essentiel dans le risque de développer une plaie de pression, et elle est implicitement associée à un risque accru d'amputation (**Lapointe, 2022**).

#### **3.1.1.3. La neuropathie autonome**

Se définit comme un mal fonctionnement des glandes sébacées au niveau des pieds rendant la peau sèche et plus vulnérable aux fissures (**Lapointe, 2022**).

### **3.1.2. Complications de la neuropathie**

Il s'agit du mal perforant plantaire et du pied de Charcot.

#### **➤ Mal perforant plantaire**

Le mal perforant plantaire est une ulcération cutanée indolore entourée d'une "couronne" d'hyperkératose (**Figure 04**). On le qualifie traditionnellement de « durillon qui a mal tourné ». Les microtraumatismes (frottements de la chaussure ou des chaussettes, corps étranger, choc, blessure) sont souvent responsables du mal perforant plantaire, qui pourrait être évité dans la majorité des cas. Il est possible que le patient ignore la présence de cette lésion ou sous-estime sa gravité en raison de l'indolence du mal perforant. Le mal perforant au pied est une lésion récidivante, fréquemment localisée au même endroit. Selon certains écrivains, il est toujours infecté (**Maroselli, 2002**).



**Figure 04:** Physiopathologie du MPP (El Ouarradi, 2019).

#### ➤ **Pied de Charcot**

C'est une complication qui se manifeste, au stade précoce, par une inflammation localisée du pied ou de la cheville secondaire à une ostéolyse d'origine inflammatoire et neuropathique. En l'absence de décharge, elle engendre des déformations et des destructions architecturales catastrophiques du pied et peut arriver jusqu'à un stade final du "pied cubique de Charcot", elle est responsables d'une forte morbi-mortalité (Borens, 2013).

### **3.2. L'artériopathie**

La présence de l'artériopathie périphérique (AP), généralement causée par une athérosclérose, est observée chez 50 % des patients atteints d'ulcère du pied diabétique. L'AP est un facteur de risque important pour une mauvaise cicatrisation de la plaie et l'amputation du membre inférieur. Lorsqu'il s'agit de patients souffrant d'artériopathie périphérique sévère, il existe un petit pourcentage d'ulcères du pied qui sont purement ischémiques. Ces ulcères sont souvent douloureux et peuvent être causés par un traumatisme banal (Schaper *et al.*, 2019).

Elle se définit par des lésions sténosantes ou occlusives dues à un athérome et affectant les artères des membres inférieurs, il existe deux type d'artériopathie :

- Macro-angiopathie.
- Micro-angiopathie (El Allali, 2015).

### 3.2.1. Complication de L'artériopathie

#### ➤ Les troubles trophiques

Elles représentent un problème de santé publique. Il s'agit d'une pathologie lourde par les risques d'amputation et d'handicap, Les patients diabétiques avec un trouble trophique ont une mortalité augmentée, une qualité de vie diminuée, et seuls 33% cicatrissent définitivement, malgré des soins adaptés (**Bissuel *et al.*, 2016**).

#### ➤ La gangrène

Elle est due à une diminution de l'apport sanguin dans les tissus corporels, entraînant une nécrose. Cette condition peut survenir en raison d'une infection ou d'autres problèmes de santé, principalement le diabète.

On distingue la gangrène sèche (pas d'urgence immédiate), sans infection, qui débute par l'apparition d'une zone blanche froide ou violacée au niveau (d'un orteil) ; et la gangrène humide où la zone de nécrose est entourée d'un halo inflammatoire et qui constitue une urgence thérapeutique [(**Al Wahbi, 2018 ; M'Bemba *et al.*, 2014**)].

### 3.3. Infection

Elle se caractérise par une invasion tissulaire provoquée par la multiplication de microorganismes, ce qui entraîne des dommages aux tissus, avec ou sans réponse inflammatoire de l'organisme. En ce qui concerne le pied diabétique, cette infection est généralement causée par une plaie cutanée à proximité. Il est important de différencier l'infection de la colonisation bactérienne. La colonisation est un processus naturel, qui implique des bactéries cutanées commensales, peu agressives. En ce qui concerne l'infection, il s'agit d'un phénomène pathologique qui implique des bactéries virulentes qui retardent la cicatrisation et entraînent une infection cutanée qui se propage vers les tissus avoisinants.

L'infection du pied chez un diabétique représente une grave menace pour le membre touché et nécessite une évaluation et un traitement rapides. La présence de signes ou de symptômes inflammatoires permet de diagnostiquer l'infection, mais ces signes peuvent être atténués par la neuropathie ou l'ischémie et les signes systémiques (fièvre, augmentation du nombre de globules blancs) sont souvent absents (**Labani, 2016**).

#### ❖ Classification de l'infection

Cliniquement, on peut différencier trois formes :

- **Cellulite superficielle** : dans 90-95% des cas, elle est causée par un seul germe pathogène gram positif, généralement le staphylocoque doré ou le streptocoque.
  - **Infection nécrosante** : elle atteint les tissus mous et est souvent poly microbienne.
  - **Ostéomyélite** : la localisation la plus courante se situe aux premiers, deuxièmes et cinquièmes orteils, avec une évolution souvent accompagnée de symptômes. Un contact osseux à l'exploration de l'ulcère, au moyen d'une aiguille boutonnée, a une valeur positive prédictive de 90% pour une ostéomyélite (**Pin et al., 2003**).
- ❖ **Causes de l'infection**

La diminution de l'activité bactéricide des leucocytes due à l'hyperglycémie entraîne la colonisation de la plaie par les bactéries qui monopolisent les nutriments et l'oxygène indispensables à la guérison. Il en résulte une altération de l'activité des cellules responsables du processus inflammatoire du système immunitaire indispensable à la guérison (**Bissonnette, 2011**).

#### 4. Etiologie bactérienne de l'infection du pied diabétique

La microbiologie des lésions du pied chez les diabétiques est caractérisée par la présence de plusieurs agents pathogènes (**Tableau 02**). Notamment les bactéries, les champignons, les levures (*Candida spp.*) qui participent à la création de plaies cutanées (**Martini et Senneville, 2018**).

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

Plusieurs études montrent que le profil bactériologique des patients est plus souvent polymicrobiens et que les cocci à Gram positif sont plus répandus que les bacilles à Gram négatif (**Akwah et al., 2015**). Les germes les plus fréquemment observés sont : *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* et les entérobactéries.

**Tableau 2:** Corrélation clinicobactériologique entre les types de plaies et les germes impliqués et identifiés (Stahl, 2007)

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.

#### 4.1. Les bactéries à Gram positif responsables d'infections sur pieds diabétiques

Notamment *Staphylococcus aureus*, sont principalement responsables des infections communautaires légères et, dans une moindre mesure, des streptocoques bêta-hémolytiques (souvent du groupe B) (Zanella *et al.*, 2016).

##### 4.1.1. *Staphylococcus aureus*

Comme toute bactérie pyogène, le staphylocoque doré est responsable d'infections suppuratives. Le plus souvent, il s'agit d'auto-infections provenant de la flore endogène, mais l'origine peut également être exogène (Verdier *et al.*, 2015).

Les infections suppuratives se caractérisent par la multiplication des bactéries, l'invasion puis la destruction des tissus de l'hôte et une inflammation localisée ou généralisée. Elles provoquent des infections cutanées, sous-cutanées et muqueuses, qu'elles soient superficielles ou profondes, ainsi que des septicémies (Verdier *et al.*, 2015).

#### 4.1.2. *Streptococcus*

Les streptocoques sont, les bactéries pyogènes n° 2. Après les staphylocoques, Le plus pathogène d'entre eux est le streptocoque bêta-hémolytique du groupe A de LANCEFIELD, appelé *Streptococcus pyogenes*, qui est responsable de la majorité des infections provoquées par les streptocoques (Bouvet, 2013).

#### 4.1.3. *Micrococcus spp.*

Différentes infections, telles que les bactériémies, les péritonites avec dialyse péritonéale ambulatoire continue. Elles ont aussi été isolées d'échantillons sanguins et chirurgicaux chez certains patients atteints de maladies coronariennes et infectieuses (Agence de la santé publique du Canada, 2010).

#### 4.2. Les bactéries à Gram négatif (BGN)

Principalement les entérobactéries qui sont une famille très hétérogène pour ce qui est de leur pathogénicité et de leur écologie. Les espèces qui composent cette famille sont en effet soit parasitaires (*Shigella*, *Yersinia pestis*), soit des espèces commensales rencontrées généralement en cas d'infection chronique ou déjà traitées (*E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella sp.*), soit encore saprophytes (*Serratia sp*, *Enterobacter sp.*). Ils sont responsables de nombreuses infections nosocomiales et infections communautaires (Fatnassi, 2020).

Et parfois *Pseudomonas aeruginosa* est souvent isolé après une longue hospitalisation, son rôle pathogène est toujours à discuter (Martini & Senneville, 2018).

##### 4.2.1. *Escherichia coli*

Est un hôte commensal du tube digestif de l'homme et des animaux.

La contamination par cette espèce peut se faire par la matière fécale et constitue une source de contamination indirecte (Pantel, 2015).

Les infections à *E.coli* peuvent être graves chez les sujets présentant des maladies chroniques comme le diabète et les personnes à immunité affaiblie. Les infections que cette bactérie peut engendrer sont :

- Les infections urinaires qui sont plus fréquentes et souvent plus compliquées chez le diabétique.
- Les infections intra-abdominales (appendicite)
- Les surinfections de plaies ou ulcérations chroniques du pied diabétique (SMIV, 2017).

#### 4.2.2. *Proteus mirabilis*

Elle est particulièrement apte à former des biofilms en raison de leur capsule, qui non seulement aide à l'adhérence des cellules, mais aussi dans la formation de structures en cristal. Ces cristaux ont un effet sur la virulence de *P. mirabilis* de multiples façons.

Les *Proteus spp.*, sont des pathogènes opportunistes, à l'origine de différents types d'infections, y compris : les infections des plaies, la méningite du nouveau-né ou des nourrissons (**Leulmi, 2015**).

#### 4.2.3. Le groupe KES (*Klebsiella - Enterobacter - Serratia*)

Il s'agit d'un groupe assez hétérogène, présent dans l'environnement et chez l'homme (peau, muqueuses, tube digestif...) et surtout à l'hôpital. Il est responsable de diverses affections chez des sujets diabétiques, des patients fragilisés ou traités par des antibiotiques (**Denis et al., 2011**)

- *Klebsiella pneumoniae*

Retrouvé sur les muqueuses en cas de lésions. C'est un germe qui occupe une place importante dans la pathologie infectieuse. Souvent, isolée en milieu hospitalier, mais, existe aussi en dehors des hôpitaux, surtout chez les patients diabétiques, fortement débilisés, ou souffrant de maladies respiratoires (**SMIV, 2017**).

- *Enterobacter*

Le genre *Enterobacter* comprend différentes bactéries, parmi lesquelles les plus courantes sont *Enterobacter cloacae* et *Enterobacter aerogenes* (**Mirabaud, 2003**).

Les patients hospitalisés, en particulier ceux traités par des antibiotiques, sont fréquemment colonisés par *Enterobacter cloacae*, qui peut causer des infections urinaires et des pneumonies, ainsi que des infections cutanées du pied chez les patients diabétiques (**Mirabaud, 2003**).

- *Serratia marcescens*

Est un pathogène, capable de synthétiser de la prodigiosine pigmentée en rouge et généralement résistant aux antibiotiques. Elle cause des infections opportunistes et nosocomiales, ainsi qu'une variété d'infections chez les adultes et les enfants. La résistance aux antibiotiques est également accrue grâce au biofilm qui empêche leur pénétration. Ils ont décrit plusieurs types d'infections causées par cette bactérie, comme la pneumonie, la septicémie, l'infection des plaies du pied diabétique, la méningite, l'endocardite, les infections oculaires, etc (**Zivkovic Zaric, 2023**).



#### 4.2.4. *Acinetobacter baumannii*

Est un agent pathogène de faible qualité qui peut être trouvé dans divers habitats, il provoque de graves infections chez les personnes immunodéprimées. Selon des données probantes, la méningite, les plaies des patients diabétiques, la pneumonie (acquise à l'hôpital et en communauté), la bactériémie, les brûlures, ainsi que les infections de la peau et des tissus mous (Tilahun *et al.*, 2021).

#### 4.2.5. *Pseudomonas aeruginosa*

Est un pathogène opportuniste. La virulence de la bactérie est influencée par de nombreux facteurs liés aux cellules et aux environnements externes. Le rôle pathologique des facteurs de virulence est crucial pour la colonisation, la survie des bactéries et l'invasion des tissus. Deux catégories de facteurs de virulence existent : les facteurs impliqués dans l'infection aiguë : ces facteurs peuvent être présents soit à la surface de *P. aeruginosa*, soit sécrétés. Les pili assurent la fixation à l'épithélium. L'adhésion aux cellules épithéliales est renforcée par l'exoenzyme S et d'autres adhésines. L'exotoxine A est responsable de la nécrose des tissus notamment chez les personnes atteint du pied diabétique (Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011).

### 5. Implication des biofilms dans les plaies chroniques sur le pied diabétique

Les bactéries qui colonisent les plaies chroniques agissent en synergie, créant un environnement symbiotique (Afonso *et al.*, 2021) notamment dans les ostéites du pied (une complication fréquente chez les patients diabétiques) (Dunyach-Remy *et al.*, 2015).

Les biofilms interagissent avec les tissus de l'hôte de diverses façons : ils mènent une existence parasitaire à la surface de la plaie, qui leur sert de source de nutriments durable et à laquelle ils adhèrent de façon stable. Au début, l'adhésion du biofilm à la surface de la plaie est réversible, mais elle devient permanente par suite de la différenciation des bactéries et de l'accumulation du glycocalyx (Leaper *et al.*, 2012).

La présence de biofilms est fortement associée à l'apparition d'une inflammation chronique de la plaie, une situation observable dans presque toutes les plaies chroniques, car les biofilms stimulent une réaction inflammatoire chronique qui favorise la survie des micro-organismes qui les composent. En outre, les biofilms matures libèrent des fragments, des bactéries planctoniques et des microcolonies bactériennes, ce qui entraîne la formation de nouveaux biofilms et augmente le risque d'infections invasives locales ou distantes (Leaper *et al.*, 2012).

À son tour, la formation de biofilms retarde considérablement le processus de guérison, ce qui augmente la morbidité et affecte la qualité de vie des personnes amputées (Serrudo *et al.*, 2024)

## Chapitre III : Généralité sur les biofilms

### 1. Historique

Au 17<sup>ème</sup> siècle, Anthony van Leeuwenhoek fut le pionnier de l'observation microscopique du biofilm. Grâce à un microscope qu'il avait conçu lui-même, il fut le premier à examiner les « animalcules » présents à la surface de ses dents. Il remarqua que même après le nettoyage, ces micro-organismes demeuraient « aussi denses que de la pâte », mettant ainsi en lumière la persistance du biofilm (Mirzaei *et al.*, 2024).

En 1933, Arthur Henrici avait déjà signalé que la boue présente au fond des navires était en grande partie causée par des bactéries et il a observé « qu'il est tout à fait évident que pour la plupart les bactéries de l'eau ne sont pas des organismes flottant librement, mais se développent attachées aux surfaces immergées » (Høiby, 2014).

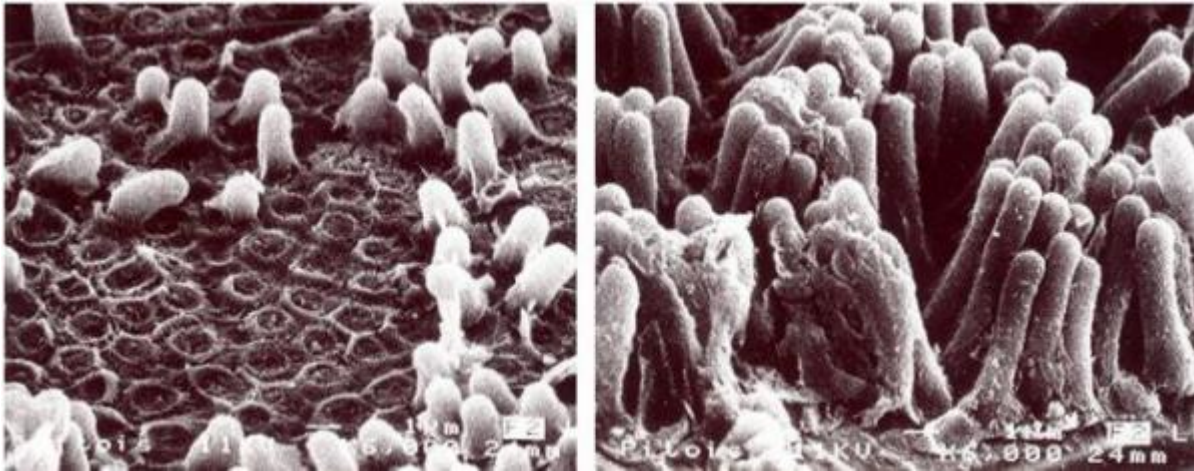
En 1943, Zobell a formulé l'idée que l'attachement des bactéries se produit en deux étapes d'adhérence réversible puis irréversible (Høiby, 2014).

Dans les années 1980, les recherches de William Costerton ont révélé que la majeure partie de la biomasse microbienne se trouve fixée sur des surfaces, formant des communautés diversifiées encapsulées dans une matrice extracellulaire contenant une abondance d'eau, de sucres et de protéines. Ces structures, présentes dans une variété d'environnements et associées à des surfaces minérales, végétales (comme la surface des feuilles) ou animales (telles que les muqueuses et les surfaces dentaires), sont communément appelées biofilms (Roux et Ghigo, 2006).

### 2. Définition du biofilm

Dans la nature, une part significative des micro-organismes évolue au sein d'écosystèmes structurés connus sous le nom de biofilms (Figure 05) (Camba *et al.*, 2024). Ces biofilms sont des communautés multicellulaires qui adhèrent les unes aux autres à une surface, qu'elle soit biotique (comme les cellules de la muqueuse et pied diabétique) ou abiotique (comme les dispositifs médicaux) (López *et al.*, 2010). Ils sont enveloppés dans une matrice extracellulaire complexe de polymères, communément appelée "substances polymériques extracellulaires" (EPS), qui joue un rôle crucial. En effet, l'EPS peut servir de source de nutriments, favoriser les échanges génétiques entre bactéries, maintenir l'hydratation, offrir une protection contre les agents antibactériens, et bien d'autres fonctions encore. La diversité architecturale des biofilms dépend fortement de l'organisation des EPS (Cloutier, 2017).

Une caractéristique majeure des biofilms, les distinguant de leurs homologues planctoniques, est leur capacité à survivre dans des environnements hostiles. Ils résistent, par exemple, aux rayonnements ultraviolets, aux métaux lourds, aux conditions acides, aux variations de salinité et d'hydratation, ainsi qu'à la phagocytose (**Lebeaux et al., 2014**). Leur résistance accrue aux antibiotiques aggrave les infections et représente une menace pour la santé humaine. En fait, on estime que 60 % de toutes les infections microbiennes et 80 % des infections chroniques sont associées à la formation de biofilms (**Flores et al., 2024**).



**Figure 05:** Observation du biofilm par microscope électronique (**Robert, 2012**)

### 3. Structure et composition du biofilm

De nombreuses structures de biofilms différentes ont été rapportées dans la littérature, En effet les biofilms sont des assemblages tridimensionnels composés de cultures mono ou mixtes (**Böhning et al., 2024**).

Mais la plupart des biofilms sont extrêmement hétérogènes, composés de micro colonies de cellules bactériennes enfermées dans une matrice EPS et séparées par des vides interstitiels, formant ainsi des canaux d'eau. Ces canaux permettent un flux de liquide qui favorise la diffusion des nutriments, de l'oxygène et même des agents antimicrobiens (**Lewandowski et Evans, 2000**).

L'EPS peut représenter 50 à 90 % du carbone organique total des biofilms et peut être considéré comme le matériau de matrice principal du biofilm varier en termes de propriétés chimiques et physiques, mais il est principalement composé de polysaccharides (**Donlan, 2002**).

**Stoodley et al., (1997)** ont identifié plusieurs critères ou caractéristiques qui pourraient servir à décrire les biofilms de manière générale. Cela inclut la présence d'un film de base mince, qui

peut varier d'une monocouche de cellules inégale à un film de plusieurs couches d'épaisseur contenant des canaux d'eau. De plus, les organismes qui composent le biofilm peuvent exercer une influence significative sur sa structure.

#### **4. Les étapes de la formation d'un biofilm**

La formation de biofilm est un cycle sans fin, une expérience *in vitro* ont montré que le développement du biofilm se produit en une série d'étapes séquentielles sur une période de 24h à 48h (Pereira *et al.*, 2020).

Les étapes impliquées dans la formation du biofilm sont (Figure 06) :

- L'attachement initial ou réversible
- L'attachement irréversible
- La formation de micro colonies,
- La maturation ou le développement
- La dissémination ou le détachement de la matrice (Mahamuni-Badiger *et al.*, 2020).

##### **a. L'attachement initial ou réversible**

La première étape de cette adhésion réversible se déroule rapidement, principalement grâce aux appendices générateurs qui permettent à la bactérie de se rapprocher de la surface à coloniser. Ce contact initial entraîne une liaison temporaire au cours de laquelle la bactérie évalue la nature de la surface sur laquelle elle se trouve (Guilhen, 2017).

##### **b. L'attachement irréversible**

En temps réel, un certain nombre de cellules adsorbées de manière réversible restent immobilisées et deviennent adsorbées de manière irréversible. Il a été avancé que les appendices physiques des bactéries (flagelles, fimbriae et pili) surmontent les forces physiques répulsives de la double couche électrique. Par la suite, les appendices entrent en contact avec le réseau global de la couche de conditionnement, stimulant des réactions chimiques telles que l'oxydation et l'hydratation et consolidant la liaison bactéries-surface (Garrett *et al.*, 2008).

##### **c. La formation de micro colonies**

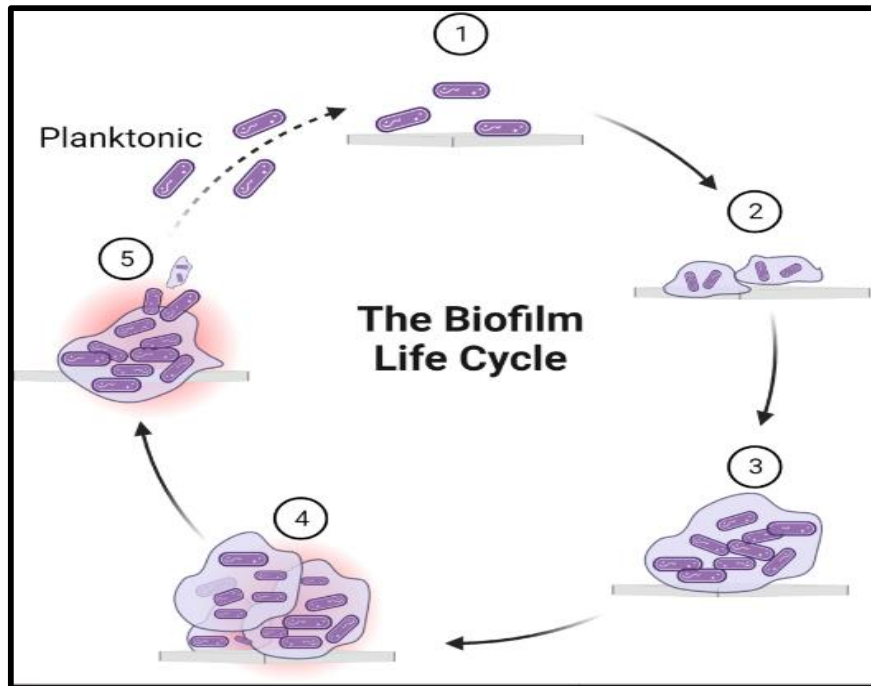
Les bactéries attachées commencent à se multiplier, donnant lieu à la formation de micro colonies. Ces micro colonies produisent une substance polymère extracellulaire grâce au quorum sensing, conduisant ainsi à la formation et à la maturation de la matrice EPS (Mahamuni-Badiger *et al.*, 2020).

#### d. La maturation ou le développement

Pendant ce temps, la croissance de communautés tridimensionnelles est observée.

#### e. La dissémination ou le détachement de la matrice

Enfin, les bactéries se détachent de la structure sessile et redeviennent planctoniques afin de se disperser et de coloniser d'autres surfaces (**Rasamiravaka et al., 2015**).



**Figure 06:** Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm (**Lazarus et al., 2024**)

### 5. Moyen de lutte contre la formation des biofilms

Dans le domaine médical, les biofilms sont responsables de nombreux dommages et il est donc essentiel de trouver des moyens efficaces et durables pour les combattre (**Dupin, 2017**).

#### a. L'antibiothérapie

La résistance des biofilms aux antibiotiques constitue un défi pour le traitement des infections associées à ces structures microbiennes. Une sélection adéquate de l'antibiotique et une thérapie continue sont nécessaires pour surmonter ces difficultés et prévenir la sélection de mutants résistants. De plus, de nouvelles approches thérapeutiques visant à cibler spécifiquement les bactéries au sein du biofilm et à améliorer la pénétration des antibiotiques sont en cours de développement (**Bellifa, 2014**).

### **b. Les huiles essentielles**

Elles contiennent une large série de métabolites secondaires qui peuvent inhiber ou ralentir la croissance des microorganismes. Les composants bioactifs des HE ont des actions antibactériennes spécifiques. Ils agissent en particulier au niveau de la membrane et du cytoplasme, et dans certains cas, modifient complètement la morphologie des cellules **(Bouyahya *et al.*, 2017)**.

Plusieurs études ont évalué la capacité d'extraits de plantes à empêcher la formation de biofilm par l'inhibition de la synthèse des différents appendices membranaires (fimbrae, pilis, curlis...) qui permettent la fixation des bactéries aux surfaces biotiques ou abiotique **(Ibukun *et al.*, 2019)**.

### **c. Les phages**

Cette technique utilise des virus de l'environnement infectant naturellement les bactéries les bactériophages, et représente une alternative prometteuse aux antibiotiques **(Lopes, 2019)**.

### **d. La nanotechnologie**

Les nanotechnologies ont observé des progrès énormes dans le domaine de synthèse et de préparation des nanoparticules (NPs) métalliques antimicrobiennes et le développement de diverses techniques de fabrication des nanomatériaux antibactériens. Actuellement les nanoparticules d'argent (Ag), de cuivre (Cu), d'or, de magnésium (Mg) et de zinc (Zn) sont utilisés pour éradiquer les biofilms des surfaces biotiques et abiotiques **(Hasan *et al.*, 2013)**.

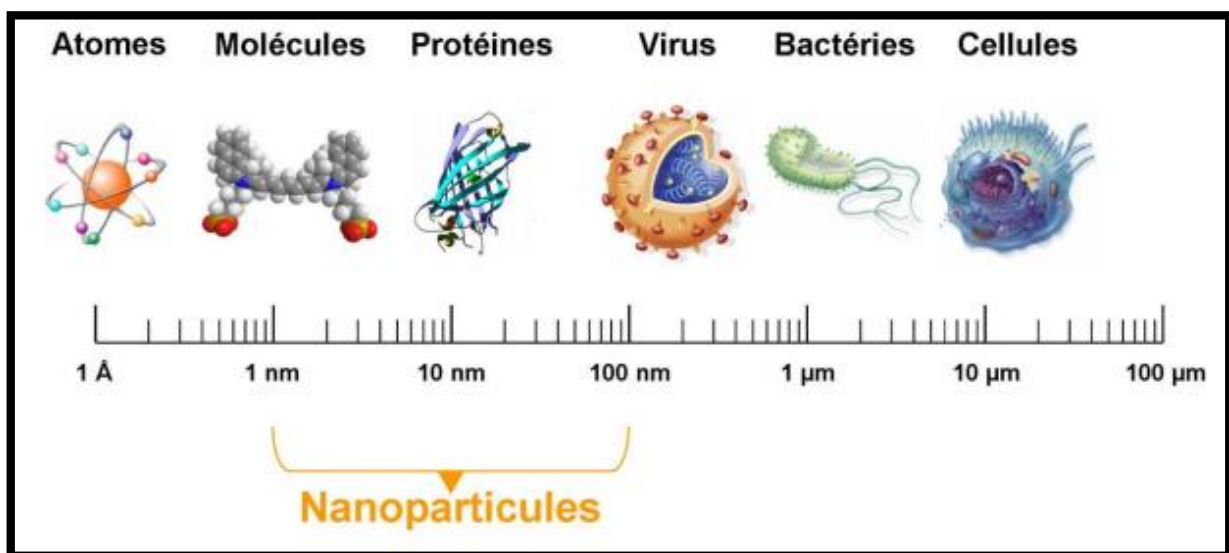
## Chapitre IV : Généralité sur les nanoparticules

### 1. La nanotechnologie

Ces derniers temps, la nanotechnologie est rapidement apparue comme un domaine d'intérêt considérable pour les chercheurs engagés dans de nombreux développements. Il existe un effort persistant pour fabriquer de nouvelles particules métalliques et d'oxydes métalliques à l'échelle nanométrique, jouant ainsi un rôle crucial dans divers domaines [(Khan *et al.*, 2017 ; Zubair *et al.*, 2024)].

#### 1.1. Définition des nanoparticules

Elles sont définies comme étant un nano-objet dont les trois dimensions sont à l'échelle nanométrique (McNamara et Tofail, 2017) et le diamètre nominal est inférieur à 100 nm environ (Figure 07). Une autre définition, plus large, considère les nanoparticules comme des assemblages d'atomes où au moins une dimension est à l'échelle nanométrique, située entre l'Angström (échelle atomique) et le micromètre (échelle des cellules eucaryotes). Une nanoparticule est ainsi environ 100 000 fois plus petite qu'une cellule humaine moyenne (Calugaru *et al.*, 2015). La plupart des matériaux nanométriques sont invisibles à l'œil nu et même aux microscopes de laboratoire conventionnels (Dadi, 2019).



**Figure 07:** Gamme de tailles des nanoparticules comparées à celle des principales structures (Goutayer, 2008)

## **1.2. Les sources de nanoparticules**

### **1.2.1. Les nanoparticules naturelles**

Elles sont produites par des processus naturels sans intervention humaine directe. Elles peuvent émerger de divers processus tels que l'activité volcanique, les réactions de photosynthèse et l'activité marine. Certaines bactéries et levures ont la capacité de réduire la toxicité d'un environnement pollué en agissant sur les ions métalliques et en formant des complexes insolubles sous forme de nanoparticules (**Chauvel, 2018**).

### **1.2.2. Les nanoparticules non manufacturées**

Elles sont produites par l'activité humaine de manière non intentionnelle. Elles peuvent être générées à partir de divers processus industriels, de l'usure de produits manufacturés ou même de phénomènes naturels perturbés par l'activité humaine. Par exemple, les émissions des véhicules automobiles, les rejets industriels (**Lanone et Boczkowski, 2010**).

### **1.2.3. Les nanoparticules manufacturées**

Ce sont des matériaux à l'échelle nanométrique produites de manière intentionnelle par l'homme, spécifiquement conçus et fabriqués pour diverses applications. Elles peuvent être utilisées dans une grande variété de domaines, tels que l'électronique, la médecine, les cosmétiques, les revêtements de surface, les produits pharmaceutiques, et bien d'autres (**Lanone et Boczkowski, 2010**).

## **2. Les nanoparticules d'argent**

L'argent est un métal mou et brillant utilisé depuis de nombreuses années dans des applications médicales en raison de ses bienfaits. Cependant, les avancées scientifiques et technologiques ont permis de découvrir des nanomatériaux d'argent, offrant des caractéristiques améliorées. Les nanoparticules d'argent, en particulier, se distinguent par leur volume de surface élevé, ce qui renforce leur efficacité lorsqu'elles interagissent dans le corps humain. Grâce à leurs petites tailles elles peuvent pénétrer au sein des biofilms mais aussi des bactéries et engendrer des dommages irréversibles conduisant à la mort cellulaire (**Nicolae-Maranciuc et al., 2022**).

### **2.1. La synthèse des nanoparticules d'argent**

En effet, la production et la stabilité des nanoparticules se font selon une stratégie « top-down » ou « bottom-up ». Dans la stratégie ascendante, les nanoparticules sont produites par des atomes auto-assemblés dans le noyau qui se transforment en nanoparticules. Cette approche inclut des méthodes chimiques et biologiques, tandis que dans la stratégie « descendante », les



gros matériaux sont décomposés en petites molécules en réduisant leur taille à l'aide de différentes techniques physiques et chimiques (**Alsamhary, 2020**)

### **2.1.1. Les méthodes physiques**

Ce sont des méthodes de production de nanoparticules, elles comprennent des techniques telles que le broyage et la fusion thermique. Cependant, ces méthodes sont souvent énergivores, nécessitant des quantités importantes d'énergie et entraînant des coûts élevés de production. De plus, elles peuvent présenter un rendement relativement faible en termes de production de nanomatériaux (**Dhand et al., 2015**).

### **2.1.2. Les méthodes chimiques**

Sont simple et économique car elles nécessitent peu de temps pour la synthèse. De plus, la synthèse par cette méthode donnerait la production d'une grande quantité de nanoparticules. Malheureusement, ces méthodes chimiques entraînent de graves dommages environnementaux en raison de l'utilisation de produits chimiques dangereux (**Deljou et Goudarzi, 2016**).

### **2.1.3. La synthèse biologique (synthèse-verte)**

De nos jours, la production de nanomatériaux doit être réalisée selon des procédés rentables et respectueux de l'environnement, sans produits chimiques toxiques dans les protocoles de synthèse et de purification.

La synthèse verte des NP représente une méthode peu coûteuse et respectueuse de l'environnement, présentant des avantages par rapport aux méthodes conventionnelles. Elles seraient également non toxiques pour l'homme. De plus, elles ont démontré une efficacité notable contre une variété d'agents pathogènes, y compris les bactéries, les virus et d'autres micro-organismes eucaryotes (**Parida et al., 2011**).

Le plus important cette synthèse verte est la sélection de milieux contenant des agents réducteurs non toxiques. Il existe différentes méthodes pour la synthèse des nanoparticules (les bactéries, les champignons et les plantes) mais la plus couramment utilisée utilise des bactéries car les bactéries sont généralement faciles à cultiver et peuvent être manipulées génétiquement sans trop de difficultés. La production de particules d'argent cristallines par le biais de micro-organismes à l'échelle nanométrique, tout en contrôlant leur morphologie, est à la base de l'utilisation de cette méthode biologique dans le domaine de la science des matériaux (**John et al., 2022**).

## 2.2. Applications des nanoparticules d'argent

Ces dernières années, les nanoparticules d'argent (AgNPs) ont considérablement influencé divers secteurs industriels tels que l'agroalimentaire et les cosmétiques. Leur valeur est également reconnue dans des domaines optiques, chimiques, photo électrochimiques et électroniques. Les propriétés exceptionnelles des AgNPs ont été démontrées à travers de nombreuses études, mettant en évidence leurs capacités antimicrobiennes, antiplaquettaires, anti-inflammatoires, anti-angiogéniques, anticancéreuses et antivirales. De plus, ces nanoparticules présentent un niveau de toxicité réduit et une biodisponibilité améliorée, ce qui en fait des candidats prometteurs pour une gamme étendue d'applications biomédicales et industrielles (Saravanan *et al.*, 2018).

Mais le plus souvent les AgNPs ont été utilisées comme couche antibactérienne dans des applications thérapeutiques, ces applications comprennent notamment :

- **Des dispositifs médicaux**

Cette utilisation de l'Ag a été proposée pour éviter la contamination bactérienne et aussi pour diminuer le développement de biofilms (Tran et Le, 2013).

- **Les pansements**

Les pansements à base d'argent ont été employés dans le traitement de divers types de blessures en milieu clinique, notamment les brûlures, les ulcères chroniques et les plaies diabétiques (Rafique *et al.*, 2017).

## 2.3. Activité antibactérienne des nanoparticules d'argent

La forte activité antibactérienne est l'une des principales raisons du développement croissant de produits contenant des AgNPs, car elles inhibent la croissance des micro-organismes plus efficacement que les autres NP (Hieu *et al.*, 2022).

Les AgNPs présentent des propriétés hautement antibactériennes contre les bactéries pathogènes à Gram négatif telles que (*E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Shigella* et *Enterobacter aerogenes*). Aussi, les AgNP bio synthétisées ont des activités contre les bactéries pathogènes à Gram positif telles que (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*) (Salem et Fouda, 2020).

Les nanoparticules d'argent ont une activité antimicrobienne qui peut également influencer diverses espèces fongiques telles que *Aspergillus sp.*, *Candida sp.*, *Saccharomyces sp.*, ou *Penicillium sp.*. De plus, des recherches récentes ont suggéré que les nanoparticules d'argent se lient à la membrane externe des virus à enveloppe lipidique, ce qui pourrait prévenir les infections virales (Hieu *et al.*, 2022).

### **2.4. Les mécanismes d'actions des nanoparticules**

#### **2.4.1. Contact avec la paroi**

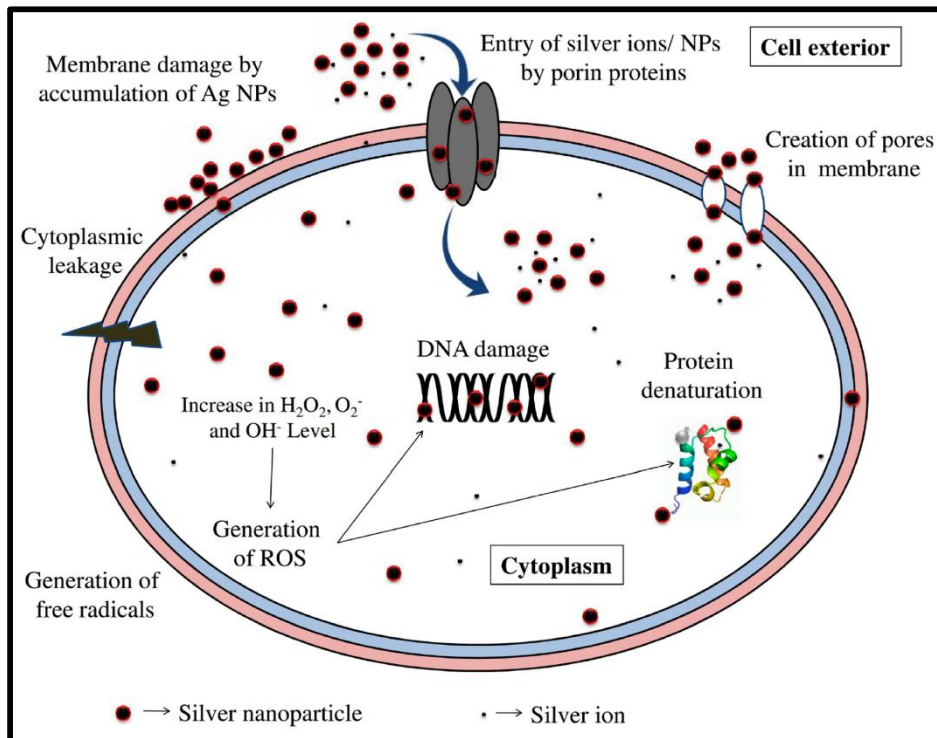
Sur les mécanismes d'action, il a été postulé que les nanoparticules possèdent la capacité de s'attacher à la paroi cellulaire bactérienne et de la pénétrer ensuite, provoquant ainsi des changements structurels dans la membrane cellulaire, comme la perméabilité de la membrane cellulaire et la mort de la cellule (Mwangi *et al.*, 2024).

#### **2.4.2. Génération des espèces oxydantes réactives (ROS)**

Dans certaines situations, les nanoparticules d'argent peuvent perturber le système enzymatique respiratoire, déclenchant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^-$ ), peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), et superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ). Cette augmentation des ROS peut conduire à un stress oxydatif, causant des dommages aux protéines et aux acides nucléiques (Liao *et al.*, 2019).

#### **2.4.3. L'inactivation des protéines et destruction de l'ADN**

Un aspect supplémentaire est que l'ADN, contenant principalement du soufre et du phosphore, peut être ciblé par les nanoparticules, provoquant ainsi sa destruction et conduisant inévitablement à la mort cellulaire. L'interaction entre les nanoparticules et le soufre, ainsi que le phosphore présent dans l'ADN, peut perturber la réplication de l'ADN bactérien, ce qui permet d'éliminer les microbes (Figure 08) (Prabhu et Poulouse, 2012)



**Figure 08:**Mécanismes d'action des nanoparticules (NP) contre les bactéries (**Liao et al., 2019**)

# **Matériel et Méthodes**

### 1. Lieu d'étude

Cette étude a été réalisée au laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) de l'Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, pendant la période du mois de février jusqu' au mois de mai 2024.

### 2. Prélèvements

Les prélèvements ont été effectués sur des patients diabétiques présentant une infection dans le pied, ces derniers ont été admis dans différents services du Centre Hospitalier Universitaire Tidjani Damerdji de Tlemcen (CHU Tlemcen) : à savoir le service d'hospitalisation à domicile et les urgences.

Avant chaque prélèvement, une procédure de nettoyage a été effectuée à l'aide d'une compresse imbibée de sérum physiologique stérile.

Une fois nettoyée, la méthode d'écouvillonnage a été utilisée (**Lavigne et Sotto, 2007**), elle consiste à faire passer un écouvillon stérile au sein de la plaie, en effectuant des mouvements en zigzag combinés à des rotations sur une surface d'un cm<sup>2</sup> de la lésion infectée (**Figure 09**). Les écouvillons contenant les échantillons à analyser, ont ensuite été délicatement replacés dans leurs tubes respectifs. Ils ont été immédiatement acheminés au laboratoire, avec pour impératif que le transport des prélèvements ne dépasse pas 2 heures à température ambiante.



**Figure 09:**Prélèvements à partir des plaies du pied diabétique

### 3. Ensemencement et isolement

Chaque écouvillon a été inoculé dans 5 mL de bouillon BHIB (bouillon cœur-cervelle) afin d'enrichir les échantillons (**Figure10**), puis incubé à une température de 37°C pendant 24 heures pour permettre la croissance bactérienne.



**Figure 10:**Prélèvements des plaies infectées dans un bouillon d'enrichissement BHIB

Sur trois milieux gélosés préparés préalablement à savoir le milieu Chapman, MacConkey et le milieu Cétrimide, diverses espèces bactériennes ont été isolées (**Annexe 02**).

- Milieux Chapman : C'est un milieu d'isolement sélectif, différentiel et semi-synthétique des bactéries du genre *Staphylococcus* (bactéries halophiles) cultivant en milieu hypersalé avec la présence de chlorure de sodium et le rouge de phénol.
- Milieu MacConkey : est un milieu de culture standard utilisé pour l'isolement et la différenciation des bacilles à Gram négatif qui fermentent le lactose.

Il est également sélectif, car le désoxycholate de sodium inhibe la croissance des bactéries à Gram positif.

- Cétrimide : est utilisé pour l'isolement et l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*.

Le Cétrimide est un ammonium quaternaire qui inhibe la croissance de la plupart des autres espèces bactériennes. *Pseudomonas aeruginosa* colore ce milieu en bleu-vert par production de pyocyanine.

Après l'étape d'enrichissement, les tubes récupérés sont soumis à un vortexage pour assurer une homogénéisation. Ensuite, une goutte de la suspension obtenue est ensemencée en stries serrées

à la surface des milieux mentionnés. Les boîtes ainsi préparées sont incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

### 4. Purification

Après incubation les colonies bactériennes sont purifiées par ré-isolément successif. Cette démarche vise à obtenir des cultures bactériennes parfaitement pures.

### 5. Identification des bactéries

Après avoir confirmé la pureté des cultures, l'identification des souches est ensuite effectuée.

- **L'étude des caractères macroscopiques** : C'est une méthode d'étude qui consiste à observer visuellement les colonies à l'œil nu, ce qui permet de décrire leur taille, leur aspect, leur forme et leur couleur.
- **Test de la coagulase** : il permet de mettre en évidence l'aptitude des Staphylocoques à coaguler le plasma ; c'est le principal test caractérisant *Staphylococcus aureus*. Ce test a consisté à introduire 500 µL de plasma dans les tubes à hémolyses puis 500 µL d'une solution (BHIB+ *Staphylococcus aureus*) ont été ajoutés. L'ensemble est homogénéisé. La lecture a été faite après 1 à 2 heures, voir 24 heures. Lorsque le plasma est coagulé et que le tube peut être retourné, la réaction est positive.
- **L'étude des caractères biochimiques (API 20<sup>E</sup> et API Staph)** : L'identification des espèces d'entérobactéries et d'autres bacilles à Gram négatif a été réalisée à l'aide de la galerie miniaturisée API 20E (Richard, 1979) un système standardisé composé de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. La suspension bactérienne est inoculée dans ces microtubes, et les réactions se traduisent par des changements de couleur après une période d'incubation, ainsi qu'après l'ajout de certains réactifs. Les résultats sont interprétés en consultant le catalogue analytique (Annexe 04).
- Pour *Staphylococcus aureus*, un processus similaire est utilisé, mais avec une galerie spécialisée appelée galerie Staph.

### 6. Conservation des souches

- **Gélose nutritive inclinée** : C'est une méthode de conservation à court terme, où les bactéries sont cultivées dans deux milieux de culture présentant des conditions aérobies différentes : en surface et dans la gélose. Les tubesensemencés sont incubés pendant 24 heures à 37°C, puis directement conservés au réfrigérateur à 4°C (Annexe 05).
- **Le glycérol** : afin de conserver les bactéries, 500 µL de la suspension bactérienne ont été mélangés avec 500 µL de glycérol stérile, puis le mélange a été vortexé pour garantir



une répartition homogène des bactéries et du glycérol. Ensuite, cette solution a été congelée à une température adaptée, habituellement  $-13^{\circ}\text{C}$ , pour assurer une conservation à long terme (**Annexe05**).

### 7. Evaluation de la formation de biofilm *in vitro*

#### 7.1. Préparation de l'inoculum

Pour préparer l'inoculum, des colonies de chaque souche ont été récoltées à partir de la gélose inclinée à l'aide d'une anse de platine. Ensuite, chaque colonie a été ajoutée dans un tube contenant 5 mL BHIB stérile.

#### 7.2. Standardisation des souches

Afin de rendre l'inoculum standard avec une charge bactérienne de  $10^8$  UFC/mL, une petite quantité de chaque suspension bactérienne préparée est placée dans une cuve afin de mesurer sa densité optique (DO), qui doit être comprise entre 0,08 et 0,1 à une longueur d'onde de 580 nm.

#### 7.3. Méthode sur plaque de culture tissulaire « Tissue Culture Plate » (TCP)

- **Principe**

La TCP est une méthode idéale pour la détection du biofilm, permettant une évaluation quantitative de la formation du biofilm en mesurant la densité optique (**Hassan *et al.*, 2011**).

- **Mode opératoire**

A partir d'une culture de 24 heures dans le milieu BHIB, les puits de la microplaque ont été remplis aseptiquement par la suspension bactérienne ajustée à une DO entre 0.08 et 0.1. La 1<sup>ère</sup> ligne a été remplie par le témoin BHIB. Les microplaques sont incubées pendant 24 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ , la quantification du biofilm a été réalisée en utilisant la méthode du cristal violet, décrite comme suit :

Le contenu de la microplaque est vidé et celle-ci est soumise à un premier lavage avec l'eau distillée pour éliminer les cellules non adhérentes (Planctoniques).

Les biofilms résultant de l'adhérence des organismes sessiles sont colorés avec 150  $\mu\text{L}$  du cristal violet à 0,5 % pendant 15 à 20 minutes. L'excès du colorant est ensuite éliminé par un rinçage avec de l'eau distillée, et nous avons laissé les plaques séchées. Ensuite, tous les puits sont remplis avec 150 $\mu\text{L}$  d'éthanol, et la lecture a été effectuée après 15 minutes en mesurant la densité optique (DO) à l'aide d'un lecteur ELISA à une longueur d'onde de 490 nm.

- **Lecture**

Les résultats sont ensuite interprétés comme suit :

- $DO \leq DOt$  (Témoin) : non formatrice de biofilm
- $DOt \times 2 \leq DO \leq DOt \times 4$  : Modérée
- $DOt \times 4 \leq DO$  : Fortement formatrice de biofilm (**Christensen *et al.*, 1985**)

## 8. La biosynthèse des nanoparticules d'argent

### 8.1. Ensemencement des souches conservées

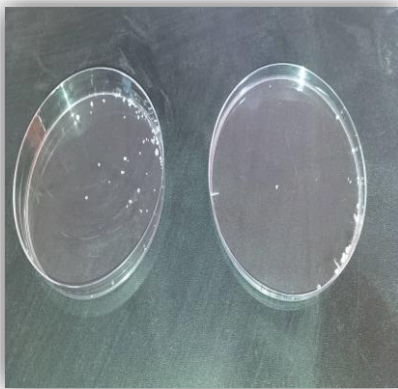
Dans un endroit stérile et à partir des souches bactériennes conservées E2 et E4 de (*Bacillus spp*), les souches sont revivifiées dans un bouillon (BHIB) à 30°C pendant 24 h. Après un ensemencement sur une gélose nutritive a été effectué, une incubation à 30 °C pendant 24 h a été réalisée pour vérifier les souches.

Les souches (*Bacillus spp*) ont été inoculées dans des flacons contenant 100 mL de bouillon (BHIB) stérile. Les milieux inoculés ont été incubés à 30°C dans un incubateur par agitation pendant 24 heures.

Après 24 heures, les cultures ont été centrifugées à 6000 tr/min pendant 15 minutes pour séparer le surnageant (couche supérieure) et le culot (couche inférieure). Les deux couches ont ensuite été utilisées pour la biosynthèse des AgNPs (**Peiris *et al.*, 2017**).

### 8.2. Préparation de la solution de nitrate d'Argent

- **La solution de 2 mmolaire** : Mettre 0.034g d'AgNO<sub>3</sub> dans 100mL d'eau distillée.
- **La solution de 4 mmolaire** : Mettre 0.068g d'AgNO<sub>3</sub> dans 100mL d'eau distillée (**Figure 11 et 12**)



**Figure 11:** Nitrate d'argent (AgNO<sub>3</sub>)



**Figure 12:** Solution de nitrate d'argent

### 8.3. Préparation des nanoparticules d'Argent

Pour la préparation des AgNPs, huit solutions ont été préparées pour tester leur mode de biosynthèse soit intracellulaire, ou bien extracellulaire :

- **A partir du surnageant**

100 mL du surnageant ont été mélangés avec 100 mL de la solution de nitrate d'argent 2 mM dans deux flacons et 4 mM dans deux autres flacons (pour les 2 souches E2 et E4).

- **A partir du culot**

100 mL du culot ont été mélangés avec 100 mL de la solution de nitrate d'argent 2 mM dans deux flacons et 4 mM dans deux autres flacons (pour les 2 souches E2 et E4).

Le 9ème flacon a été conservé comme témoin négatif contenant seulement la solution d'AgNO<sub>3</sub> utilisé comme contrôle.

Les solutions conçues ont été incubées à 30 °C dans un incubateur agitateur pendant 5 jours. Toutes les solutions ont été incubées en obscurité, pour éviter les réactions catalysées par la lumière.

Les solutions d'AgNps obtenues après 5 jours incubation, ont été placées dans une centrifugeuse 10 000 tr/min pendant 10 minutes (**Figure13**). Le culot obtenu a été soigneusement nettoyé avec de l'eau distillée pour éviter toute interférence du milieu des nanoparticules, et ce mélange a été mis dans un bain marie pendant 20 min à 100°C puis a été placé dans le congélateur à une température de -12°C pendant 7 min afin de provoquer un choc thermique (pour éclater la cellule).

## 9. Séchage

Les nanoparticules ont été placées dans une étuve à 100°C afin de les transformer en poudre fine et enfin les NPs d'argent ont été obtenues.



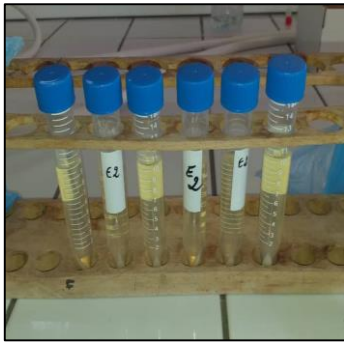
Purification de la souche  
*Bacillus spp*



Des flacons de BHIB  
Contenant *Bacillus spp*



Centrifugation à 6000 tr/min  
pendant 15 minutes



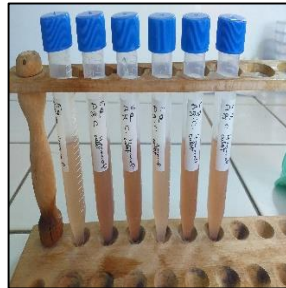
Obtention du surnageant et du culot après centrifugation



Le surnageant et le culot qui contiennent la solution d'AgNO<sub>3</sub> avant incubation



Virage de couleur de la solution d'AgNPs



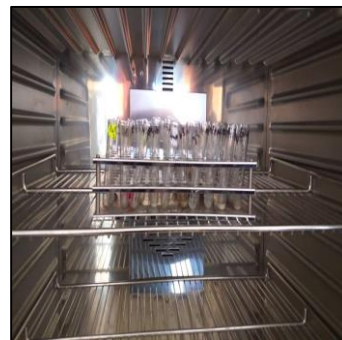
Centrifugation à 10 000 tr/min pendant 10 min



Rinçage



Les nanoparticules d'argent



Séchage dans l'étuve à 100°C

**Figure 13:** La biosynthèse des nanoparticules d'argent

## 10. Préparation de la suspension de la bactérie testée

À cette étape, nous avons opté pour la souche la plus formatrice de biofilm, *Serratia marcescens*, qui a été conservée. Un inoculum a été préparé (BHIB + suspension de *Serratia marcescens*), puis il a été incubé à une température de 37°C pendant 24 heures. La culture bactérienne cultivée pendant 24 heures dans le milieu (BHIB) a été ajusté à une DO de 0,08-0,1, à une longueur d'onde de 580 nm.

### 10.1. Evaluation de l'activité antibactérienne des AgNPs

Elle a été déterminée vis à-vis *Serratia marcescens*, en utilisant la méthode de plaque de microtitration à 96 puits telle que décrite par (Hassan *et al.*, 2011).

Dans les puits de la microplaque, déposer 100 µL de BHIB suivis de l'ajout de 50 µL de la solution des nanoparticules d'argent obtenue de la souche E4 4mM, à une concentration de 0.03g /mL, puis 100 µL de la suspension bactérienne a été inoculé dans le même puits. À l'aide d'une micropipette, le contenu du premier puits a été mélangé, puis 50 µL de ce mélange ont été transférés dans le deuxième puits. Ce processus de mélange et de transfert a été répété de manière séquentielle jusqu'au dernier puits. L'inoculum contenant uniquement la souche bactérienne a servi de contrôle positif, tandis que le BHIB seul a servi de contrôle négatif. L'incubation a été réalisée à 37 °C pendant 24 heures (Figure14).

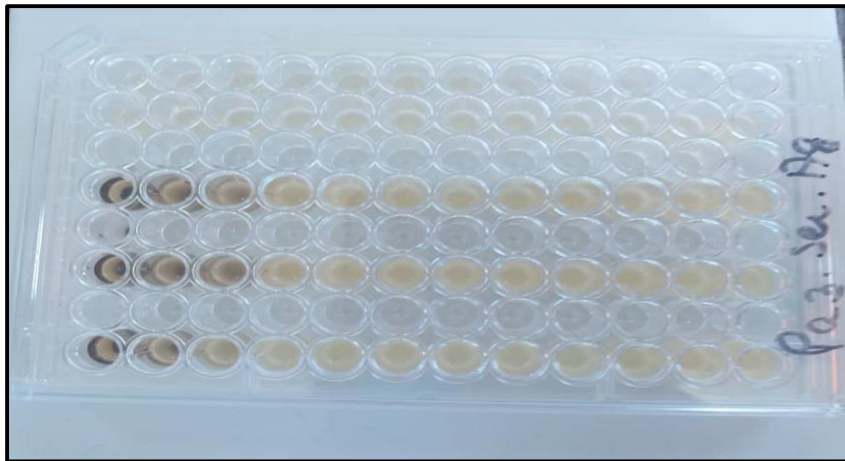


Figure 14: L'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent

### 10.2. Evaluation de l'activité anti-biofilm

Tout d'abord un biofilm a été formé par *Serratia marcescens* dans 2 microplaques dans le but de tester l'activité anti biofilm des nanoparticules d'argent.

Les puits de deux microplaques ont été remplis avec un volum de 200 µL de la suspension bactérienne, ces microplaques ont été incubées à 37°C pendant 38h.

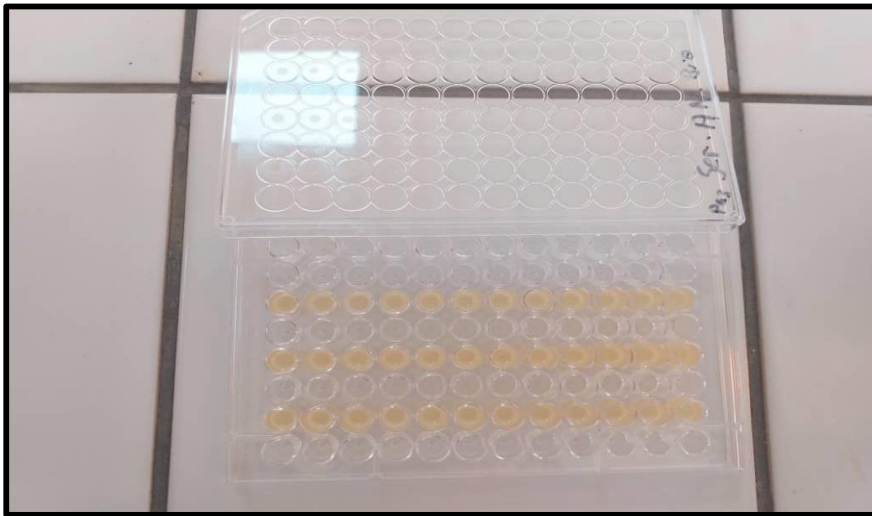
Après 24 h d'incubation (**Figure15**) : la culture bactérienne a été retirée par pipetage, ensuite tous les puits de la microplaque ont été remplis par 100  $\mu\text{L}$  d'eau distillée sauf le premier.

100  $\mu\text{L}$  de la solution de nanoparticules d'argent obtenue de la souche E4 4mM a une concentration de 0.5g/mL ont été ajoutés dans les premiers puits des 3 lignes, le contenu du premier puits a été mélangé, puis 50  $\mu\text{L}$  de ce mélange ont été transférés dans le deuxième puits. Ce processus de mélange et de transfert a été répété de manière séquentielle jusqu'au dernier puits.

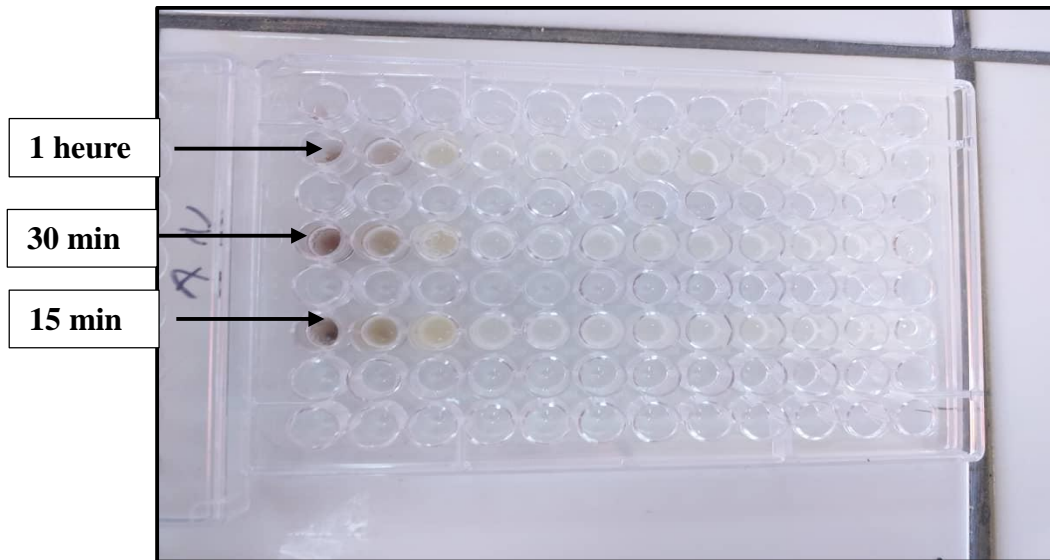
Le temps de contact a été différent (première ligne : 1h, deuxième ligne : 30min et la troisième : 15 min) (**Figure16**).

Après ce temps de contact les puits de la microplaque ont été rincés avec l'eau distillée, 100  $\mu\text{L}$  de cristal violet à 0,5% ont été ajoutés pendant 20 minutes.

Ensuite, la microplaque a été encore une fois rincée avec l'eau distillée pour éliminer l'excès de cristal violet et séchée à température ambiante. 100  $\mu\text{L}$  d'éthanol ont été ajoutés à chaque puits pendant 10 minutes. L'inhibition du biofilm a été déterminée en enregistrant la densité optique (DO) à l'aide d'un lecteur de microplaques (ELISA) (**Obeizi et al., 2021**).



**Figure 15:** La plaque témoin



**Figure 16:** La plaque contenant AgNPs

# **Résultats et Discussion**



## 1. Répartition des Prélèvements

Durant une période d'étude de trois mois, des prélèvements de 10 patients diabétiques ont été analysés. Le prélèvement a été effectué par un écouvillon stérile au niveau de la plaie infectée du pied diabétique dans des conditions d'asepsie appropriées.

Les résultats des 10 prélèvements ont été classés en fonction des critères suivants : l'âge, le sexe et le type de diabète.

### 1.1. Selon la tranche d'âge

Le diabète est une maladie complexe qui affecte des individus de tout âge. Dans notre étude, l'âge moyen des patients était de 55 ans, il variait entre 50 et 73ans. La répartition des patients selon l'âge est représentée dans la (**Figure17**).

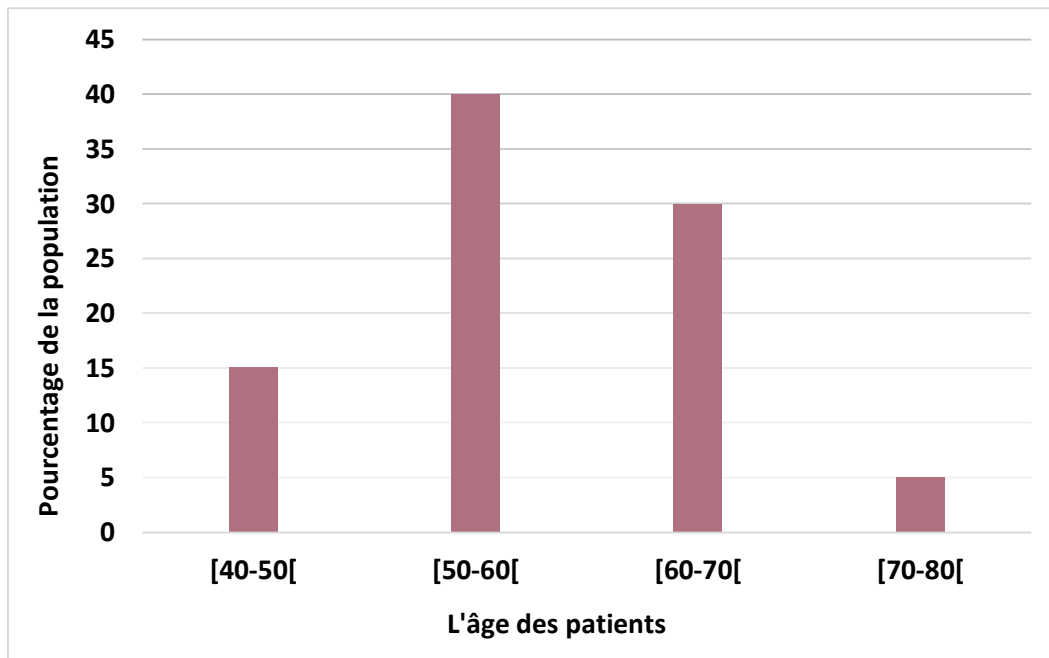


Figure 17: Répartition des prélèvements selon l'âge n=10

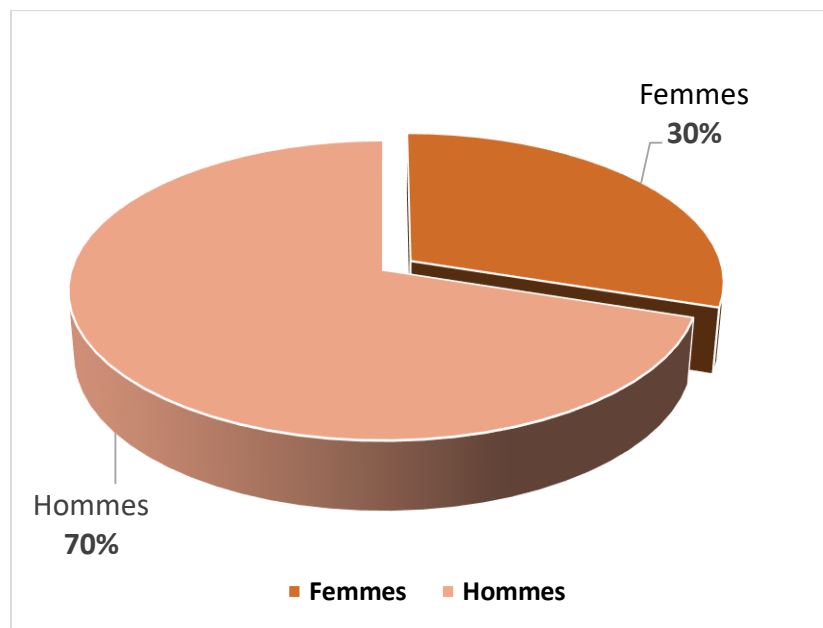
Une autre étude faite par Yahia-Berrouiguet en 2008 sur les plaies du pied diabétique au niveau du CHU Tlemcen révélant une prédominance des patients âgés de plus de 60 ans avec un pourcentage de 57.54% des cas (**Yahia-Berrouiguet, 2008**).

De même dans l'étude réalisée en Tunisie en 2024, les résultats obtenus de l'âge moyen étaient de 57 ans (**Hachicha et al., 2024**). Cette valeur est proche de celle obtenue dans notre étude.

Cela peut s'expliquer par le fait que l'âge avancé est un facteur de risque classique. Ainsi, les personnes âgées vivant avec le diabète depuis longtemps sont plus susceptibles de développer des ulcères du pied.

### 1.2. Selon le sexe

La répartition de la population (Homme/Femme) est hétérogène. D'après les résultats obtenus : on observe une prédominance masculine, soit : 7 Hommes (70 %) et de 3 Femmes (30%) (Figure18).



**Figure 18:** Répartition des patients selon le sexe.

Nos résultats sont en accord avec celle de **Turhan et al., (2013)** menée en Turquie où les hommes prennent la prédominance avec 69 %, alors que les femmes ne représentent que 31 %. Une autre étude menée au service d'Endocrinologie du CHU d'Oran a révélé que les hommes représentaient 57,60 % des cas, tandis que les femmes représentaient 42,39 % (**Faraoun et al., 2013**). La prépondérance du sexe masculin peut s'expliquer par :

- Le moindre respect du régime alimentaire chez les hommes par rapport aux femmes (**Grimaldi, 2000**)
- Le tabagisme masculin est depuis longtemps identifié comme un facteur de risque délétère, surtout en contexte de diabète, ce qui contribue à des complications chez les personnes diabétiques, telles que le pied diabétique (**Tramunt et Durlach, 2023**).

Nos résultats concordent avec ceux de la littérature. Cependant, une étude réalisée à Bamako a observé une prédominance de l'atteinte chez les femmes par rapport aux hommes (**Doumbia et al., 2021**).

### 1.3. Selon le type de diabète

Dans cette étude tous les patients inclus présentent un diabète de type 2 (**Tableau 03**)

**Tableau 03:** Répartition des patients selon le type de diabète.

Type de diabète	Type 1	Type 2
Les patients	Aucun cas	10
Pourcentage	0%	100%

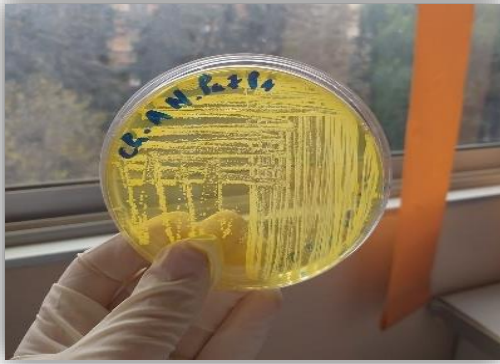
Concernant la classification du diabète, une étude réalisée au Congo a montré que le diabète de type 1 chez 34 patients, soit 13,8 % des cas, et le diabète de type 2 chez 213 patients, soit 86,2 % des cas. D'après cette étude, on constate que le pied diabétique est fréquent chez les patients diabétiques de type 2 (**Monabeka et Nsakala-Kibangou, 2001**). Et ceci concorde avec les résultats retrouvés dans notre étude.

## 2. Résultats macroscopiques de l'analyse bactériologique des prélèvements

### 2.1. Les bactéries Gram positives

#### 2.1.1. *Staphylococcus aureus*

Sur milieu Chapman, les colonies sont apparues sous forme de petits points jaune doré. Elles ont souvent une texture lisse et brillante, ce qui est une caractéristique distinctive. Cette pigmentation est due à la production de pigments jaunes (staphyloxanthine) par la bactérie (**Figure 19**). Les *Staphylococcus aureus* sont coagulase positive, ce qui signifie qu'ils produisent l'enzyme coagulase (**Figure 20**). Cette propriété est utilisée pour distinguer les *S. aureus* des autres staphylocoques



**Figure 19:** Aspect des colonies de *S.aureus*



**Figure 20:** Test de coagulase

### 2.1.2. *Micrococcus.Spp*

Sur milieu Chapman, les colonies de *Micrococcus* sont petites lisses, rondes et convexes et de couleur crème à jaune pâle avec une texture cireuse (**Figure21**).



**Figure 21:** Aspect des colonies de *Micrococcus.Spp*

## 2.2. Les bactéries Gram négatives

### 2.2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Sur milieu Cétrimide : grandes colonies, convexes et lisses avec une apparence visqueuse. Virage de la couleur de la gélose vers le vert dû à la production du pigment pyoverdine par la bactérie. Les souches cliniques donnent généralement des colonies larges avec une odeur caractéristique (**Figure 22**).

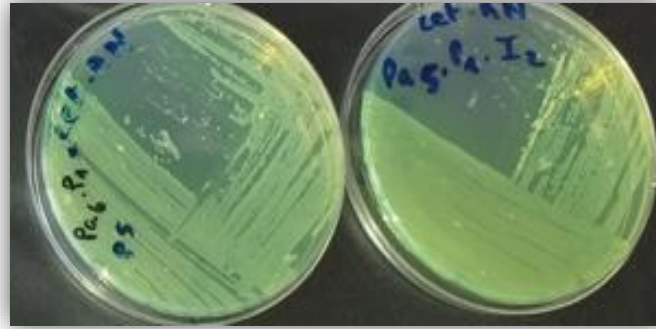


Figure 22: Aspect des colonies de *Pseudomonas aeruginosa*

### 2.2.2. *Acinetobacter baumannii*

Sur milieu MacConkey, cette bactérie peut se développer sous forme de colonies incolores à légèrement rosées. L'aspect des colonies sont petites et lisses, avec une texture mucoïde (Figure23).

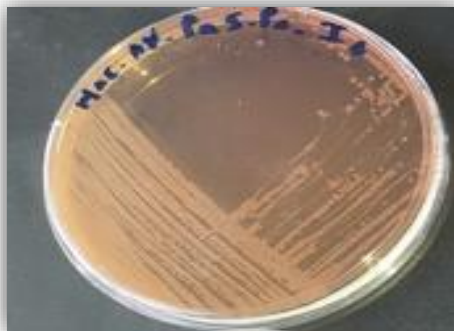


Figure 23: Aspect des colonies de *Acinetobacter baumannii*

### 2.2.3. *Proteus mirabilis*

Sur milieu MacConkey, *Proteus mirabilis* présente des colonies de couleur beige à légèrement jaunâtre. Les colonies individuelles sont opaques et ne sont pas clairement distinctes, contrairement à beaucoup d'autres bactéries. Au lieu de cela, elles forment un tapis ondulé. (Figure24)

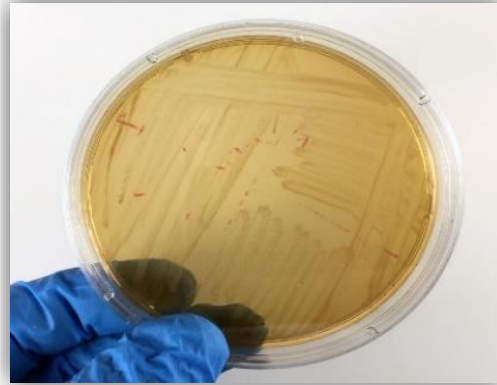


Figure 24: Aspect des colonies de *Proteus mirabilis*

#### 2.2.4. *Serratia marcescens*

Sur milieu MacConkey, *Serratia marcescens* présente des colonies rose à rouge, mucoïdes, fortement agrégées sur la gélose en raison de sa capacité à former des biofilms (Figure 25).

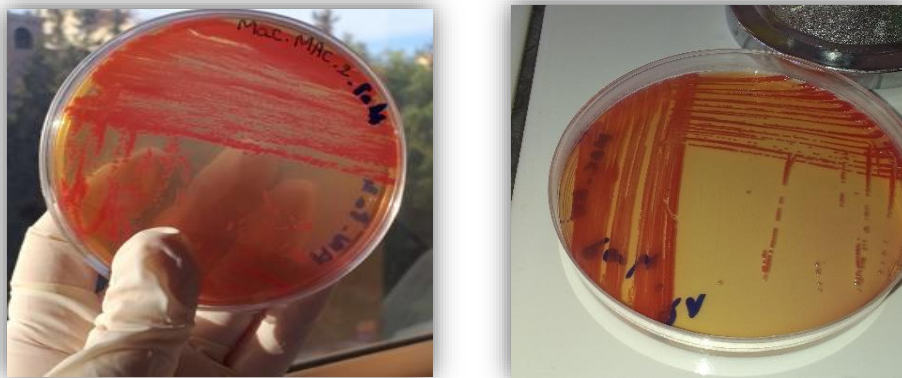


Figure 25: Aspect des colonies de *Serratia marcescens*

#### 2.2.5. *Serratia liquefaciens*

Sur milieu MacConkey, elle est présente sous forme de colonies rondes, lisses, brillantes, convexes et incolore.

#### 2.2.6. *Klebsiella pneumoniae*

Sur milieu MacConkey elle est sous forme de grosses colonies bombées, muqueuses, lisses parfois filantes à l'anse de platine ayant un aspect gras et coulant, d'un diamètre de 3 à 4 mm sur un milieu solide après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C (Figure26).

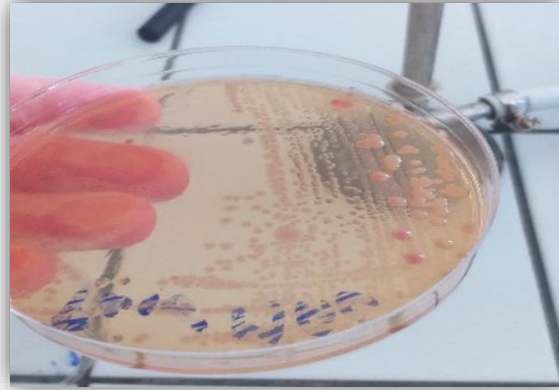


Figure 26: Aspect des colonies de *Klebsiella pneumoniae*

### 3. Identification biochimique de quelques souches isolées

D'après notre étude, 8 souches ont été isolées, dont 5 souches ont été identifiées par la galerie API 20<sup>E</sup> et API Staph (Figure 27)



*Staphylococcus aureus* (Biotype 6736173)



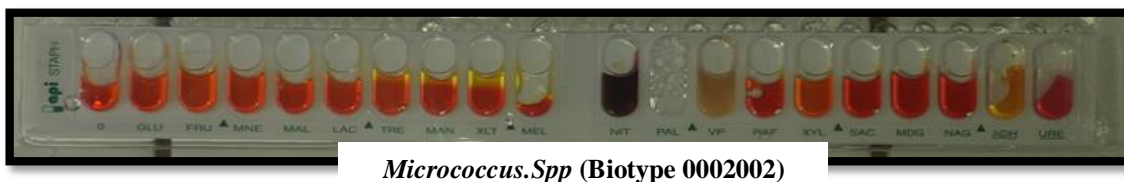
*Serratia marcescens* (Biotype 7207763)



*Serratia liquefaciens* (Biotype 6367563)



*Proteus mirabilis* (Biotype 4377000)



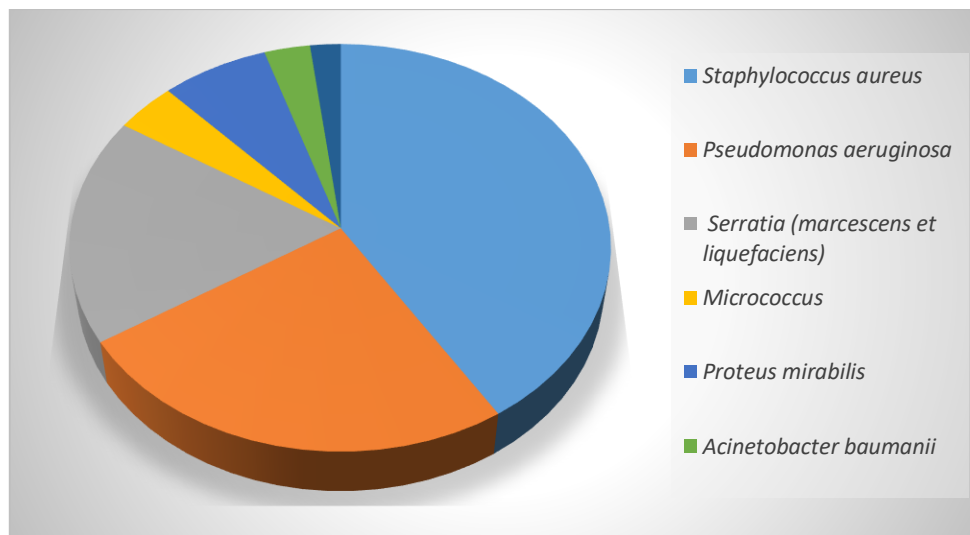
**Figure 27:** Identification biochimique (Api 20<sup>E</sup> et API Staph) des souches isolées

L'augmentation de la prévalence du diabète est associée au problème croissant des infections chez les patients diabétiques (Cunha, 2000).

Les résultats de l'identification macroscopique et biochimique des bactéries ont révélé une diversité des espèces isolées à partir des pieds diabétiques.

Dans notre étude *Staphylococcus aureus* était la bactérie la plus souvent mise en évidence à un pourcentage de (41%). Suivie par *Pseudomonas aeruginosa* (25%), qui est isolée après des hospitalisations de longue durée ou l'application de pansements humides.

Suivie par les autres bactéries *Serratia (marcescens et liquefaciens)* (18%), *Proteus mirabilis* (7%), *Micrococcus* (4%), puis *Acinetobacter baumannii* (3%), et *Klebsiella pneumoniae* (2%)(Figure 28).



**Figure 28:** Répartition des espèces bactériennes isolées à partir des prélèvements du pied diabétique.

Dans notre recherche, nous avons constaté que *Serratia marcescens* constituait 12,8% des isolats. Cette bactérie a été rarement observée dans d'autres études menées dans d'autres pays tels que le Maroc (Aich, 2017).



Nos résultats sont comparables aux données déjà publiées dans la littérature, une étude effectuée par (Akhi *et al.*, 2015) en Iran qui montre que la bactérie prédominante isolée des pieds diabétiques était *Staphylococcus aureus* à 28%.

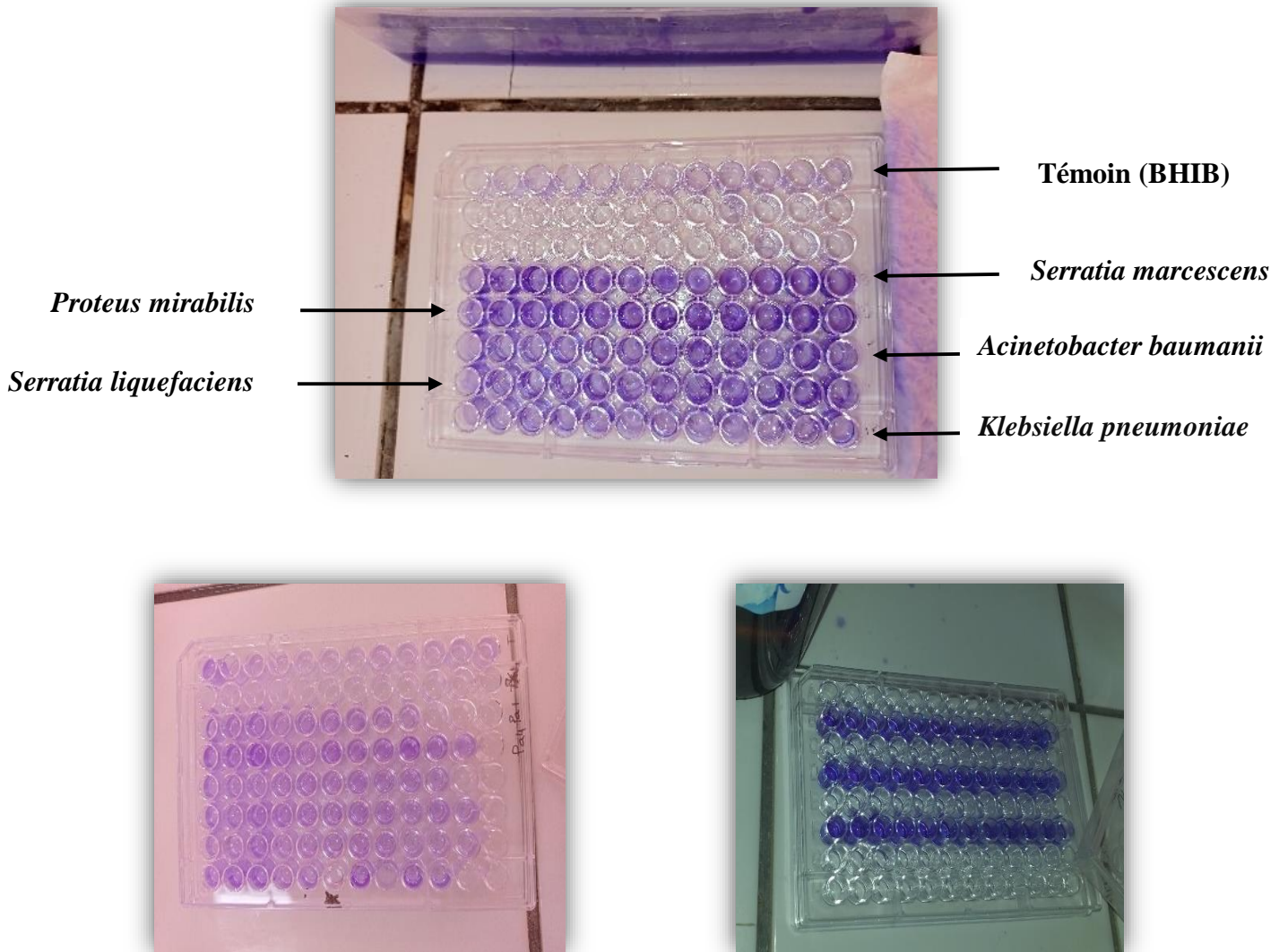
De nombreuses études sur ce sujet confirment que *Staphylococcus aureus* est la bactérie la plus couramment isolée et la plus pathogène dans les infections du pied diabétique. Une autre étude réalisée par (Sharma *et al.*, 2006) à l'hôpital de Bir, les isolats bactériens les plus fréquents étaient *Staphylococcus aureus* (38,4 %), *Pseudomonas aeruginosa* (17,5 %) et *Proteus* (14 %). À l'opposé des résultats obtenus ici, l'étude réalisée en Malaisie a rapporté que l'isolat le plus courant était *Proteus mirabilis* (16,8 %) suivi d'*Escherichia coli* (13,5%), *Staphylococcus aureus* (11,4%), *Pseudomonas spp.* (10,8 %) (Dwedat *et al.*, 2015).

De plus, les résultats obtenus de l'étude rétrospective de l'hôpital Charles Nicolle de Tunis montre que les *entérobactéries* étaient les bactéries les plus fréquemment isolées (73 %), suivies par les streptocoques (10 %), *Staphylococcus aureus* (9 %) (Ben Moussa *et al.*, 2016).

La variété des souches bactériennes observée peut être attribuée à des techniques de prélèvements variables, susceptibles d'entraîner des erreurs dans la qualité des échantillons, notamment en ce qui concerne la profondeur des plaies. De plus, l'administration fréquente d'antibiotiques aux patients avant leur hospitalisation peut expliquer pourquoi les bactéries réellement responsables de l'infection ne sont pas toujours identifiées. Par conséquent, les corrélations entre les aspects cliniques et bactériologiques ne sont pas toujours cohérentes dans la littérature. Toutefois, des effectifs plus importants seraient nécessaires pour obtenir des comparaisons statistiquement significatives (Guira *et al.*, 2015).

#### 4. Résultats d'évaluation de la formation de biofilm *in vitro*

Dans cette partie toutes les souches isolées : *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus*, *Proteus mirabilis*, *Serratia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* et *P. aeruginosa* ont été évaluées à former un biofilm par la technique TCP (Figure 29).



**Figure 29:** Evaluation de la formation de biofilm des souches bactériennes isolées par la technique TCP.

La comparaison des moyennes de densité optique de chaque souche avec l'absorbance de bouillon BHIB stérile a permis de donner les résultats suivants (**Tableau 04**) :

**Tableau 04:** Résultats de la formation de biofilm par la méthode TCP.

La souche	Prélèvement	Estimation	de biofilm
		<b>Modéré</b>	<b>Fort</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Patient N°3 / N°4/ N°5/ N°7/ N°8	1 souche	4 souches
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Patient N°5 / N°6	2 souches	
<i>Serratia marcescens</i>	Patient N°3		1 souche
<i>Proteus mirabilis</i>	Patient N°8		1 souche
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Patient N°5		1 souche
<i>Serratia liquefaciens</i>	Patient N°3		1 souche
<i>Micrococcus</i>	Patient N°1	1 souche	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Patient N°10	1 souche	

Dans notre étude, il a été démontré que parmi les souches obtenues auprès des patients diabétiques 8 souches avaient la capacité de former des niveaux élevés à modérés de biofilm. Parmi eux, *Serratia marcescens* était la souche la plus formatrice de biofilm, suivie de *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Serratia liquefaciens* et *Acinetobacter baumannii* avec une DO de 0.68 qui ont été classées comme organismes producteurs élevés de biofilm. Le reste des souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Micrococcus* ont été regroupées comme producteurs modérés de biofilm avec une DO de 0.2 (**Figures 30**).

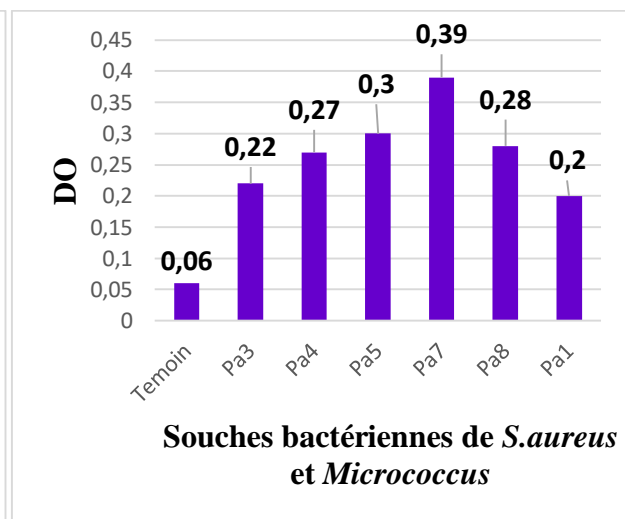
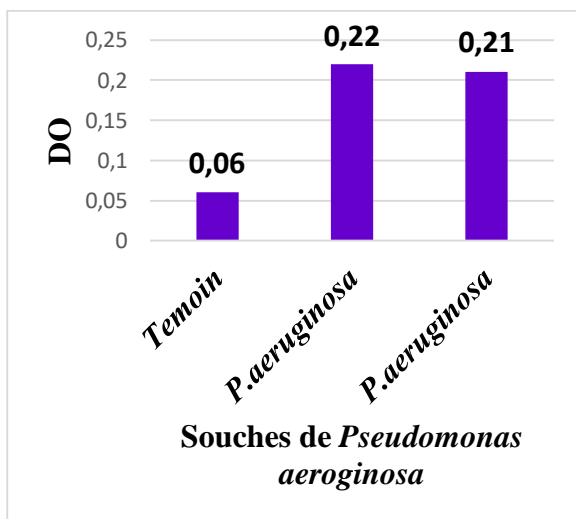
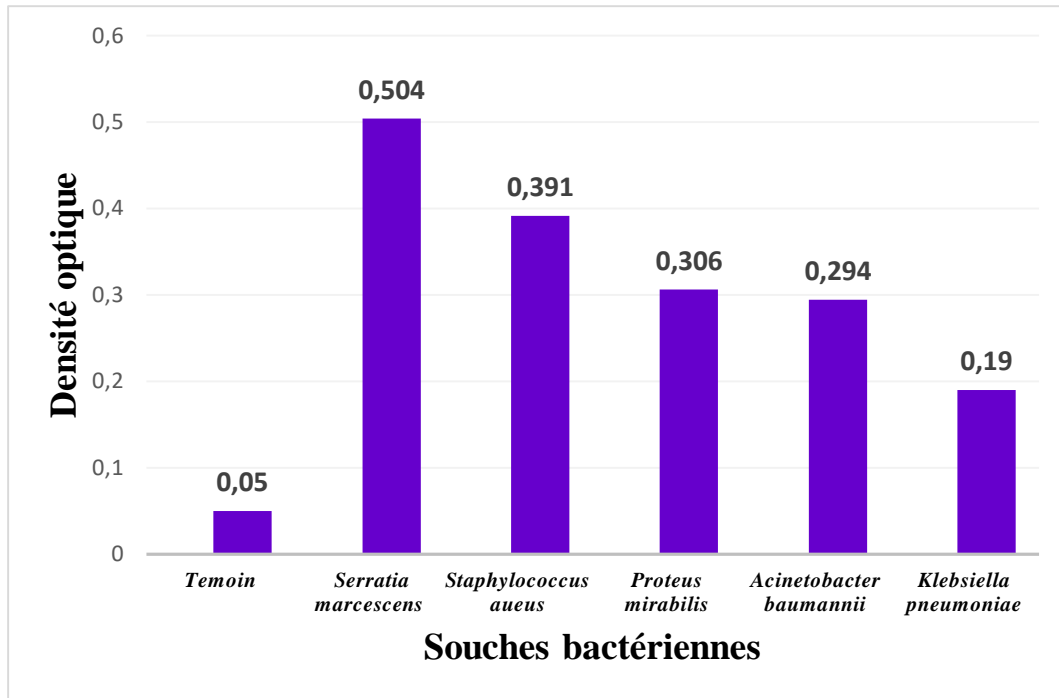


Figure 30: Quantification de la formation de biofilm par les souches bactériennes isolées.

Une étude de (Banu *et al.*, 2015) a enregistré que *Staphylococcus aureus* était le principal formateur de biofilm, avec (38,8 %) des isolats testés positifs à la formation de biofilm.

La deuxième souche formatrice de biofilm était *Pseudomonas aeruginosa* (26,5 %), suivie de *Citrobacter sp.* (10,5 %), *E. coli* (10,5 %), *Proteus sp.* (10,5 %), et *Klebsiella oxytoca* (5,26 %).

Une étude similaire rapportée par (Murali *et al.*, 2014) ont découvert que les Staphylocoques sont fortement formateurs de biofilm (48%) suivie des Entérocoques (44%) et

*Acinetobacter spp.* (39%). Le reste des souches étaient modérément formatrices de biofilm notamment *Proteus spp.* (22%), *Klebsiella spp.* (13%), *Pseudomonas aeruginosa* (8%).

D'autres études ont soutenu cela et en particulier, l'implication de *S. aureus* dans les biofilms suivis par *Pseudomonas aeruginosa* (Banu *et al.*, 2015). Des études ont montré que *Pseudomonas aeruginosa* forme plus facilement des biofilms dans les plaies des patients diabétiques (Ashok, 2011).

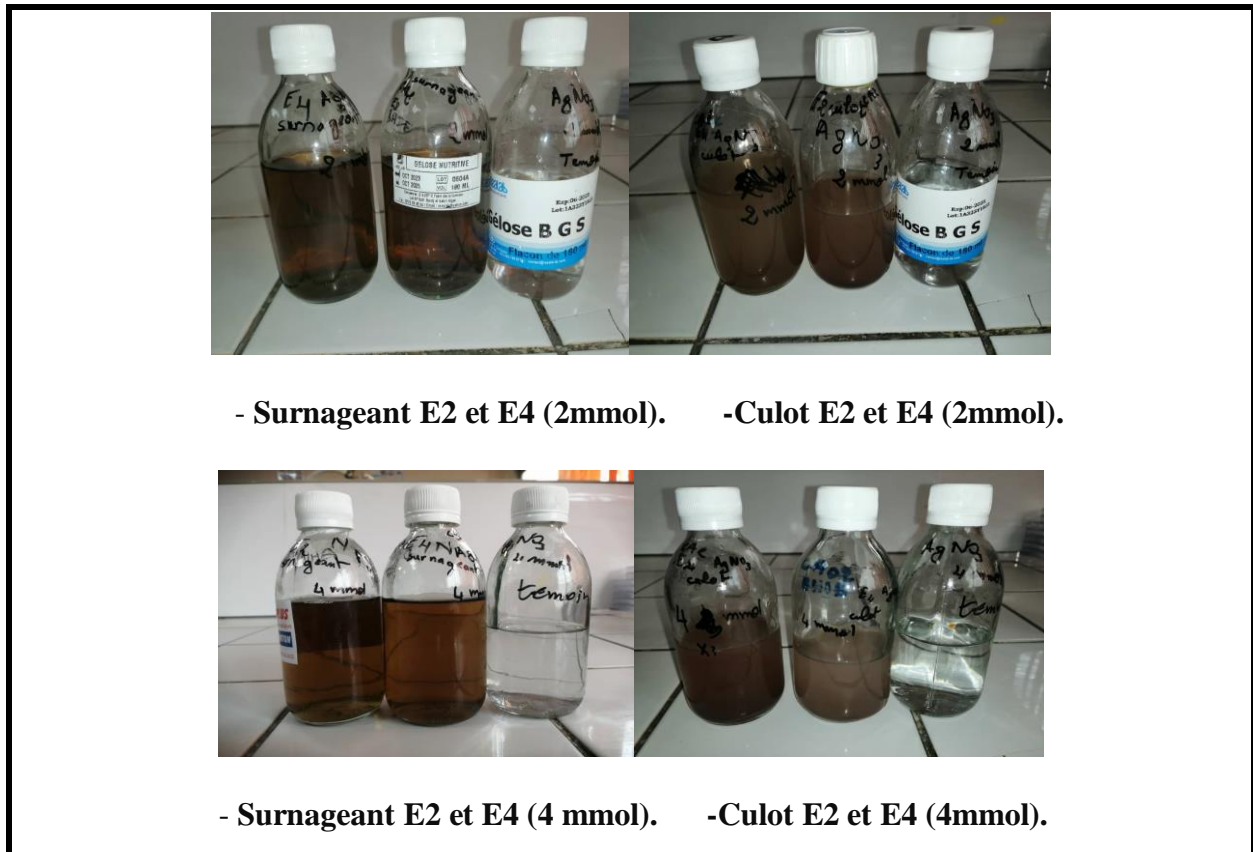
(Dowd *et al.*, 2008) ont suggéré que les espèces bactériennes sont incapables de provoquer individuellement des infections mais elles agissent en synergie avec d'autres espèces bactériennes pour former des communautés de biofilms. Ces communautés microbiennes peuvent influencer significativement la chronicité des plaies chroniques, ainsi elles peuvent retarder le processus de cicatrisation des plaies ( James *et al.*, 2008 ).

Les biofilms bloquent également les défenses de l'hôte. Ils ont une propriété anti-phagocytaire, qui inactive les leucocytes de la matrice polysaccharidique. Il existe également un élément dans la matrice qui désactive à la fois les anticorps du complément et ceux de l'hôte (Leid *et al.*, 2002).

### 5. La biosynthèse des nanoparticules à partir de la bactérie *Bacillus Spp*

Dans ce contexte, la biosynthèse des nanoparticules d'argent par la souche bactérienne *Bacillus spp* sera discutée, en optimisant divers paramètres fonctionnels, antibactériens et anti biofilms. La sélection d'une bactérie pour la synthèse repose sur sa capacité à s'adapter à différentes conditions, comme la température, l'aération et le temps d'incubation, ainsi que sa croissance rapide, afin de pouvoir remplacer les méthodes chimiques et physiques toxiques et dangereuses pour la santé et l'environnement.

La biosynthèse des nanoparticules d'argent a été vérifiée après 5 jours d'incubation de *Bacillus spp* à 30°C, les résultats sont indiqués dans la (Figure 31) :



**Figure 31:** Résultats de la biosynthèse des AgNPs par *Bacillus spp* (E4)

D'après les résultats de biosynthèse des nanoparticules d'argent par *Bacillus spp*, on remarque un changement de couleur de la solution du jaune pâle au brun foncé (surnageant) et du gris au brun foncé du culot (**Figure 33**). Il est possible d'expliquer ce changement de couleurs par la biosynthèse intracellulaire des nanoparticules d'argent (AgNPs). Cette réaction se produit lorsque les ions d'argent sont réduits de l'état ionique ( $Ag^+$ ) vers l'état métallique ( $Ag^0$ ) grâce à la participation de diverses enzymes intracellulaires telles que la nitrate réductase, en suivant la réaction suivante.



En réalité et d'après (**Kambale et al., 2020**), les AgNPs ont une teinte brune en raison de la vibration concomitante des électrons libres de l'argent métallique qui réagissent à l'onde lumineuse. Cela explique pourquoi ils ont observé la résonance plasmonique de surface (SPR) avec les nanoparticules métalliques.

D'après (**Bhattacharyya et al., 2016**) ce changement de couleur est dû à l'excitation de l'effet de résonance plasmonique de surface (à 445 nm).

## 6. Séchage de la solution des nanoparticules d'argent

Après quelques heures de séchage de la solution d'AgNPS dans l'étuve à 100°C, nous avons obtenu une poudre d'AgNps présentée dans la (Figure32).

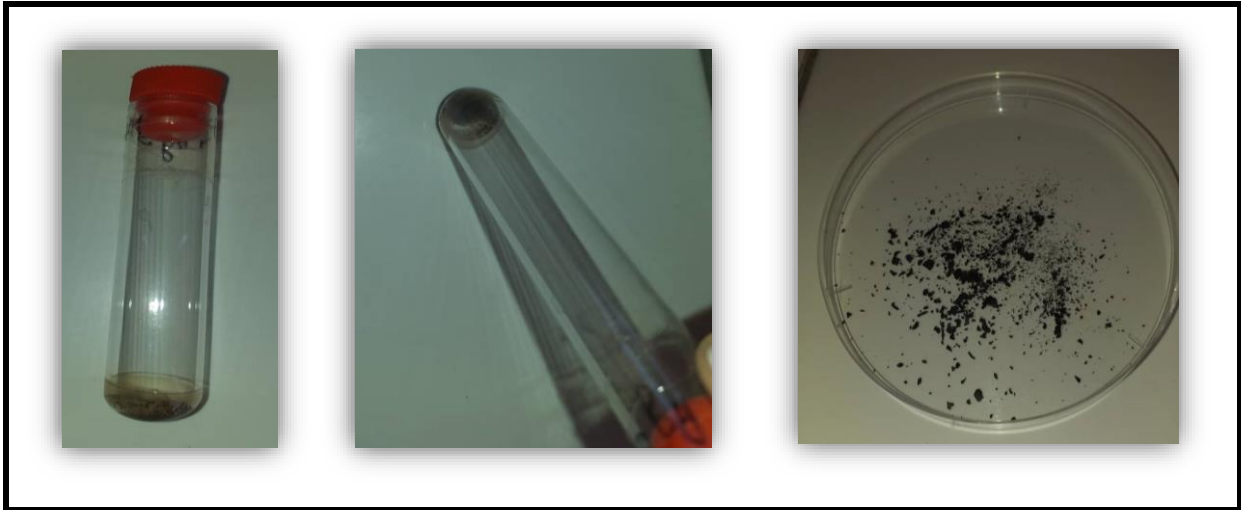


Figure 32: Poudre de nanoparticule d'argent

## 7. L'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent

Cette technique nous a permis de déterminer non seulement à l'œil nu (Figure 33), mais aussi par la mesure de l'indice d'inhibition, la concentration minimale d'AgNps qui inhibe la croissance bactérienne.

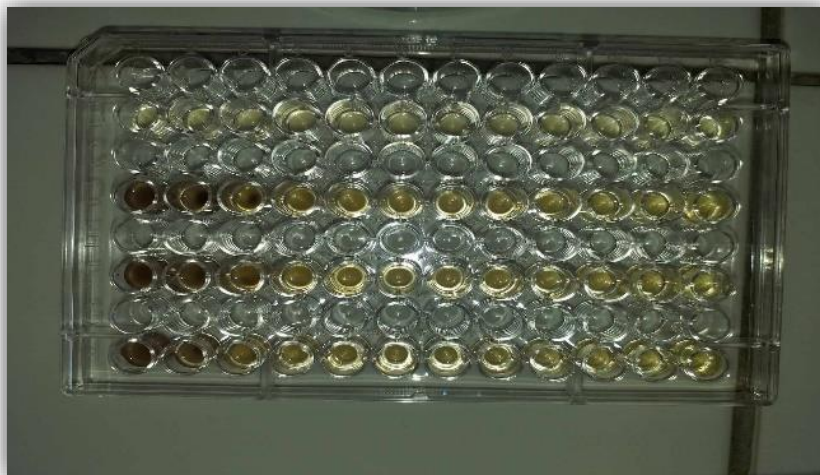
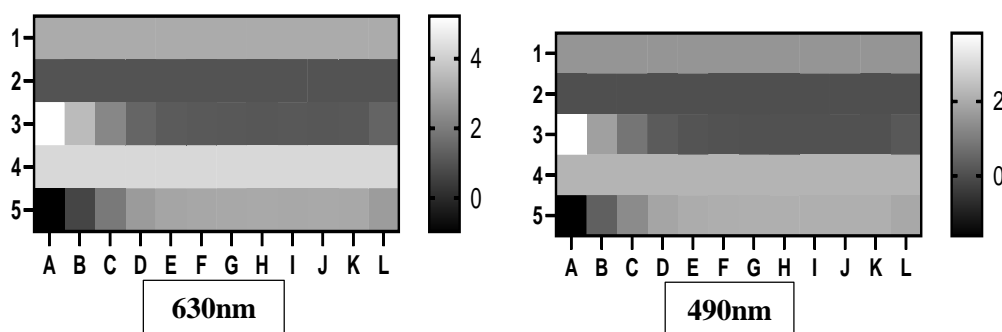


Figure 33: L'activité antibactérienne des AgNPs contre *Serratia marcescens*



**Figure 34:** Résultat obtenu par l'analyse (Heat map) d'inhibition de *Serratia marcescens* par les AgNPs.

Pour cette souche, et à travers l'analyse par "heat map", nous pouvons dire que la CMI est de 14,64  $\mu\text{g/ml}$ . Donc, les AgNps biosynthétisés ont un grand pouvoir antimicrobien contre cette espèce bactérienne.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de (**Chinnasamy *et al.*, 2021**) qui ont prouvé une inhibition totale des souches testées par l'utilisation des AgNPs. Ainsi les résultats de CMI ont été ensuite validés en déterminant le moindre effet inhibiteur des AgNPs en tant que CMI et la concentration minimale bactéricide pour tuer 99,9 % des bactéries.

Une autre étude de (**Sarathi Kannan *et al.*, 2020**), montre que les nanoparticules d'argent présentent une inhibition efficace de la croissance bactérienne, ils sont puissants contre tous les agents pathogènes testés. Alors que les résultats ont clairement révélé que le pouvoir bactéricide des AgNP synthétisés présentait une activité plus élevée chez les Gram négatif par rapport aux bactéries à Gram positif.

Cet écart pourrait être dû à des différences dans la structure de la membrane et dans la composition de la paroi cellulaire. Les bactéries à Gram négatif possèdent une couche de peptidoglycane plus fine où les AgNPs pénètrent facilement dans la membrane cellulaire et provoquent des dommages (**Mohanty *et al.*, 2012**).

D'après (**Tan *et al.*, 2021**), les AgNP synthétisées à une concentration de 1 mM d'AgNO<sub>3</sub> ont montré un effet antibactérien plus important que les AgNP synthétisées à une concentration de 2 mM. Ceci pourrait être expliqué par la forme plus petite des AgNPs lorsqu'elles sont biosynthétisées à des concentrations plus faibles d'AgNO<sub>3</sub>, menant à des activités antibactériennes améliorées. L'activité antibactérienne des AgNPs s'explique par leur acidité douce lorsqu'elles existent dans les cellules bactériennes, ce qui endommage l'ADN et la membrane et provoque la mort cellulaire.



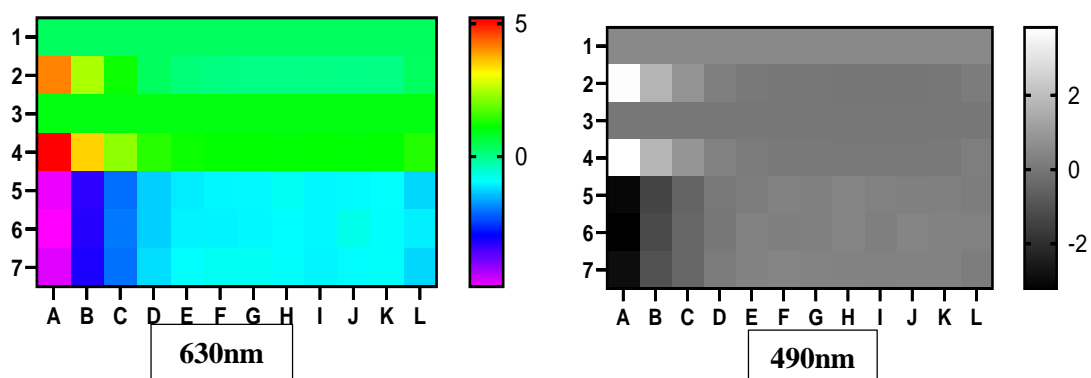
### 8. L'activité anti-biofilm des nanoparticules d'argent

Le taux d'élimination du biofilm de 38 heures formé par *Serratia marcescens* a été estimé pour évaluer l'activité anti-biofilm des nanoparticules d'argent biosynthétisées par *Bacillus.spp.* Selon les résultats, les AgNPs biosynthétisées sont efficaces contre la souche la plus formatrice de biofilm (*Serratia marcescens*), avec une éradication visible qui entraîne une diminution de l'intensité de la couleur du cristal violet par rapport au témoin positif (**Figure 35**).



**Figure 35:** L'activité antibiofilm des AgNPs contre la souche la plus formatrice de biofilm (*Serratia marcescens*).

Pour la concentration minimale inhibitrice du biofilm, les résultats obtenus sont montrés dans la (**Figure36**) :



**Figure 36:** Résultats d'activité des nanoparticules d'argent contre le biofilm formé par *Serratia marcescens* à travers l'analyse par "Heat map"

Pour cette souche, et à travers l'analyse par "Heat map", nous pouvons dire que le meilleur scénario de traitement est lié à un temps d'exposition de 30 minutes ou la concentration minimale éradicatrice de biofilm est de seulement 48,82 µg/ml.

Donc, un traitement à une concentration de 48,82 µg/ml pendant 30 minutes est suffisant pour éradiquer le biofilm formé par cette souche.

Par ailleurs, l'interprétation des résultats des autres temps d'exposition (15 et 60 minutes), semblent un peu contradictoires, soit à cause des erreurs liées à la manipulation, soit à d'autres phénomènes liés à la nature des nanoparticules comme le phénomène précédemment discuté, à savoir le "biphasic effect".

Une étude menée par (Mohanty *et al.*, 2012) sur *P. aeruginosa* a révélé que l'inhibition de la synthèse des exopolysaccharides par les AgNPs a conduit à une réduction significative de la formation de biofilm.

Dans une étude similaire menée par Kalishwaralal *et al.*, (2010) la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus epidermidis* a été évaluée. Les microorganismes cultivés sans nanoparticules d'argent (AgNPs) ont montré une formation de biofilm, indiquée par des colonies noires cristallines sèches sur la gélose. En revanche, lorsque les organismes étaient cultivés avec des AgNPs, ils n'ont pas survécu. Même à des concentrations réduites d'AgNPs, la croissance des souches testées a été inhibée, et la synthèse des exopolysaccharides, nécessaire à la formation du biofilm a été réduite. Les nanoparticules d'argent ont montré une capacité significative à inhiber la formation du biofilm sans affecter la viabilité des microorganismes à une concentration de 50 mM.

Une autre étude réalisée en Inde, les nanoparticules d'argent ont montré une forte capacité à inhiber la formation de biofilm chez *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, avec des taux d'inhibition allant jusqu'à 92,9 %, 64,5 % et 78,7 % respectivement à une concentration de 2 µg/ml (Kora *et Sashidhar*, 2015).

**Conclusion  
et  
perspectives**

Les infections du pied diabétique sont un problème majeur de santé publique, entraînant une morbidité importante et un risque accru d'amputation. En effet, ces infections bactériennes sont parmi les plus fréquentes chez les personnes diabétiques et peuvent avoir des conséquences graves sur le pronostic vital si elles ne sont pas diagnostiquées précocement. Ainsi, la gestion efficace des infections du pied diabétique revêt une importance critique pour la santé et le bien-être des patients diabétiques.

D'après nos résultats, les infections du pied diabétique sont principalement caractérisées par la prédominance des bactéries à Gram positif tel que *Staphylococcus aureus* suivie par les bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia (marcescens et liquefaciens)*, *Proteus mirabilis*).

Par ailleurs, la technique (TCP) s'est avérée prometteuse pour évaluer la formation de biofilm par les souches bactériennes isolées. Les résultats ont montré que les bactéries provenant des plaies diabétiques ont une forte capacité à former des biofilms. Cette constatation souligne les défis cliniques posés par l'élimination des biofilms bactériens, car les traitements antibiotiques habituellement efficaces contre les bactéries libres peuvent se révéler moins efficaces contre celles organisées en biofilm.

Ces derniers temps, la nanotechnologie est rapidement apparue comme un domaine d'intérêt considérable pour les chercheurs engagés dans le développement de médicaments.

Les nanoparticules d'argent sont des nanoparticules métalliques ayant des propriétés uniques dues à leur petite dimension, et leur activité antibactérienne et antibiofilm.

Dans notre étude, nous avons synthétisé des nanoparticules d'argent par une méthode biologique simple en utilisant la souche *Bacillus spp.* Ces nanoparticules ont montré une excellente activité antibactérienne, ainsi qu'une capacité remarquable à réduire la formation de biofilm contre la souche *Serratia marcescens*.

Cependant, ces résultats demeurent préliminaires, et pour les approfondir, il serait souhaitable de mener d'autres approches et études :

- Synthétiser des nanoparticules d'argent à partir de différentes souches microbiennes.
- Explorer l'activité antimicrobienne sur une gamme étendue de microorganismes tels que les virus et les champignons...
- Développer des médicaments à base de nanoparticules comme alternative aux antibiotiques.
- Étudier l'utilisation des nanoparticules dans le traitement des infections liées aux biofilms.

- Évaluer d'autres activités biologiques telles que l'activité antioxydante.

# **Références bibliographiques**



- Afonso, A. C., Oliveira, D., Saavedra, M. J., Borges, A., & Simões, M. (2021). Biofilms dans les ulcères du pied diabétique : impact, facteurs de risque et stratégies de contrôle. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8278.
- Agence de la santé publique du Canada. (2010). Fiche Technique Santé-Sécurité : Agents Pathogènes – *Micrococcus* spp..
- Ahmed, A. A., Algamdi, S. A., & Alzahrani, A. M. (2015). Surveillance of risk factors for diabetic foot ulceration with particular concern to local practice. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 9(4), 310–315. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2014.04.004>
- Aich, F. (2017). Infection du pied diabétique : aspects bactériologiques et résistance aux antibiotiques. Mémoire de master en biologie médicale. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Maroc.
- Aide Aux Jeunes Diabétiques. (2023). Autres diabètes. <https://www.ajd-diabete.fr/le-diabete-de-type-1/les-autres-diabetes/>.
- Akhi, M. T., Ghotaslou, R., Asgharzadeh, M., Varshochi, M., Pirzadeh, T., Memar, M. Y., Zahedi Bialvaei, A., Seifi Yarijan Sofla, H., & Alizadeh, N. (2015). Bacterial etiology and antibiotic susceptibility pattern of diabetic foot infections in Tabriz, Iran. *GMS Hygiene and Infection Control*, 10, Doc02. doi: 10.3205/dgkh000245.
- Akwah, L., Ntungwen Charles, F., Nukenine Nchinwan, E., Kagning Tsinda, E., & Nwabo Kamdje, A. H. (2015). Bacteriology of diabetic foot ulcers with reference to multidrug resistance strains at the Yaounde Central Hospital (Cameroon). *Journal Name*, 1(4), 53.
- Al Wahbi, A. (2018). Autoamputation of diabetic toe with dry gangrene: a myth or a fact? *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 255-264.
- Alsamhary, K. I. (2020). Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus subtilis* and their antibacterial activity. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(8), 2185-2191.
- Ashok, D. (2011). Why diabetic foot ulcers do not heal. *Journal of the Indian Medical Association*, 24(4), 205.

**B**

- Bannerman, T. L., & Peacock, S. J. (2007). Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, & M. A. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed., pp. 390-404). Washington, DC: ASM Press.
- Banu, A., Hassan, M. M. N., Rajkumar, J., & Srinivasa, S. (2015). Spectrum of bacteria associated with diabetic foot ulcer and biofilm formation : A prospective study. *Australasian Medical Journal*, 8, 280–285. doi :10.4066/amj.2015.2422
- Beauchesne, N. (2023). Évaluation des paramètres de la démarche lors d'une intervention de marche rapide avec le port d'une botte de décharge et d'une élévation controlatérale chez une population atteinte de neuropathie diabétique périphérique. Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Trois-Rivières.
- Bellifa, S. (2014). Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat en maîtrise du développement microbien. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.
- Ben Haj Khalifa, A., Moissenet, D., Vu Thien, H., & Khedher, M. (2011). Infections à *Pseudomonas aeruginosa* chez l'enfant: aspects épidémiologiques, cliniques et bactériologiques. *Annales de Biologie Clinique*, 69(4), 393-403. <https://doi.org/10.1684/abc.2011.0589>
- Ben Moussa, M., Khalfallah, M., Boutiba Ben Boubaker, I., Noura, R., Slim, A., Jerraya, H., & Dziri, C. (2016, February). Bacteriological and therapeutic profile of diabetic foot infection : A prospective study of 100 patients. *Tunis Med*, 94(2), 95-101.
- Bhattacharyya, A., Prasad, R., & Khanday, A. L. (2016). One-pot fabrication and characterization of silver nanoparticles using *Solanum lycopersicum*: An eco-friendly and potent control tool against rose aphid, *Macrosiphum rosae*. *Journal of Nanoscience*, 2016, Article 4679410. <https://doi.org/10.1155/2016/4679410>
- Bissonnette, V. (2011). Évaluation des coûts et éléments d'efficacité du traitement d'un ulcère du pied diabétique (Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, Québec, Canada). Faculté de médecine et des sciences de la santé.



- Bissuel, T., Canovas, F., Avignon, A., & Sultan, A. (2016). La chirurgie orthopédique dans la prévention des troubles trophiques du pied chez le patient diabétique. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 10(1), 47-52.
- Böhning, J., Tarafder, A. K., & Bharat, T. A. M. (2024). Le rôle des molécules matricielles filamenteuses dans la formation de l'architecture et des propriétés émergentes des biofilms bactériens. *Biochem J*, 481(4), 245-263.
- Borns, O., Gastaldi, G., & Ruiz, J. (2013). Pied de Charcot. In *Un diagnostic à ne pas manquer*. Suisse : Mise au point.
- Bouvet, A. (2013). Cours de bactériologie médicale : Streptocoques-entérocoque [Support pédagogique]. <http://www.microbes-edu.org/etudiant/streptocoques.html>.
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., ... & Dakka, N. (2017). Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 16(S1), 173-183.

### C

- Calugaru, V., Magné, N., Héroult, J., Bonvalot, S., Le Tourneau, C., & Thariat, J. (2015). Nanoparticules et radiothérapie. *Bulletin Du Cancer*, 102(1), 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2014.10.002>
- Camba, C., Walter-Lakes, B., Digal, P., Taheri-Araghi, S., & Bezryadina, A. (2024). Formation et manipulation de biofilms avec des pincettes optiques. *Biomedical Optics Express*, 15, 1181-1191.
- Chauvel, R. (2018). Application des nanoparticules d'argent en thérapeutique (Doctoral dissertation).
- Chinnasamy, G., Chandrasekharan, S., Koh, T. W., & Bhatnagar, S. (2021). Synthèse, caractérisation, efficacité antibactérienne et cicatrisante des nanoparticules d'argent d'*Azadirachta indica*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 611560. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.611560>
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J., et al. (1985). Adherence of coagulase negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22, 996–1006.

- Cloutier, J. (2017). Relation Entre les Deux Souches Bactériennes Principales d'un Biofilm Dénitrifiant (Doctoral dissertation, Institut National de la Recherche Scientifique, Canada).
- Cunha, B. A. (2000). Antibiotic selection for diabetic foot infections : A review. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*, 39(4), 253-257.

### D

- Dadi, R. (2019). Synthèse de nanoparticules d'oxydes métalliques et leur activité antibactérienne (Doctoral dissertation, Université Paris-Nord-Paris XIII).
- Deljou, A., & Goudarzi, S. (2016). Green extracellular synthesis of silver nanoparticles using thermophilic *Bacillus* sp. AZ1 and its antimicrobial activity against several human pathogenetic bacteria. *Iranian Journal of Biotechnology*, 14(2), 25.
- Denis, F., Phocyl, M., Martin, C., Bingen, E., & Quentin, R. (2007). *Bactériologie médicale : Techniques usuelles* (2e édition). Paris, France : Masson.
- Dhand, C., Dwivedi, N., Loh, X. J., Jie Ying, A. N., Verma, N. K., Beurman, R. W., ... Ramakrishna, S. (2015). Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: a comprehensive overview. *RSC Advances*, 5(127), 105003–105037.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: vie microbienne sur les surfaces. *Maladies infectieuses émergentes*, 8(9), 881.
- Doumbia, N., Bakary, D., Ouologuem, N., Sangare, D., Diarra, A. A., Samaké, M., ... & Traore, A. (2021). Diabetic Foot : Epidemiological and Clinical Aspects in the Department of Medicine and Endocrinology of the Hospital of Mali, Mali. *Journal of Diabetes Mellitus*, 11(4), 159-170.
- Dowd, S. E., Wolcott, R. D., Sun, Y., McKeenan, T., Smith, E., & Rhoads, D. (2008). Polymicrobial nature of chronic diabetic foot ulcer biofilm infections determined using bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *PloS one*, 3(10), e3326.
- Dunyach-Remy, C., Sotto, A., & Lavigne, J. P. (2015). Le microbiote cutané: étude de la diversité microbienne et de son rôle dans la pathogénicité. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2015(469), 51-58.
- Dupin, A. (2017). *Intérêts des huiles essentielles dans la lutte contre l'antibio-résistance induite par les biofilms* (thèse de doctorat). Université de Bourgogne.

- Dwedar, R. A., Ismail, D. K., & Abdalbaky, A. (2015). Diabetic foot infection : Microbiological causes with special reference to their antibiotic resistance pattern. The Egyptian Journal of Medical Microbiology (EJMM), 24(3).

### E

- El Allali, B. (2015). Prise en charge chirurgicale du pied diabétique (Thèse de doctorat en médecine). Université Mohammed V, Rabat.

### F

- Faraoun, K., Benasla, L., Tahar-Abbas, F., Fazaz, I., Sahnine, K., Benkhelifa, T., ... & Mohammedi, F. (2013). P2061 Pied diabétique : aspects cliniques et facteurs favorisants selon le sexe. Diabetes & Metabolism, 39, A83.
- Fatnassi, A. (2020). Étude de la résistance aux bêta-lactamines des entérobactéries isolées de différents prélèvements pathologiques à l'hôpital El Hakim Saadan - Biskra (Mémoire de master en microbiologie appliquée). Biskra : Université Mohamed Khider de Biskra.
- Flores, P., Luo, J., Mueller, D. W., Muecklich, F., & Zea, L. (2024). Space biofilms—An overview of the morphology of Pseudomonas aeruginosa biofilms grown on silicone and cellulose membranes on board the international space station. Biofilm, 100182.

### G

- Goutayer, M. (2008). Nano-émulsions pour la vectorisation d'agents thérapeutiques ou diagnostiques: étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence in vivo (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI).
- Grimaldi, A. (2000). Diabétologie, Questions d'internat [Document en ligne]. Université Pierre et Marie Curie. <https://www.yumpu.com/fr/document/read/17617270/universite-pierre-et-marie-curie-diabetologie-questions-dinternat->
- Grimaldi, A. (2000). Diabétologie. Questions d'internat. University of Paris-VI.
- Guilhen, C. (2017). Caractérisations transcriptionnelle et phénotypique de bactéries dispersées de biofilm à Klebsiella pneumoniae (Thèse de doctorat, Université Clermont Auvergne [2017-2020]).
- Guira, O., Tiéno, H., Traoré, S., Diallo, I., Ouangré, E., Sagna, Y., ... & Drabo, Y. J. (2015). Écologie bactérienne et facteurs déterminant le profil bactériologique du pied

diabétique infecté à Ouagadougou (Burkina Faso). Bulletin de la Société de pathologie exotique, 108, 307-311.

### H

- Hachicha, S., Mokline, A., Ghedira, S., Rahmouni, M., Fraj, H., Saad, M. B., & Messadi, A. A. (2024). Brûlures Chez Le Diabétique : Étude Épidémiologique, Clinique et Pronostique. *Annals of Burns and Fire Disasters*, 37(1), 23.
- Hammami, M., Lahiani, D., Guemri, B., Maalej, M., Elleuch, E., Hammami, B., & Ben Jemaa, M. (2015). Les infections du pied diabétique : étude de 136 cas. *Annales d'Endocrinologie*, 76(4), 552. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2015.07.852>
- Hasan, J., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. (2013). Antibacterial surfaces: The quest for a new generation of biomaterials. *Trends in Biotechnology*, 31(5), 295-304.
- Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., & Iqbal, M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15, 305-311.
- Hatemann, A. Havan G. (2019). Troubles trophiques du pied diabétique. In *Diabétologies: Paris*. Elsevier Masson. Chapitre 18.
- Hieu, H. N., Trang, D. T. H., Hien, V. T. T., Nghia, N. V., Lam, N. T., & Nguyen, T. M. D. (2022). Microorganism-mediated green synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus niger* and *Bacillus megaterium*. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 17(1), 359-367.
- Høiby, N. (2014). Une histoire personnelle de recherche sur les biofilms microbiens et les infections par biofilms. *Pathogens and Disease*, 70(3), 205-211.

### I

- Ibukun, M., Abimbola, O., Folorunso, O., Jacobus, N., & Lyndy, J. (2019). Activité antibactérienne et antibiofilm d'extraits de feuilles d'acétone de neuf espèces d'*Eugenia* et *Syzygium* (Myrtaceae) sud-africaines sous-étudiées et leurs indices de sélectivité. *Médecine complémentaire et alternative BMC*, 19, 141.
- International Diabetes Federation. (2019). *L'Atlas du Diabète de la FID - 9e édition 2019*. Bruxelles, Belgique: International Diabetes Federation.

### J

- James, G. A., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, E. D., Secor, P., Sestrich, J., ... & Stewart, P. S. (2008). Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 16(1), 37-44.
- John, M. S., Nagoth, J. A., Ramasamy, K. P., Mancini, A., Giuli, G., Miceli, C., & Pucciarelli, S. (2022). Synthesis of bioactive silver nanoparticles using new bacterial strains from an Antarctic consortium. *Marine Drugs*, 20(9), 558.
- Jolio, N. (2014). Complications et effets of diabetes [Internet]. Lukula: Salutemo (RD Congo).

### K

- Kalimuthu, K., Babu, R. S., Venkataraman, D., Bilal, M., & Gurunathan, S. (2008). Title of the article. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65(1), 150-153.
- Kalishwaralal, K., BarathManiKanth, S., Pandian, S. R. K., Deepak, V., et Gurunathan, S. (2010). Les nanoparticules d'argent empêchent la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa*.
- Kambale, E. K., Nkanga, C. I., Mutonkole, B.-P. I., Bapolisi, A. M., Tassa, D. O., Liesse, J.-M. I., ... Memvanga, P. B. (2020). *Green synthesis of antimicrobial silver nanoparticles using aqueous leaf extracts from three Congolese plant species (Brillantaisia patula, Crossopteryx febrifuga and Senna siamea)*. *Heliyon*, 6(8), e04493. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e04493
- Kora, A., & Sashidhar, R. (2015). Antibacterial activity of biogenic silver nanoparticles synthesized with gum ghatti and gum olibanum: A comparative study. *Journal of Antibiotics*, 68(2), 88–97. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.114>
- Kourichi S, Moussaoui A. (2018). Le pied diabétique : étude rétrospective de 21 cas au niveau du CHU de Bejaia. Mémoire en vue d'obtention de grade docteur en médecine. Département de médecine. Université de Bejaia. Algérie.P.27.

### L

- Lanone, S., & Boczkowski, J. (2010). Les sources de nanoparticules. *Revue française d'allergologie*, 50(3), 211-213. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2010.01.039>
- Lavigne, J. P., & Sotto, A. (2007). Recommandations pour la bonne pratique du prélèvement microbiologique dans les infections cutanées et osseuses: à propos du pied diabétique. *Spectra Biologie*, 26(159), 29-34.

- Lazarus, E., Meyer, A. S., Ikuma, K., & Rivero, I. V. (2024). Three dimensional printed biofilms: Fabrication, design and future biomedical and environmental applications. *Microbial Biotechnology*, 17(1), e14360.
- Leaper, D. J., Schultz, G., Carville, K., Fletcher, J., Swanson, T., & Drake, R. (2012). De l'élargissement du cadre conceptuel TIME: qu'avons-nous appris ces dix dernières années? *International Wound Journal*, 9.
- Lebeaux, D., Ghigo, J. M., & Beloin, C. (2014). Tolérance des biofilms aux antibiotiques: comprendre pour mieux traiter. *Journal des Anti-infectieux*, 16(3), 112-121.
- Leid, J. G., Shirtliff, M. E., Costerton, J. W., & Stoodley, A. P. (2002). Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infection and Immunity*, 70(11), 6339-6345.
- Leulmi, Z. (2015). Les *Proteus* incriminés dans les infections communautaires et hospitalières : Étude moléculaire de la résistance aux antibiotiques (Thèse de doctorat). Université des Frères Mentouri Constantine.
- Lewandowski, Z., & Evans, L. V. (2000). Structure et fonction des biofilms. Dans *Biofilms: Avancées récentes dans leur étude et leur contrôle* (p. 466).
- Liao, C., Li, Y., & Tjong, S. C. (2019). Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 449.
- Lopes, J. (2019). Développement de nouvelles stratégies de lutte contre les biofilms de *Providencia stuartii*, un pathogène humain multi-résistant (thèse de doctorat). Université Grenoble Alpes. (NNT : 2019GREAV025).
- López, D., Vlamakis, H., & Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(7), a000398.

## M

- M'Bemba, J., Aslangul, E., & Llarger, E. (2014). Le pied diabétique aux urgences. *Journal Européen des Urgences et de Réanimation*, 26(2), 87-96.
- Mahamuni-Badiger, P. P., Patil, P. M., Badiger, M. V., Patel, P. R., Thorat-Gadgil, B. S., Pandit, A., & Bohara, R. A. (2020). Biofilm formation to inhibition: Role of zinc oxide-based nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 108, 110319.
- Mahgoub, M. (2023). An update on the molecular and cellular basis of pharmacotherapy in type 2 diabetes mellitus. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37298274/>

- Mansour, K. (2012). Étude des facteurs associés aux complications chez les diabétiques. Préfecture des arrondissements de Ben Msik, Année 2012.
- Martini, J., & Senneville, E. (2018). Journées nationales du DTS d'endocrinologie, diabète et maladies métaboliques [en ligne]. 9(92), 96-102.
- McNamara, K., & Tofail, S. A. M. (2017). Nanoparticules dans les applications biomédicales. *Progress in Physics: X*, 2(1), 54–88.
- Mirabaud, M. (2003). Entérobactéries à bêta-lactamases (Thèse de doctorat en médecine). Université de Genève, Genève.
- Mirzaei, R., Campoccia, D., Ravaioli, S., & Arciola, C. R. (2024). Emerging Issues and Initial Insights into Bacterial Biofilms: From Orthopedic Infection to Metabolomics. *Antibiotics*, 13, 184.
- Mohanty, S., Mishra, S., Jena, P., Jacob, B., Sarkar, B., & Sonawane, A. (2012). An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(6), 916–924.
- Monabeka, H. G., & Nsakala-Kibangou, N. (2001). Aspects épidémiologiques et cliniques du pied diabétique au CHU de Brazzaville. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 94(3), 246-248.
- Murali, T. S., Kavitha, S., Spoorthi, J., Bhat, D. V., Prasad, A. S. B., Upton, Z., ... & Satyamoorthy, K. (2014). Characteristics of microbial drug resistance and its correlates in chronic diabetic foot ulcer infections. *Journal of Medical Microbiology*, 63(10), 1377-1385.
- Mwangi, N. V., Madivoli, S. E., Kangogo, M., Wangui, M. C., Wanakai, I. S., Nzilu, M. D., & Waudu, W. (2024). An evaluation of antimicrobial potency of silver nanoparticles synthesised from *Fusarium* sp. *Discover Applied Sciences*, 6(4), 201.

### **N**

- Nicolae-Maranciuc, A., Chicea, D., & Chicea, L. M. (2022). Ag nanoparticles for biomedical applications—Synthesis and characterization—A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5778.

### **O**

- Obeizi, Z., Benbouzid, H., & Djahoudi, A. (2021). Évaluation de l'activité antibactérienne et anti-biofilm des nanoparticules de dioxyde d'étain (SnO<sub>2</sub>).

**P**

- Pantel, A. (2015). *Multirésistance des entérobactéries aux antibiotiques et modulation de l'influx et de l'efflux membranaires chez Escherichia coli ST131* (Médecine humaine et pathologie, Université Montpellier). Français. ffNNT : 2015MONTT038ff. fftel-01346531f
- Parida, U. K., Nayak, A. K., Binhani, B. K., & Nayak, P. L. (2011). Synthesis and characterization of chitosan-polyvinyl alcohol blended with cloisite 30B for controlled release of the anticancer drug curcumin. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2(04), 414.
- Peiris, M. K., Gunasekara, C. P., Jayaweera, P. M., Arachchi, N. D., & Fernando, N. (2017). Biosynthesized silver nanoparticles: are they effective antimicrobials?. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112, 537-543.
- Pereira, R., Santos Fontenelle, R. O., Brito, E. H. S., & Morais, S. M. (2020). Biofilm of *Candida albicans* : formation, regulation and resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 131(1), 11–22. <https://doi.org/10.1111/jam.14949>
- Pin, C., Peter-Riesch, B., & Philippe, J. (2003). Évaluation et prise en charge du pied diabétique. *Revue Médicale Suisse*, 1(2440).
- Powlson, A. S., & Coll, A. P. (2010). The treatment of diabetic foot infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(suppl\_3), iii3-iii9.
- Prabhu, S., & Poulouse, E. K. (2012). Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2, 1-10. <https://doi.org/10.1186/2228-5326-2-32>
- Pranata, S., Wu, S. F. V., Alizargar, J., Liu, J. H., Liang, S. Y., & Lu, Y. Y. (2021). Precision health care elements, definitions, and strategies for patients with diabetes: A literature review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(12). MDPI.



**R**

- Rafique, M., Sadaf, I., Rafique, M. S., & Tahir, M. B. (2017). A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(7), 1272-1291.
- Rai, M., Kon, K., Gade, A., Ingle, A., Nagaonkar, D., Paralikar, P., & da Silva, S. S. (2016). Antibiotic Resistance. In *Antibiotic Resistance* (pp. 121–143). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803642-6.00006-x>
- Raj Sah, & Venkatasubbu. (2024). Inhibition de la chaîne respiratoire et peroxydation lipidique par des nanosphères de carbone dans la gestion de l'infection du pied diabétique. *Journal of Nanomaterials and Chemistry*.
- Richard, C. (1979). Les Limites d'Utilisation des Systèmes prêts à l'emploi. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 9(9), 484-489.
- Robert, J.-C. (2012). Module - Bactériologie [Support pédagogique]. Faculté d'odontologie de Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2017). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*.
- Roux, A., & Ghigo, J. M. (2006). Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 159(3), 261-268.

**S**

- Salem, S. S., & Fouda, A. (2020). Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Prospective Biotechnological Applications: an Overview. *Biological Trace Element Research*, 199(1), 344–370. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02138-3>
- Sarathi Kannan, D., Mahboob, S., Al-Ghanim, K. A., & Venkatachalam, P. (2020). Antibacterial, antibiofilm and photocatalytic activities of biogenic silver nanoparticles from *Ludwigia octovalvis*. *Journal of Cluster Science*, 32(2), 255–264. <https://doi.org/10.1007/s10876-020-01784-w>
- Saravanan, M., Barik, S. K., MubarakAli, D., Prakash, P., & Pugazhendhi, A. (2018). Synthesis of silver nanoparticles from *Bacillus brevis* (NCIM 2533) and their antibacterial activity against pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 116, 221-226.
- Serrudo, V. R., Saurral, R., Pool, R., Kruler, A., Sanchez, N., & Carrio, L. M. (2024). Cicatrisation avancée d'une plaie chez un patient présentant une amputation transmétatarsienne causée par une infection grave du pied diabétique : un rapport de cas. *Rapports de cas du Journal international de chirurgie*, 115, 109180.

- Sharma, V. K., Khadka, P. B., Joshi, A., & Sharma, R. (2006). Agents pathogènes courants isolés dans une infection du pied diabétique à l'hôpital Bir. *Journal médical de l'Université de Katmandou (KUMJ)*, 4(3), 295-301.
- Société Marocaine d'Infectiologie et de Vaccinologie (SMIV). (2017). Guide pratique des bactéries pathogènes (Édition 2017, 92 pages).
- Stahl, J. P., & Louis, B. (2007). *Médecine et maladies infectieuses : Recommandations pour la pratique clinique - Prise en charge du pied diabétique infecté*. Elsevier Masson. Récupéré sur <http://france.elsevier.com/direct/MEDMAL>
- Stoodley, P., Boyle, J. D., Dodds, I., & Lappin-Scott, H. M. (1997). Consensus model of biofilm structure.
- Sulmon, E. (2020). Prévention des ulcères podaux liés au pied diabétique : revue systématique de la littérature (Thèse de maîtrise, Faculté de santé publique, Université catholique de Louvain). Henrard, S. (Directrice de thèse). <http://hdl.handle.net/2078.1/thesis:25524>

### T

- Tan, L. V., Tran, T., & Thi, V. D. (2021). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Bacillus licheniformis* TT01 isolated from quail manure collected in Vietnam. *Processes*, 9(4), 584. <https://doi.org/10.3390/pr9040584>
- Tilahun, M., Gedefie, A., Demsis, W., Ashagrie, M., Kassa, Y., Tesfaye, M., Bisetegn, H., & Sahle, Z. (2021). Acinetobacter baumannii biofilm formation and its role in disease pathogenesis: A review. *Infection and Drug Resistance*, 14, 1687-1699. <https://doi.org/10.2147/IDR.S332051>
- Tramunt, B., & Durlach, V. (2023). Sevrage tabagique et diabète : quels bénéfices pour quels risques ? *Médecine des Maladies Métaboliques*, 17(2), 125-131.
- Tran, Q. H., & Le, A. T. (2013). Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 4(3), 033001.
- Tsiry Rasamiravaka, Q., Labtani, Q., Duez, P., & El Jaziri, M. (2015). La formation de biofilms par *Pseudomonas aeruginosa* : une revue des composés naturels et synthétiques interférant avec les mécanismes de contrôle. *BioMed Research International*, 2015(Article ID 759348), 17 pages. APA Style.

- Turhan, V., Mutluoglu, M., Acar, A., Hatipoglu, M., Onem, Y., Uzun, G., ... & Gorenek, L. (2013). Increasing incidence of Gram-negative organisms in bacterial agents isolated from diabetic foot ulcers. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 7(10), 707-712.

### Y

- Verdier Isabelle, Gérard Lina, Yves Gillet et François Vandenesch. (2015). Cour les Cocci à Gram positif *Staphylococcus aureus* [en ligne].
- VIDAL. (2024). Diabète de Type 1 - Symptômes, Causes, Traitements et Prévention. Consulté le 29 avril 2024, sur <https://www.vidal.fr/maladies/metabolisme-diabete/diabete-type-1.html>

### Y

- Yahia-Berrouiguet, A. (2008). P109 Les plaies du pied chez le diabétique : Épidémiologie et prise en charge au CHU Tlemcen. *Diabetes & Metabolism*, 34, H74. doi:10.1016/s1262-3636(08)73021-0.

### Z

- Zemmouri, A., Tarchouli, M., Benbouha, A., Lamkinsi, T., Bensghir, M., Elouennass, M., & Haimeur, C. (2015). Profil bactériologique du pied diabétique et son impact sur le choix des antibiotiques. *Pan African Medical Journal*, 20. <https://doi.org/10.11604/pamj.2015.20.148.585>
- Zivkovic Zaric, R. (2023). Antimicrobial treatment of *Serratia marcescens* invasive infections: Systematic review. *Antibiotics*, 12(2), 367. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020367>
- Zubair, M., Husain, F. M., Al-Amri, M., Hasan, I., Hassan, I., Albalawi, T., ... Al-Anazi, A. B. (2024). In vitro inhibition of biofilm and virulence factor production in azole-resistant strains of *Candida albicans* isolated from diabetic foot by *Artemisia vulgaris* stabilized tin (IV) oxide nanoparticles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1322778.

# **Annexes**

Annexe 01 : Les pieds diabétiques des patients prélevés.



**Annexe 02 : Milieux de culture**

- **Bouillon cœur-cervele (BHIB) :**

- Infusion de cervelle de veau ...12.5g
- Infusion de cœur de bœuf .....5.0g
- Peptone.....10.0g
- Glucose.....2.0g
- Chlorure de sodium.....2.0g
- Phosphatase di sodique.....5g



- **Milieu MacConkey :**

- Peptone de caséine.....17g
- Peptone de viande.....03g
- Sels biliaries.....1.5g
- Cristal violet.....0,001g
- Lactose.....10g



- **Gélose Cétrimide :**

- Peptone de gélatine. ....16.0 g
- Peptone de caséine. ....10.0 g
- Bromure de tétradonium (cétrimide). ...0.2 g
- Acide nalidixique.....15.0 mg
- Sulfate de potassium.....10.0 g
- Chlorure de magnésium.....1.4 g
- Agar.....10.0 g



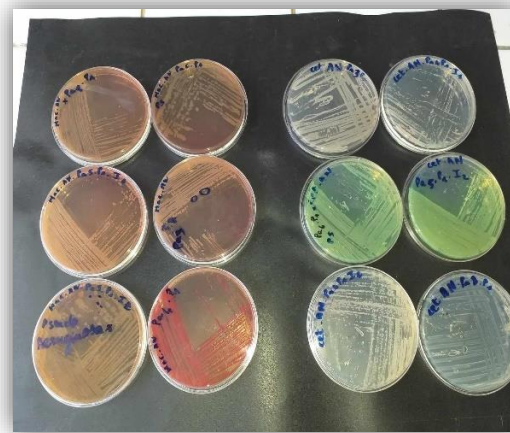
- **Milieu Chapman :**

- Extrait de viande de bœuf .....1.00 g
- Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin).....10g
- Chlorure de sodium..... 75.00 g
- Mannitol .....10.00 g
- Rouge de phénol .....0.025 g
- Agar..... 15.00 g



- **Gélose Nutritive :**
- Extrait de viande .....3g
- Gélatine peptone..... 5g
- Agar .....15g

**Annexe 03 :** Aspect des colonies de certaines souches isolées sur les différents milieux gélosés.



**Annexe 04 :** Lecture des galeries API 20<sup>E</sup> et API Staph.

Microbe	Substrat :	Caractère recherché	Révélateur	Lecture directe ou indirecte Test (si nécessaire)	Résultat -	Résultat +
ONPG	ONPG = Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	Béta galactosidase		Lecture directe		
ADH LDC DDC	Arginine Lysine Ornithine	Arginine Dihydrolase Lysine Decarboxylase Ornithine Decarboxylase	Rouge de phénol	Lecture directe		
[CIT]	Citrate	Utilisation du citrate	BBT	Lecture directe		
H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S	Fe III	Lecture directe		
URÉ	Urée	Uréase	Rouge de Phénol	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane oésaminase		Lecture indirecte		
IND	Tryptophane	Tryptophanase ou production d'indole		Lecture indirecte		
[VP]	Pyruvate de sodium	production d'acétoïne (3-hydroxybutanone)		Lecture indirecte		
[GEL]	Gélatine	gélatinase	Particules de charbon	Lecture directe		
GLU à ARA = zymogramme	Substrat carboné (glucide)	Utilisation de substrats carbonés (glucides)	BBT	Lecture directe		
NO <sub>2</sub> / N <sub>2</sub>	Nitrate (NO <sub>3</sub> )	Nitrate réductase		Lecture indirecte		

API STAPH	V4.1	GLU	FRU	MNE	HAL	LAC	TRE	MAN	ALT	MEL	NIT	PAL	VP	RAT	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR
Staphylococcus aureus	0	100	100	95	96	88	91	80	0	0	83	97	76	1	0	97	82	90	80	80	0
Staphylococcus aureus	0	100	99	96	72	10	90	9	0	0	81	0	1	0	0	40	0	15	90	1	0
Staphylococcus aureus	0	100	99	85	63	22	2	36	0	0	86	23	90	0	0	59	0	1	85	35	0
Staphylococcus aureus	0	100	99	100	75	74	10	0	0	0	99	95	99	0	0	0	0	1	99	60	0
Staphylococcus aureus	0	100	100	99	99	99	99	0	0	0	99	83	83	0	0	0	0	100	100	0	0
Staphylococcus aureus	0	100	100	99	79	100	100	100	0	0	96	96	1	0	1	100	0	28	99	95	0
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Staphylococcus aureus	0	100	99	99	99</																

**Annexe 05 : Conservation des souches bactériennes isolées.**



**Gélose nutritive inclinée**



**Le glycerol**

**Annexe 06 : Formation de biofilm sur microplaque de 96 puits**



**Annexe 07 : Nanoparticules d'argent**

