



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEM
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de
l'Univers

Département de biologie

Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au
biomédical et à l'environnement
« LAMAABE »

Mémoire de Master Présenté par

Melle BENSABA Amel

Melle BOUALI Manal

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Filière : Sciences biologiques

Option : Microbiologie Fondamentale

Intitulé du thème

Implication du biofilm dans les infections du pieds diabétiques

Soutenue le 25 juin 2023, devant le jury composé de

Présidente	HASSAINE Hafida	Professeur	Université de Tlemcen
Examinatrice	BELLIFA Samia	Maître de conférences A	Université de Tlemcen
Encadreur	KARA TERKI Ibtissem	Maître de conférences A	Université de Tlemcen

Année Universitaire : 2022-2023

Remerciement

*A notre présidente de thèse
Mme H. Hassaine Professeur à l'université de Tlemcen.*

*Nous avons eu le privilège de travailler parmi votre équipe et d'apprécier
vos qualités et vos valeurs.
Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir nous ont énormément marqués.
Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration
pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.
Ce travail est pour nous l'occasion de vous témoigner notre profonde gratitude.*

*A notre maître et Encadreur de Mémoire
Mme Kara Terki I. maitre de
conférences A.*

*Vous avez bien voulu nous confier ce travail riche d'intérêt et nous guider à chaque
étape de sa réalisation.
Vous nous avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos obligations professionnelles.
Vos encouragements inlassables, votre amabilité, votre gentillesse méritent toute admiration.
Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre profonde gratitude
tout en vous témoignant notre respect.*

*A notre maître et juge de Mémoire
Mme Bellifa S. maitre de conférences A.*

*Vous nous faites l'honneur d'accepter avec une très grande amabilité de siéger parmi
notre jury de Mémoire.
Veuillez accepter ce travail maître, en gage de notre grand respect et notre
profonde reconnaissance.*

Merci



Dédicace

Je remercie tout d'abord Dieu tout puissant de m'avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce modeste travail. Je tiens c'est avec immense plaisir que je dédie à:

A l'être la plus chère a ma vie ma mère

Quoi que je fasse ou que je die, je ne saurai point te remercie comme il se doit, ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés à toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles. Ton amour et ta gentillesse ont conquis nos cœurs, tu es mon modèle à suivre

A mon très cher père

*Qui a semé en moi le respect et l'amour de la science
Grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité
Tu es le meilleur Papa qui a toujours fait de ton mieux avec nous.*

Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que vous avez déployés pour mon éducation et ma formation. Vous êtes les plus chers à mon cœur

A ma grand-mère la plus belle et la plus douce kheira

*Ceci est à profonde gratitude pour votre éternel amour. Que ce rapport soit le meilleur cadeau que je puisse t'offrir.
Que Dieu le tout puissant la protège et lui donne une longue et joyeuse vie.*

A mes sœurs adorées Merieme, Leila, Sihem, Hanane et Fatima

Un signe d'amour et de reconnaissance pour ses soutiens morale, leurs conseils précieux tout au long de mes études et les sacrifices dont vous avez fait preuve à mon égard.

Que Dieu les protège et leurs offres la chance, la réussite et le bonheur.

A mon cousin Abedlwahed, et mes cousines Fatima, Anfel, Asmae, Alaa, Hadjer

Merci à tous pour vos encouragements et votre soutien

Son oublier ma binôme Manal, pour son soutien moral, sa sympathie, sa compréhension tout

au long de ce projet dont laquelle j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec elle. Nous avons formé une belle équipe MANO. Je te souhaite plein d'autres réussites et beaucoup de bonheur

« En vérité, le chemin importe peu, la volonté d'arriver suffit à tout.

»Albert Camus

Amel

Dédicace

Avec l'aide d'Allah le tout puissant et miséricordieux qui m'a donné la force et la patience J'ai pu accomplir cet humble travail que je dédie à:

A mon cher papa, Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta disponibilité, tes sacrifices illimités, ton soutien moral et financier ne m'ont pas manqué durant ces longues années d'étude. Tout ça est grâce à toi et à tout ce que tu as déployé pour mon éducation et ma formation.

A ma très chère maman, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence je te remercie pour ton soutien permanent, ta compréhension, tes sacrifices tes prières et pour toute la confiance que tu m'as accordé afin de me motiver dans mes études et me voir satisfaite et heureuse. Je n'aurai jamais réussi sans toi.

Sources de mes joies, secrets de ma force, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être, j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Je vous aime.

A ma sœur Fatïha et mon frère Youcef El Mahdi, qui n'ont omis aucun refus à me porter aide et assistance. Je vous remercie pour tout votre appui et votre encouragement ce travail n'aurait pas pu être sans votre aide, en témoignage de mon affection fraternelle merci d'être toujours là pour moi.

A mon binôme : qui a partagé les efforts et s'est investi autant que moi pour donner le meilleur de nous-même, je tiens surtout à la remercier pour sa patience, sa compréhension et sa tolérance lors de nos moments de fatigues, ton soutien moral m'a été d'une grande importance, je suis fière de nous et de tout ce qu'on a accompli cela n'a pas été facile mais on est arrivée. Merci Amoul je te souhaite beaucoup de succès.

Enfin, j'adresse mes chaleureux remerciements à tout les membres de ma famille, mes amies, et à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail.

Manal

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	8
LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES TABLEAUX	12
INTRODUCTION GENERALE	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
CHAPITRE I : LE PIED DIABETIQUE	4
1. Définition du pied diabétique	5
2. Epidémiologie	5
3. Physiopathologie des lésions du pied diabétique	6
3.1. La neuropathie :.....	6
3.1.1. Complications de la neuropathie :.....	8
3.2. L'artériopathie des membres inférieurs.....	10
3.2.1. Complication de L'artériopathie :.....	11
3.3. Infection.....	11
4. Facteurs de risques du pied diabétique	14
5. Agents causaux de l'infection du pied diabétique	15
CHAPITRE II : PLAIE CHRONIQUE ET BIOFILM	17
1. Implication des biofilms dans les plaies chroniques sur pied diabétique	18
2. Etapes de la formation du biofilm	19
2.1. Adhésion réversible.....	20
2.2. Adhésion irréversible.....	21
2.3. Formation de micro-colonies.....	21
2.4. Maturation du biofilm.....	21
2.5. Dispersion et détachement cellulaire.....	21
3. Impact du biofilm sur les plaies	22
CHAPITRE III :	24
TRAITEMENT DES PIEDS DIABETIQUES INFECTEES	24
1. Traitement du pied diabétique par antibiothérapie	25
2. Traitement par phytothérapie	26
2.1. <i>Lavandula stoechas</i> L.....	26
2.1.1 Répartition géographique.....	27
2.1.2. Usages thérapeutiques.....	29

2.2. <i>Laurus nobilis</i> L.....	30
2.2.1. Répartition géographique.....	31
2.2.2. Usages thérapeutiques.....	32
MATERIEL ET METHODES	33
1. Le lieu et période d'étude	34
2. Population d'étude	34
3. Prélèvements	34
3.1. Traitement des échantillons	35
4. Isolement et purification des bactéries	36
5. Identification des bactéries	37
5.1. Examen macroscopique.....	37
5.2. Examen microscopique.....	37
5.3. Identification biochimique.....	37
5.3.1 Test catalase	37
5.3.2 Test coagulase	37
5.4. Recherche des caractères biochimiques par galerie Api Staph et Api20 NE.....	38
6. Conservation des souches	39
7. Evaluation de la formation du biofilm <i>in vitro</i>	40
7.1. Détection de la production de slime sur milieu Rouge Congo Agar (RCA)	40
7.2. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP).....	40
8. Étude de l'activité antimicrobienne de <i>Lavandula stoechas</i> et <i>Laurus nobilis</i> sur les souches planctoniques	42
9. Étude de l'activité antibiofilm de <i>Lavandula stoechas</i> et de <i>Laurus nobilis</i> sur plaques TCP.....	45
RESULTATS ET DISCUSSION	46
1. Résultats des prélèvements	47
2. Résultat de l'analyse bactériologique des prélèvements.....	48
2.1 Caractère phénotypique des souches isolées	48
2.2. Répartition des souches	50
2.2.1. Test de catalase.....	50
2.2.3. Test de coagulase	50
2.2.1. Galerie Api Staph et Api 20NE.....	51
3. Résultats de l'évaluation de la formation du biofilm <i>in vitro</i>	53

3.1. La détection de la formation de biofilms par la méthode de Rouge Congo Agar (RCA)	53
3.2. Formation de biofilms en microplaques TCP	55
4. Comparaison entre l'adhésion des <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par la technique TCP et RCA	58
5. Evaluation de l'activité antibactérien des deux huiles essentielles de <i>Lavandula stoechas</i> et <i>Laurus nobilis</i>	59
6. Résultats de l'activité antibiofilm	64
CONCLUSION	68
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	71
ANNEXE	90

Liste des abréviations

A

- **API** : Adhésine Polysaccharide Intercellulaire.
- **ATB** : Antibiotique.
- **ATB** : Antibiothérapie.
- **ATCC** : American Type Culture Collection.

B

- **BGN** : Bacille Gram Négatif.
- **BGP** : Bacterie Gram Positif.
- **BHIB** : Brain Heart Infusion Broth.
- **BMR** : Bactéries Multi Résistantes.

C

- **CGP** : Cocci Gram Positif.
- **CHU** : Centre Hospitalier Universitaire.
- **CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice.
- **CV** : Cristal Violet.

D

- **DO** : Densité Optique.
- **DT1** : Diabète de Type 1.
- **DT2** : Diabète de Type 2.

E

- ***E. coli*** : *Escherichia coli*.
- ***E. faecalis*** : *Enterococcus faecalis*.
- **EPS** : Extracellular Polymeric Substances.

F

- **F** : Femme.

G

- **G-** : Gram Négatif.
- **G+** : Gram Positif.

H

- **H** : Homme
- **HE** : Huile Eessentielle.

I

- **Ica** : Inter Cellular Adhesion.
- **IDSA** : Infectious Diseases Society of America.
- **IIO** : Itertrigo Interorteil
- **IWGDF** : International Working Group on the Diabetic Foot.

K

- ***K.pneumoniae*** : *Klebseilla pneumoniae*.
- **KD** : Kilodaltons.

L

- **L.nobilus** : *Laurus nobilis*.
- **L.nob.S** : *Laurus nobilis* de Sousse.
- **L.stoechas L** : *Lavandula stoechas* L.
- **L'ED** : L'eau distillée.
- **LPS** : Lipopolysaccharide.

M

- **M.luteus** : *Micrococcus luteus*.
- **MH** : Muller-Hinton
- **MPP** : Mal Perforant Plantaire.

O

P

- **OAN** : Ostéo-arthropathie neurogène
- **P.aeruginosa** : *Pseudomonas aeruginosa*.
- **PIA** : Polysaccharide Intercellular Adhesion.
- **pH** : Potentiel Hydrogène.

Q

R

- **QS** : Sonde A Demeure.
- **RCA** : Rouge Congo Agar.

S

- **S.aureus** : *Staphylococcus aureus*.
- **SCN** : Staphylocoques à Coagulase Négative.
- **S. epidermidis** : *Staphylococcus epidermidis*.

T

U

- **TCP** : Plaque de Culture de Tissus.
- **UFC** : Unité Formant Colonie.
- **UPD** : Ulcères du Pied Diabétique.

Liste des Figures

Figure 1 : Mal perforant plantaire.	8
Figure 2 : Physiopathologie du MPP	9
Figure 3 : Aspect clinique du pied de Charcot à la phase aigüe (9A) et à la phase chronique (9B).....	10
Figure 4 : Pied diabétique infecté	13
Figure 5 : Physiopathologie du pied diabétique	14
Figure 6 : Observation d'un biofilm bactérien sur une plaie.....	19
Figure 7 : les étapes du processus de formation du biofilm, y compris l'imagerie de chaque étape au microscope électronique à balayage	20
Figure 8 : Fleurs de lavande papillon	27
Figure 9 : Huile essentielle de lavande papillon.....	27
Figure 10 : Répartition géographique de <i>Lavandula stoechas</i> L. dans le monde.....	27
Figure 11 : Répartition géographiques de <i>Lavandula stoechas</i> L. en Algérie.....	29
Figure 12 : <i>Laurus nobilis</i> L. (laurier Noble).....	31
Figure 13 : Localisation naturelle de <i>Laurus nobilis</i> L. à travers le monde.....	31
Figure 14 : Prélèvements des plaies infectées.	35
Figure 15 : Prélèvement d'une plaie infectée dans un bouillon d'enrichissement BHIB.	35
Figure 16 : Plaque de la galerie API Staph.....	38
Figure 17 : Plaque de la galerie API 20 NE.....	38
Figure 18 : Conservation des souches dans la gélose nutritive.	39
Figure 19 : Aspect des colonies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur gélose Cétrimide	49
Figure 20 : Aspect des colonies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur gélose Mac Conkey	49
Figure 21 : Résultat de la recherche des enzymes respiratoires.	50
Figure 22 : Identification de <i>Staphylococcus aureus</i> par la galerie Api Staph (biotype 731646).	51
Figure 23 : Identification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par la galerie Api 20NE (biotype 1054571).....	51
Figure 24 : Répartition des souches bactériennes isolées des pieds diabétiques.....	52
Figure 25 : Détection de la production de slime et formation de biofilm sur RCA.	54
Figure 26 : Résultats d'évaluation de la formation du biofilm par la méthode TCP.	55

Figure 27 : Quantification de la formation de biofilm par les Staphylocoques et les Pseudomonas en microplaques à 37°C.....	56
Figure 28 : Comparaison des résultats de la formation du biofilm entre les Staphylocoques et les Pseudomonas.	58
Figure 29 : Photographies correspondants aux résultats de l'activité antibactérienne des HEs <i>Lavandula .stoechas</i> et <i>Laurus .nobilis</i>	64
Figure 30 : Résultat de l'activité antibiofilm de <i>Lavandula stoechas</i> et <i>Laurus nobilis</i> sur les souches <i>S. aureus</i> et <i>P. aeruginosa</i> avant et après l'ajout des HEs.	65

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Corrélation clinico- biologique entre les types de plaies et les germes impliqués et identifiés	16
Tableau 2 : Caractéristique des souches de référence utilisées	42
Tableau 3 : Caractéristiques des 12 patients de notre étude.	47
Tableau 4 : Résultats de la production de slime par la méthode RCA.	53
Tableau 5 : Résultats de la production de biofilm par la méthode TCP.	55
Tableau 6 : Comparaison entre l'adhésion de la formation de biofilm sur RCA et TCP	58
Tableau 7 : Résultats du test de sensibilité des souches de références à l'HE de <i>Lavandula stoechas</i> et <i>Laurus nobilus</i> et catégorie d'inhibition (méthodes des puits).....	60
Tableau 8 : Résultats du test de sensibilité des autres souches à les HEs de <i>Lavandula stoechas</i> et <i>Laurus nobilus</i> et catégorie d'inhibition (méthodes des puits)	61
Tableau 9 : Souches bactériennes utilisées.....	65



Introduction générale

Depuis les années quatre-vingt (80), notre pays connaît une transition sanitaire caractérisée par l'émergence et la prolifération des maladies chroniques dû à l'allongement de l'espérance de vie, l'amélioration du niveau de vie de la population et des changements dans le mode de vie (**Azri, 2018**).

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

D'une manière progressive, cette maladie peut endommager le cœur, les vaisseaux sanguins, les yeux, les reins et les nerfs, combinée à une circulation sanguine réduite elle provoque aussi une neuropathie des pieds et augmente le risque d'ulcères du pied et d'amputation (**OMS, 2020**).

Les plaies chroniques sont un environnement idéal pour la formation de biofilm microbien .

En effet, la présence de biofilm retarde le processus de cicatrisation et majore le risque d'infections. 78 % de toutes les plaies chroniques non cicatrisantes sont du a un biofilm résistant aux antibiotiques et aux défenses immunitaires (**Zhao et al., 2013**) ; (**Malone et al., 2017**).

L'échec thérapeutique, et les coûts de plus en plus élevés des traitements des infections dues aux biofilms, appellent à trouver en urgence d'autres alternatives de soins (**Toty et al., 2013**). De ce fait, le recours à la phytothérapie devient de plus en plus intéressant en raison de la richesse des plantes possédant un pouvoir antibactérien, et anti-biofilm remarquable (**Atefbeibu, 2002**).

De ce fait, l'objectif de ce travail est de :

- Isoler les souches des plaies chroniques du pied diabétique des patients consultants ou hospitalisés au service de médecine interne CHU de Tlemcen.
- Évaluer la capacité des souches isolées de pied diabétique à former un biofilm *in vitro* par méthodes TCP et RCA.
- Tester le pouvoir antimicrobien et antibiofilm de deux plantes médicinales : *Laurus nobilis* et *Lavandula stoechas* sur les souches isolées.



Synthèse bibliographique



Chapitre I : Le pied diabétique

1. Définition du pied diabétique

Le pied diabétique se définit par l'ensemble des lésions cutanées et ostéo-articulaires localisées au départ au niveau du pied chez le sujet diabétique. En effet, le pied est une région à haut risque chez le diabétique, en raison des atteintes vasculaires, neurologiques et infectieuses qui affectent particulièrement les extrémités distales des membres inférieurs (**Ait Lhaj Ou Said, 2014**).

On regroupe sous le terme « pied diabétique » l'ensemble des manifestations pathologiques atteignant le pied et directement en rapport avec la maladie diabétique sous-jacente (**El Ouarradi, 2019**).

Selon le consensus international sur le pied diabétique développé par l'IWGDF (*International Working Group on Diabetic Foot*) de 2007, le pied diabétique se définit comme étant « *Toute Infection, ulcération ou destruction des tissus profonds du pied, associées à une neuropathie et/ou une artériopathie périphérique des membres inférieurs chez le diabétique* » (**El Ouarradi, 2019**).

2. Epidémiologie

L'ulcération et l'infection du pied diabétique constituent un problème majeur sur le plan médical, social et économique, mais aussi en termes de coût pour la santé publique, ainsi que son importance par sa morbi-mortalité majeure, le développement de cette infection du pied diabétique évolue la pathologie vers le risque d'amputation (**Gadepalli et al., 2006**).

Ces ulcères du pied sont plus répandus dans les pays occidentaux (**Roeckl-Wiedmann et al., 2005**). En terme classique, il est observé que 15 % des patients atteints de diabète souffriront d'une ulcération à un moment donné de leur vie. Toutefois par rapport à une population non diabétique, le diabète est un facteur aggravant qui multiplie le taux d'ulcération par 5 et le taux d'amputation par 7 (**Martini et Senneville, 2018**).

D'après plusieurs études, il a été constaté qu'environ 25 à 50% des patients diabétiques subissent une amputation immédiate lors de leur première consultation en raison d'une infection. En général, il est estimé que le diabète est responsable d'environ 50 à 70 % de toutes les amputations de membres inférieurs (**Leone et al., 2012**).

L'incidence du pied diabétique est en constate augmentation en raison de la prévalence mondiale croissante du diabète sucré ainsi que l'augmentation de l'espérance de vie des patients diabétiques. Les données montrent qu'au niveau mondial, la prévalence de l'ulcère du pied était

de 6,3%, avec une incidence plus élevée chez les hommes (4,5%) que chez les femmes (3,5%) et chez les diabétiques de type 2 (6,4%) par rapport aux diabétiques de type 1 (5,5%) (**Zhang et al., 2017**).

En termes de prévalence, l'Amérique du nord a enregistré le taux le plus élevé à 13,0% tandis que l'Océanie le taux le plus faible à 3,0%. Pour leur part, l'Asie, l'Europe et l'Afrique ont respectivement enregistré des taux de 5,5 %, 5,1% et 7,2%. L'Australie a le plus bas (1,5%) et la Belgique a la prévalence la plus élevée (16,6%), suivie par le Canada (14,8%) et USA (13,0%) (**Zhang et al., 2017**).

Comme dans la plupart des pays en développement, l'Algérie traverse actuellement une période de transition épidémiologique. D'après les spécialistes des maladies non transmissibles du ministère de la santé, il est constaté que 50% des individus atteints de diabète souffraient de neuropathie diabétique et de lésions des membres inférieurs. De plus, environ 25% des cas d'arthrite des membres inférieurs sont liés au diabète, et un quart de ces cas nécessitent une amputation. On estime que le nombre d'amputations annuelles associées à ces cas varie entre 800 et 1300 (**Lamri et al., 2014**).

3. Physiopathologie des lésions du pied diabétique

Les troubles trophiques du pied diabétique résultent de trois processus physiopathologiques :

- la neuropathie périphérique.
- l'artériopathie des membres inférieurs.
- l'infection (**Maroselli, 2002**).

La neuropathie périphérique et l'artériopathie des membres inférieurs sont deux complications du diabète. L'infection est un phénomène qui peut s'y rajouter. L'intervention de ces trois mécanismes est variable mais ils sont souvent intriqués (**Maroselli, 2002**).

3.1. La neuropathie :

La neuropathie périphérique est une complication fréquente du diabète responsable de 60 à 80 % des ulcères. Elle est plus courante dans le DT1 que dans le DT2, et la présence d'une neuropathie augmente avec la durée du diabète, l'âge du patient, et surtout avec un déséquilibre métabolique. D'autres facteurs tels que la prédisposition génétique, la grande taille, le sexe masculin et l'alcoolisme peuvent également contribuer au développement de la neuropathie.

Les neuropathies sont différenciées en fonction des nerfs qu'elles affectent. Elles sont divisées en trois types : sensitive, motrice et végétative (**Malgrange, 2008**).

La neuropathie sensitive : est l'atteinte la plus fréquente, avec des signes qui varient selon le type des nerfs impliqués. L'atteinte des grosses fibres entraîne une perte de sensibilité tactile et profonde (vibratoire et proprioceptive), quant à l'atteinte des petites fibres concernent la sensibilité thermo-algique (**Besse, 2011**), le pied est donc insensible aux traumatismes minimes notamment causés par friction ou par chaussures serrées et aux changements de température. Ce phénomène est aussi à l'origine d'un retard de consultation. Une atteinte de la sensibilité profonde occasionne, des troubles de la marche et conduit à long terme à des déformations (**Ahmad, 2016**).

La neuropathie motrice : provoque une faiblesse et une atrophie des muscles interosseux du pied, créant un déséquilibre entre les muscles extenseurs et fléchisseurs, ainsi que des modifications de la laxité ligamentaire, entraînant des déformations du pied exacerbées par une mobilité articulaire limitée (**Dinh, 2005**). Ces déformations créant de nouvelles zones d'hyperappui et exposant le site hyperkératosique à un traumatisme minime, favorisant ainsi le développement d'un évasement cutané et d'une douleur de perforation plantaire. En outre il peut provoquer une raideur et une perte de mobilité articulaire secondaire à la fibrose du cartilage, des tissus mous et de la peau due à la glycosylation du tissu conjonctif (**Ahmad, 2016**).

La neuropathie végétative : également connue sous le nom de neuropathie autonome, affecte le système nerveux autonome. Ces nerfs contrôlent des fonctions biologiques telles que la thermorégulation et la transpiration (la sudation). Une transpiration réduite ou inexistante (anhidrose) signifie moins d'humidité, entraînant une sécheresse et des fissures qui peuvent se transformer en UPD, et des callosités. La neuropathie autonome peut également entraîner un dysfonctionnement des mécanismes de régulation sanguine. Elle provoque également l'ouverture du shunt artério-veineux et entraîne une diminution locale du flux sanguin capillaire (**Lushiku, 2006**). En conséquence, pied fébrile neurogène, parfois œdème et veines dorsales dilatées (**Dinh, 2005**). Ces shunts sont également impliqués dans la réduction de l'oxygénation des tissus et la promotion de la résorption osseuse, ce qui peut conduire à des conditions extrêmes dans les pieds de Charcot (**Malgrange, 2008**).

3.1.1. Complications de la neuropathie :

➤ Mal perforant plantaire

C'est la manifestation la plus fréquente de la neuropathie du pied diabétique, il s'agit d'une ulcération indolore entourée d'une zone d'hyperkératose, caractérisée par la perte de sensation douloureuse et les modifications des pressions statiques et dynamiques, elle provoque un épaissement de la couche cornée, zone d'hyperkératose localisée aux points de pression excessifs. Cette hyperkératose est soumise à des contraintes de cisaillement sur les structures osseuses sous-jacentes aboutissant à la formation d'une vacuole qui va progressivement se fistuliser à la peau, responsable d'une ulcération, le mal perforant (**Amarir, 2014**).

L'évolution secondaire peut se compliquer d'infection puis d'extension en profondeur avec risque d'atteinte osseuse à type d'ostéite ou d'ostéo- arthrite. La précocité de l'ablation des zones d'hyperkératose et de la mise en décharge des zones d'hyper appui pourrait éviter la survenue d'ulcérations et permettre la cicatrisation rapide des ulcérations constituées. L'infection et l'association à une ischémie sont des facteurs qui vont considérablement aggraver le pronostic de ces lésions (**Amarir, 2014**).



Figure 1 : Mal perforant plantaire (**Kone, 2021**).



Figure 2 : Physiopathologie du MPP (El Ouarradi, 2019).

➤ Ostéo-arthropathie neurogène (Pied de Charcot)

OAN ou le pied de Charcot est une complication rare mais extrêmement grave de la neuropathie diabétique, conduisant à des déformations architecturales catastrophiques du pied responsables d'une instabilité ostéo-articulaire majeure pouvant parfois conduire à l'amputation.

Il s'agit d'une atteinte hautement destructrice et fréquemment indolore. Elle touche une ou plusieurs articulations du pied et évolue en deux phases successives :

La phase initiale aiguë : est caractérisée par des signes inflammatoires locaux (rougeur, chaleur et œdème) en rapport avec une lyse ostéo-articulaire responsable de fractures et de sublaxations.

La phase chronique : survient quelques mois plus tard, après disparition des signes inflammatoires, associant reconstruction osseuse anarchique et consolidation avec des séquelles anatomiques parfois majeures (effondrement de l'arche plantaire, raccourcissement antéropostérieur, déformations anarchiques) pouvant aboutir au classique « pied cubique » et au « pied en tampon buvard » avec convexité de l'arche plantaire (Jeffcoate, 2005).



Figure 3 : Aspect clinique du pied de Charcot à la phase aiguë (9A) et à la phase chronique (9B) (Julien, 2020).

3.2. L'artériopathie des membres inférieurs

L'artériopathie des membres inférieurs est plus courante et de localisation plus diffuse et plus distale que celle observée chez le non diabétique. L'évolution de l'artériopathie est fortement grave et généralement sans sensation de douleur à cause de sa relation fréquente avec la neuropathie. Elle peut être détectée par la présence d'un trouble trophique (Grumbach et Richard, 2005).

Elle se définit par des lésions sténosantes ou occlusives dues à un athérome et affectant les artères des membres inférieurs, il existe deux types d'artériopathie (El Allali, 2015) :

Macro-angiopathie : Ce n'est pas une complication spécifique du diabète mais elle a des caractéristiques propres. Le développement de lésions athéromateuses est plus précoce, plus rapide, avec classiquement une atteinte plurisegmentaire et distale. Elle atteint préférentiellement les artères fémorales superficielle, poplitée, tibiale, fibulaire et les artères du pied ; les localisations aorto-iliaques sont peu fréquentes (El Ouarradi, 2019).

Micro-angiopathie : La micro-angiopathie est une complication quasi spécifique du diabète qui est directement liée à l'hyperglycémie. Les altérations micro-circulatoires caractérisées par un épaissement de la membrane basale des capillaires entraînent des échanges anormaux susceptibles d'aggraver l'ischémie tissulaire (Simou, 2020).

L'artériopathie est le plus souvent liée à un degré variable à la neuropathie (pied neuro-ischémique), (Amarir, 2014).

3.2.1. Complication de L'artériopathie :

➤ Les troubles trophiques :

Elles proviennent d'artériopathie, ce sont des lésions nécrotiques dont le stade ultime est la gangrène. Les plaies sont principalement situées sur le bord externe du pied, autour de l'os de l'oracle ou sur le talon. Ils sont entourés d'une tache rouge. Les lésions sont très douloureuses, à l'exception de la neuropathie associée. Elles sont provoquées par le moindre traumatisme du pied (frottement des chaussures, ongles incarnés, mycose interdigitée). En raison de l'ischémie, ils ne guérissent pas et sont sujets à la réinfection et à la progression vers la nécrose avec une amputation chirurgicale (**Maroselli, 2002**).

➤ Gangrène :

Les diabétiques sont 40 fois plus susceptibles de développer une gangrène des extrémités que les non diabétiques. Environ 20 % des diabétiques atteints d'artériopathie développeront une gangrène au cours de leur vie. Ce risque augmente avec l'âge et la durée du diabète. Elle peut commencer par une tache violette ou une phlyctène (vésicules, bulles d'air). Elle affecte souvent les orteils et évolue vers un assombrissement progressif d'un ou plusieurs orteils. Nous distinguons (**Maroselli, 2002**) :

- **Gangrène sèche** dans laquelle les tissus apparaissent souvent noirs et principalement dus à l'interruption du flux sanguin par une artère bouchée, L'atteinte reste en général limitée en l'absence de surinfection avec dessèchement de la partie nécrosée (**Maroselli, 2002**).

- **Gangrène humide** est caractérisée par la présence d'une zone de nécrose entourée d'un halo inflammatoire, voire purulent qui témoigne d'une infection sous-jacente. La nécrose peut entretenir l'infection qui, en se propageant, étend la zone ischémique. Présence de tissus nécrotiques noirâtres et lésions rapidement évolutives avec décollement et pus grisâtre d'odeur nauséabonde, pouvant aboutir à une dégradation rapide de l'état général du patient (**Azzoug, 2017**).

3.3. Infection

L'infection est la troisième composante de ce trépied physiopathologique du pied diabétique. Elle est définie par une invasion des tissus par des micro-organismes et leurs multiplications, s'accompagnant d'une destruction tissulaire ou d'une réponse inflammatoire de l'hôte (**Simou, 2020**).

Elle doit être distinguée de la colonisation, qui se définit comme la présence normale de bactéries à la surface de la peau où les bactéries aérobies à gram positif (Staphylocoques, Streptocoques) prédominent normalement, sa gravité est évaluée selon les critères de l'IDSA (**Lisky *et al*, 2012 ; Lisky, 2008**).

Elle est exceptionnellement à l'origine directe d'une plaie, mais une mycose interdigitale (IIO) surinfectée peut devenir creusante.

Le mécanisme physiopathologique de l'infection du pied diabétique fait l'objet de discussion.

La susceptibilité particulière des sujets diabétiques aux infections pourrait être en rapport avec un déficit des mécanismes cellulaires de défense majoré par l'hyperglycémie, capable d'altérer les fonctions des leucocytes (phagocytose, adhérence, bactéricidie, chimiotactisme) (**Malgrane, 2008 ; Besse, 2011**).

En l'absence de neuropathie ou d'artérite, l'infection sera rapidement prise en charge car la plaie sera douloureuse. D'autre part, l'infection d'une plaie préexistante est un facteur d'aggravation majeur qui peut mettre en péril le membre et parfois la vie du patient (**Lisky, 2008**).

En présence d'une neuropathie, en l'absence de douleur, l'infection ne sera souvent découverte que très tardivement, au stade de dermo-hypodermite (**Besse, 2011**).

La neuropathie joue un rôle aggravant : d'une part l'indolence peut retarder le diagnostic d'infection et d'autre part la persistance des forces de pression sur l'ulcération ; lors de la marche peut faciliter sa diffusion (**Falanga, 2005 ; Ulberecht *et al*, 2004**).

En présence d'une artériopathie, l'infection fera le lit de la gangrène qui est un motif fréquent d'amputation.

La chronicité de la lésion joue probablement aussi un rôle délétère dans l'infection, comme le suggère la diminution de l'incidence des ostéites et des amputations lorsque le temps de cicatrisation est raccourci (**Veves *et al.*, 2001**).

Par ailleurs, l'hypoxie secondaire à l'artériopathie est fréquente et favorise les infections à anaérobies.

La gravité particulière des infections sur ce terrain d'artériopathie peut aussi s'expliquer par une réduction de l'afflux sanguin au site de la plaie en diminuant ainsi l'apport des facteurs endogènes impliqués dans la lutte contre l'infection (**Malgrane, 2008**).

Au total, la neuropathie et l'artériopathie sont les deux principaux facteurs pathogènes des troubles trophiques du pied diabétique. L'infection est considérée comme un facteur aggravant surajouté (**Simou, 2020**).



Figure 4 : Pied diabétique infecté (**Diane et Luce, 2017**).

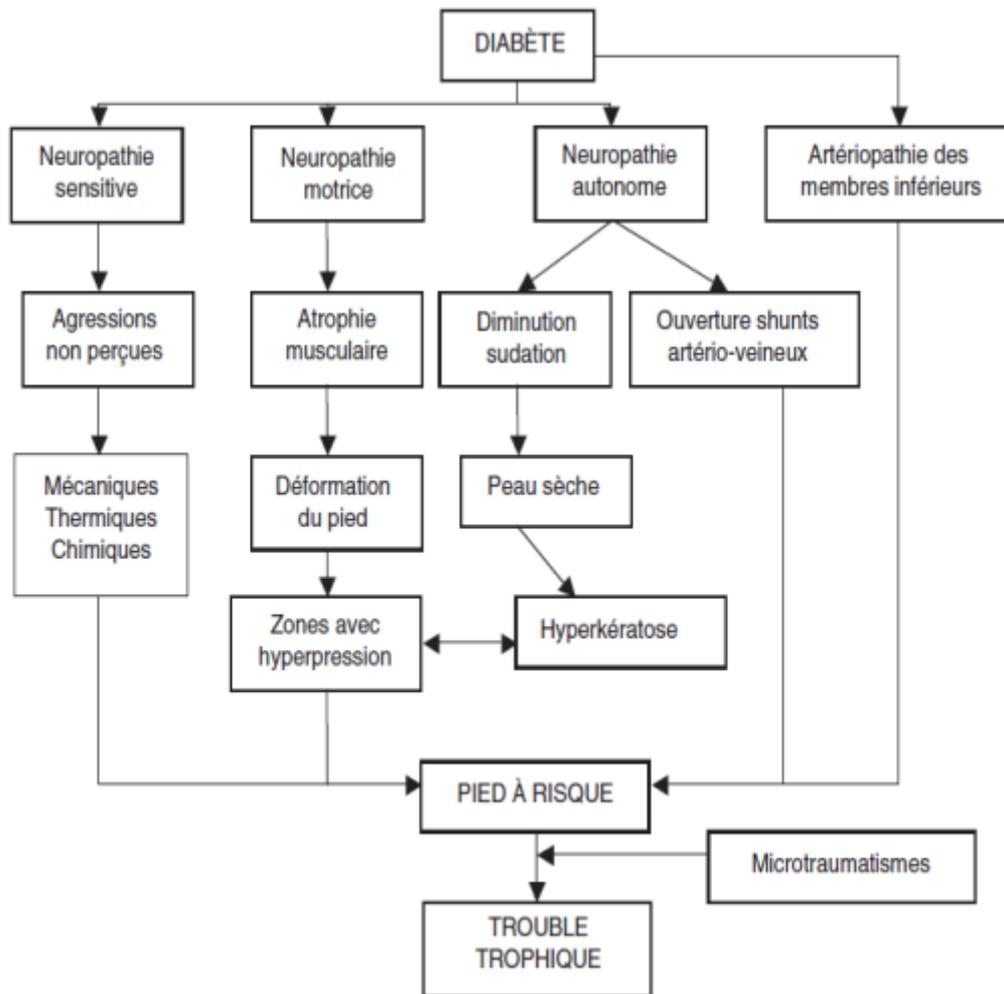


Figure 5 : Physiopathologie du pied diabétique (El Ouarradi, 2019).

4. Facteurs de risques du pied diabétique

Les lésions du pied sont très souvent occasionnées par des traumatismes mineurs. Les facteurs déclenchants les plus fréquemment en cause sont :

o **Les chaussures inadaptées** : (représente 50 % de taux d'infection)

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

o **Les gestes inadaptés** : (représente 25 % de taux d'infection)

Le mauvais soin des pieds fait par le patient lui-même ou par le podologue peuvent être responsables des blessures ; Lors de l'usage d'un instrument aiguisé, c'est la vue qui doit guider le geste et non la perception de la douleur. Lorsque la douleur apparaît, la plaie est déjà provoquée (Lushiku, 2006).

o **L'hygiène ou comportement inadapté** : (représente 25 % de taux d'infection)

La mycose interdigitale sur une peau qui est déjà fragilisée peut conduire à une infection profonde. Lorsque les ongles poussent de façon anarchique (ongles incarnés, onychogryphose), ils peuvent léser l'orteil impliqué ou l'orteil voisin. Les bains de pieds prolongés (de plus de cinq minutes) dans le but de ramollir les callosités, créent une macération des callosités qui sont souvent fissurées, ceci favorise la pénétration profonde des germes présents dans les fissures (Lushiku, 2006).

5. Agents causaux de l'infection du pied diabétique

La microbiologie des lésions du pied chez les diabétiques est caractérisée par la présence de plusieurs agents pathogènes. Plusieurs études montrent que le profil bactériologique des patients est plus souvent poly-microbiens et que les cocci à Gram positive sont plus répandus que les bacilles à Gram négative (Akwah *et al.*, 2015). Parmi les agents causaux de l'infection des pieds, on distingue :

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

- ✓ **Les bacilles aérobies à Gram négatif** : principalement de la famille des entérobactéries (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*) se rencontrent en cas d'infection chroniques ou déjà traitées. *Pseudomonas aeruginosa* est souvent isolé après une longue hospitalisation, son rôle pathogène est toujours à discuter (Toumi *et al.*, 2011).

- ✓ **Les bactéries anaérobies strictes** : le plus souvent des Cocci à Gram positif mais aussi des bacilles à Gram négatif (*Prevotille spp*, *Bacteroides spp*) sont souvent associés à des germes aérobies. Les bactéries à Gram positifs anaérobies strictes sont en règle présentes dans des plaies peu profondes tandis que celle à Gram négatifs anaérobies sont associées à une nécrose ischémique ou à une atteinte profonde (**Toumi et al., 2011**).

Tableau 1 : Corrélation clinico- biologique entre les types de plaies et les germes impliqués et identifiés (**Toumi et al., 2011**).

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



Chapitre II : Plaie chronique et biofilm

1. Implication des biofilms dans les plaies chroniques sur pied diabétique

Les plaies qui ne guérissent pas et n'atteignent pas l'intégrité anatomique et fonctionnelle après un mois sont considérées comme chroniques (**Wu et al., 2019**).

Les principaux types de plaies chroniques sont les plaies diabétiques. Malgré les soins diligents, le traitement échoue souvent lorsqu'une infection se développe dans les plaies chroniques, et l'une des principales raisons de l'échec du traitement dans les plaies chroniques est la formation de biofilms (**Fromantin et al., 2017**).

Le biofilm est une organisation bactérienne particulière. Des bactéries initialement circulantes adhèrent au lit de la plaie et se regroupent de façon structurée (**Figure 06**) grâce à un procédé de communication interbactérienne appelé *Quorum Sensing* (**Fromantin et al., 2017**).

Les bactéries se collent les unes aux autres par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice d'EPS (**Wolcott, 2011**).

Dans les plaies chroniques, l'organisation en biofilm est très classique. Elle est notamment observée dans les ostéites du pied, une complication courante des plaies chez les patients diabétiques (**Sotto et al., 2015**).

Les infections liées à des biofilms affectent majoritairement les personnes légèrement ou fortement immunodéprimées et impliquent souvent des bactéries commensales comme *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Roux et Ghigo, 2006**). La présence de biofilm reste un facteur difficile qui contribue à retarder la guérison de plusieurs plaies chroniques. La menace principale des biofilms des plaies chroniques est leur protection substantielle contre les immunités de l'hôte et leur extrême tolérance aux agents antimicrobiens (**Zouad et Siari, 2020**) (**figure 07**).



Figure 6 : Observation d'un biofilm bactérien sur une plaie (**Fromantin *et al.*, 2017**).

2. Etapes de la formation du biofilm

Le cycle de développement du biofilm comprend cinq étapes clés :

- L'adhésion réversible
- L'adhésion irréversible
- La formation de micro-colonies
- La maturation
- La dispersion.

Chaque cycle aboutit à la libération de cellules mobiles capables de coloniser de nouvelles surfaces et de donner naissance à un nouveau biofilm. Une étape initiale peut être ajoutée qui est la reconnaissance d'une surface par le microorganisme (**Pessereau, 2016**).

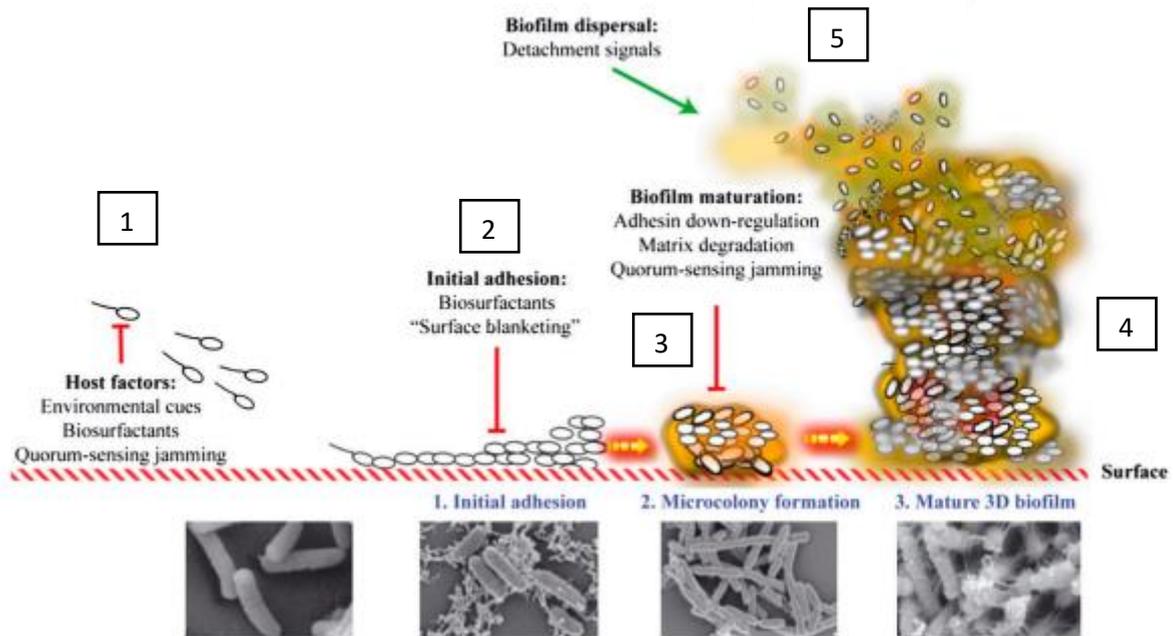


Figure 7 : les étapes du processus de formation du biofilm, y compris l'imagerie de chaque étape au microscope électronique à balayage (Omar *et al.*, 2017).

2.1. Adhésion réversible

L'attachement à une surface représente un tournant entre la vie planctonique et le mode biofilm (Toyofuku *et al.*, 2016). Initialement, les cellules bactériennes s'adsorbent sur un substrat par le biais d'interactions non particulières dans les surfaces abiotiques ou biotiques. Celles-ci impliquent une série d'interactions physico-chimiques attractives et répulsives entre les bactéries et la surface, où les forces de Lifshitz-van der Waals, les interactions électrostatiques et les forces hydrophobes acide-base de Lewis sont les premières à participer (Ren *et al.*, 2018 ; Guzmán-Soto *et al.*, 2021). Lors de l'interception de la surface, l'adhérence est médiée par des appendices adhésifs extracellulaires supplémentaires et des adhésines sécrétées. Cependant, la décision de « coller » n'est pas absolue ; l'attachement initial est dynamique et réversible, au cours duquel les bactéries peuvent se détacher et rejoindre la population planctonique, si elles sont perturbées par des forces hydrodynamiques (détachement des bactéries de la surface), des forces répulsives ou en réponse à la disponibilité des nutriments (Kostakioti *et al.*, 2013). Dans l'attachement initial, les motilités médiées par les flagelles et les pili de type IV sont essentiels. Les flagelles et les pili sont deux familles d'appendices bactériens qui jouent des rôles importants lors des interactions initiales avec la surface cible (Rabin *et al.*, 2015 ; Guzmán-Soto *et al.*, 2021).

2.2. Adhésion irréversible

L'adhésion irréversible correspond à une fixation active et spécifique des micro-organismes sur une surface obtenue par les effets d'interactions à courte portée exemple les liaisons hydrogènes, cette adhésion progresse grâce à la production d'EPS sécrétées par les bactéries et se poursuit pendant la maturation du biofilm (Bezoui, 2016) ;(Muhammad *et al.*, 2020).

2.3. Formation de micro-colonies

Après le stade d'adhésion, les bactéries fixées se développent et se divisent soit par fission binaire, soit par division asymétrique. Cela implique la prolifération cellulaire et la colonisation de surface, conduisant à l'activation des deuxièmes messagers, à la communication intercellulaire et à la sécrétion initiale de la matrice EPS (Guzmán-Soto *et al.*, 2021).

2.4. Maturation du biofilm

La maturation du biofilm est divisée en deux phases, dont la première concerne des gènes codant pour des protéines impliquées dans des métabolismes anaérobies tandis que la seconde est marquée par des synthèses polymériques/protéiniques importantes, dans ce cas le biofilm a une croissance exponentielle se traduisant par une augmentation importante de son épaisseur jusqu'à former un film hétérogène tridimensionnel (Bezoui, 2016).

2.5. Dispersion et détachement cellulaire

Le détachement de cellules du biofilm intervient lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables :

- Limitation de la disponibilité en oxygène dans des biofilms épais.
- Apparition de forces de cisaillement dues aux conditions hydrodynamiques.
- Diminution de la concentration ou modification de la nature des nutriments disponibles.

Les bactéries peuvent alors migrer afin de trouver un environnement plus favorable à leur développement.

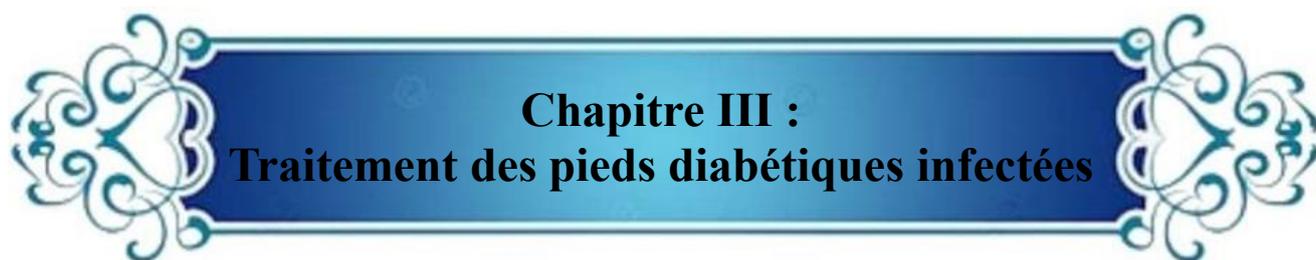
Ce phénomène n'est pas restreint au dernier stade du développement du biofilm mais peut avoir lieu, soit par lyse cellulaire soit par le départ de cellules viables, tout au long de la formation du biofilm et en réponse à un changement d'environnement (Bellifa, 2014).

3. Impact du biofilm sur les plaies

Au niveau des plaies, le biofilm entretient une :

- **Réaction inflammatoire délétère pour la cicatrisation** : Les plaies chroniques sont souvent recouvertes de biofilms bactériens qui tolèrent très bien les cellules inflammatoires et les anticorps.
- Les biofilms augmentent la production de cytokines proinflammatoires, ce qui entraîne une inflammation chronique et une augmentation de la production de protéases et d'espèces réactives de l'oxygène. Ces derniers détruisent les protéines qui sont essentielles à la cicatrisation.
- Qu'en présence d'une infection aiguë, il y a un processus rapide d'envahissement des tissus et de réponse de l'hôte qui est causé par la libération, par des bactéries planctoniques mobiles, d'endotoxines, d'enzymes et d'agressines qui neutralisent la réponse de l'hôte. Il y a ensuite dans les tissus de l'hôte une lyse et une digestion des cellules, ce qui produit une inflammation classique (soit rougeur, chaleur, enflure, douleur et perte de fonction) (Rose et Schultz, 2012).
- **Inactive les produits antimicrobiens (antiseptiques, antibiotiques)** : l'EPS peut constituer une barrière physique et/ou chimique empêchant la pénétration des antibiotiques. La modification du microenvironnement peut aussi altérer l'efficacité des antibiotiques. Par ailleurs, la proximité des bactéries favorise le transfert horizontal des gènes notamment ceux de résistance augmentant le nombre de bactéries résistantes au sein du biofilm. Il est également admis que les bactéries sessiles peuvent intervenir :
 - Dans la régulation des gènes de résistance notamment en augmentant leur expression.
 - D'autres éléments ont encore été identifiés : comme les biofilms sont polymicrobiens, la sensibilité aux antibiotiques est souvent hétérogène ; certaines espèces étant sensibles à l'antibiotique donné et pas les autres. De plus, comme le biofilm est constitué de bactéries dont la croissance est ralentie, l'efficacité des antibiotiques est réduite, ceci pouvant avoir des conséquences sur l'émergence de bactéries multirésistantes (Sotto *et al.*, 2015).
- **La résistance des bactéries aux défenses immunitaires de l'hôte** : le biofilm provoque une diminution de la pénétration des cellules phagocytaires à travers l'EPS, ce mécanisme peut expliquer la gravité, la chronicité et les récurrences des plaies chroniques. En outre, le

détachement des bactéries à partir du biofilm peut faciliter l'extension des infections notamment au niveau de l'os. Donc il y a des biofilms « protecteurs » (colonisation) et d'autres qui sont responsables d'infection (**Sotto *et al.*, 2015**).



**Chapitre III :
Traitement des pieds diabétiques infectés**

1. Traitement du pied diabétique par antibiothérapie

L'antibiothérapie repose sur la connaissance des principales bactéries responsables et de leurs profils de sensibilité aux antibiotiques (**Chakroun, 2007**). Ainsi le choix de l'antibiothérapie (ATB) se base sur plusieurs éléments : les agents pathogènes probables ou prouvés, le risque de BMR, la sévérité de l'infection (évaluée selon une gradation établie par « Infections Diseases Society of America » [IDSA] et « International Working Group on the Diabetic Foot » [IWGDF]), l'efficacité reconnue de la molécule dans la prise en charge du pied diabétique et le coût (**Amouyal et Hartemann, 2017**). L'antibiotique doit couvrir les bactéries les plus fréquemment impliquées dans ces infections. L'antibiothérapie initiale est empirique, mais certaines règles doivent être respectées. Une infection cliniquement sévère doit bénéficier d'une antibiothérapie à large spectre.

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

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

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

La présence d'une atteinte osseuse, l'ostéite du pied diabétique, est une infection pratiquement toujours chronique. Son traitement est compliqué, en raison d'une réduction du flux sanguin au niveau de l'os, aggravée par l'artériopathie des membres inférieurs. Il est donc recommandé d'utiliser des molécules à bonne diffusion osseuse. Les antibiotiques privilégiés sont les fluoroquinolones, en cas d'infection à bacilles à Gram négatif, et la rifampicine ou la

clindamycine, en cas d'infection à Cocci à Gram positif. Ces molécules doivent être utilisées en association pour éviter la sélection de résistance bactérienne. Les bêta-lactamines à large spectre à fortes doses sont également recommandées. Leur choix serait justifié en cas d'infection poly microbienne et en cas de difficulté à documenter l'infection (**Brends et al., 2008 ; Hartemann-heurtier et al., 2008 ; Toumi et al, 2011**).

2. Traitement par phytothérapie

Les plantes produisent plusieurs métabolites secondaires pour leur protection contre les agents pathogènes telle que les bactéries et les virus (**Kavanaugh et Ribbec, 2012 ; Saviuc et al., 2015 ; Khan et al., 2019**). Ces métabolites, sont une bonne source pour lutter contre la formation de biofilm (**Suzuki et al., 2015**).

Parmi les plantes les plus utilisées on a *Lavandula stoechas* (la lavande) et *Laurus nobilis* (le laurier).

2.1. *Lavandula stoechas* L

L'espèce *Lavandula stoechas* L, communément appelée, «lavande française», « lavande italienne », « lavande espagnole», « lavande des stoechades », « lavande maritime», « lavande papillon » ou « lavande à toupet », est une espèce végétale bien connue qui fait partie de la famille des *Lamiacées* ou *Labiées*. Elle possède donc les mêmes caractéristiques morphologiques et communes à l'ensemble de cette famille. (**Balouiri, 2011 ; Benabdelkader, 2012**).

Elle se présente sous la forme d'un buisson pouvant atteindre un mètre de haut (**Benabdelkader, 2012**), tomenteux, blanchâtre, tétragone (**Jullien, 2016**), très ramifié et très aromatique avec une lourde odeur semblable à celle du pin (**Benabdelkader, 2012**), l'essence qu'on peut en extraire a une odeur très forte et désagréable. (**Barbier, 1963**).



Figure 8 : Fleurs de lavande papillon (Fathalahi, 2020)



Figure 9 : Huile essentielle de lavande papillon (Fathalahi, 2020)

2.1.1 Répartition géographique

♣ *Dans le monde* : La Lavande papillon dont le territoire géographique est le plus vaste est répandue dans tout le bassin méditerranéen : Europe méridionale, l'Afrique du Nord et le Moyen Orient, avec une petite disjonction sur la frontière Lybie-Egypte (Figure10). Actuellement, elle a été introduite et est cultivée en Bretagne, Nouvelle Zélande et en Australie (Benabdlekader, 2012).

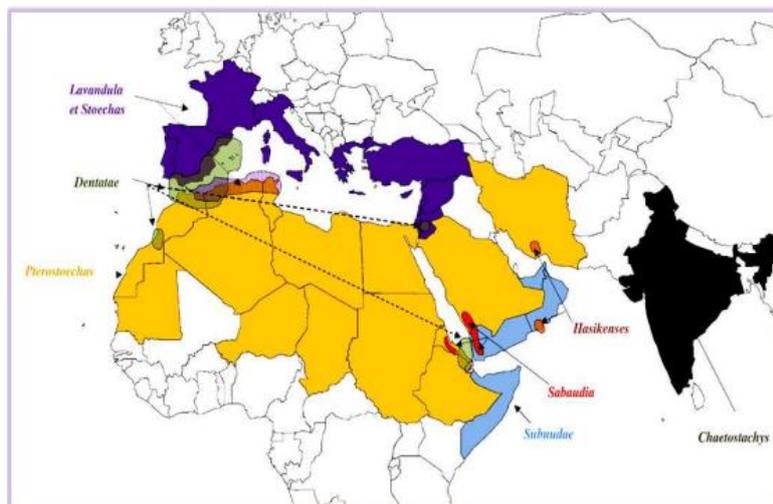


Figure 10 : Répartition géographique de *Lavandula stoechas* L. dans le monde (Guitton, 2011)

♣ **En Algérie** : En Algérie, les populations naturelles de *Lavandula stoechas* L. sont situées au nord du pays, le long de la côte méditerranéenne dans les wilayas de Skikda, Jijel, Boumerdes, Bouira, Blida, Médéa, Ain Defla et Chlef (**Benabdelkader, 2012**), elle est parmi les très nombreuses espèces végétales qui forment la flore spontanée algérienne (**Haussein, 2000**). **(Figure 11)**

Lavandula stoechas L. est une plante tendre, qui préfère les endroits ensoleillés et les sols riches où la température ne descend pas en dessous de (-10°C) et surtout, sec. (**Chu et Kemper, 2001 ; Festy et Dupin, 2012**).

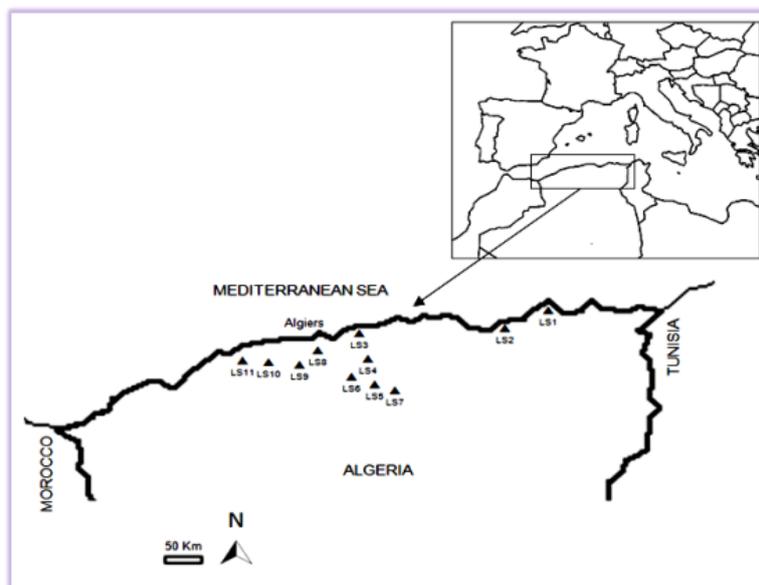


Figure 11 : Répartition géographiques de *Lavandula stoechas* L. en Algérie (Benabdelkader, 2012).

LS1 (Skikda), LS2 (Jijel) , LS 3 (Boumerdes) , LS4 (Bouira ,Lakhdaria) , LS5 (Bouira, Ain Bessam) , LS6 (Bouira, Gucrouma) , LS7 (Bouira, Taguedit), LS8 (Blida), LS9 (Médéa) , LS10 (Ain Defla) , LS11 (Chlef).

2.1.2. Usages thérapeutiques

La Lavande a été traditionnellement utilisée comme plante aromatique, culinaire, décoratif, cosmétique et dans des buts médicaux (Maganga, 2004).

L. stoechas L. possède des propriétés thérapeutiques remarquables ; La décoction des feuilles est utilisée dans le cas d'infections intestinales, de gastralgies mais c'est surtout pour ses propriétés antitussives qu'il est largement recommandé. Les fleurs en décoction apaisent l'hystérie, ingérées telles quelles, elles seraient également efficaces pour calmer la toux, l'asthme (Beloued, 2005) et pour la lutte contre les insectes comme insectifuge (Skoula *et al.*, 1996 ; Mennal et Chennafi, 2015) ou insecticide (Gören *et al.*, 2002).

Elle était utilisée par les médecins musulmans qui la considéraient comme céphalique (tonique), résolvente, désobstruant, et carminative. Ils la prescrivent pour lutter contre des infections pulmonaires et pour l'expulsion des humeurs bilieuses et flegmatiques (Said *et al.*, 1996).

La plante est également employée traditionnellement dans la médecine populaire comme anti-inflammatoire (Sosa *et al.*, 2005), antispasmodique (Gören *et al.*, 2002) dans les douleurs des coliques (Nadkarni, 1982 ; Usmanghani *et al.*, 1997 ; Siddiqui *et al.*, 2016), anti-

carcinogène, antioxydant ,antidépresseur (Gören *et al.*, 2002), expectorant et stimulant (Giray *et al.*, 2008).

L'HEs est un précieux remède des premiers secours, elle est accélère la guérison des brûlures des plaies (action cicatrisante, réparatrice (Mennal et Chennafi, 2015) ,et désinfectant des plaies contre les problèmes dermiques, a aussi des effet positifs sur les infections urinaires, les maladies cardiaques, l'eczéma (Gören *et al.*, 2002), spasmolytiques, contre le diabète, la fièvre (Chu et Kemper, 2001), les douleurs menstruelles féminines, les calculs rénaux, l'otite ,l'anthrax, l'hypertension (Skoula et Abidi, 1996) et pour traiter l'infertilité (Chu et Kemper, 2001). Il est utilisée dans l'industrie de la lessive et de la savonnerie, ainsi qu'en parfumerie. En effet, celle-ci analgésiques (calmante), antiseptiques (Beloued, 2005) sédatives (Gören *et al.*, 2002 ; Siddiqui *et al.*, 2016), antimicrobiennes (Asimgil, 1997; Gören *et al.*, 2002), antibactériens, antifongiques et antidépresseurs (Cavanagh et Wilkinson, 2002).

2.2. *Laurus nobilis* L

Le laurier noble, laurier-sauce ou laurier d'Apollon est une plante appartenant à la famille des *lauracées* cultivée un peu partout dans le monde (région méditerranéenne, Australie, Asie,etc.) soit par graines ou bien par bouturage.

Son arbre peut atteindre jusqu'à 10m de hauteur avec de petites fleurs, un fruit noir et des feuilles lancéolées avec une face supérieure d'un vert foncé brillant et une face intérieure matte d'un vert plus clair (Tomar *et al.*, 2020).

Ces dernières dégagent une odeur spécifique lorsqu'elles sont froissées (Taarabt *et al.*, 2017). Cette plante aromatique est utilisée dans la production industrielle : fabrication de denrées alimentaires, médicaments, produits de beauté, etc... .



Figure 12 : *Laurus nobilis* L. (laurier Noble) (Goudjil, 2016).

2.2.1. Répartition géographique

Dans les temps anciens, la plante nommée « Daphné » a été définie comme *L nobilis* par Goodyer en 1655. Un membre sempervirent naturel à croissance lente, de la région méditerranéenne et largement cultivé en Asie, en Europe ,en Afrique du Nord et aux États-Unis comme plante ornementale (Sedef Nehir *et al.*, 2014 ; Alejo-Armijo *et al.*, 2017). Il est cultivé commercialement pour ses feuilles aromatiques en Turquie, Algérie, Maroc, Portugal, Espagne, France, Italie, et Mexique. En Algérie, l'arbuste de laurier pousse spontanément à l'état sauvage dans la région du Tell. Il est cultivé localement sous le nom de « rend » (Bendjarsia *et al.*, 2016 ; Maatallah *et al.*, 2016).



Figure 13 : Localisation naturelle de *Laurus nobilis* L. à travers le monde. (Beloud, 2005).

2.2.2. Usages thérapeutiques

Laurier qui est un élément essentiel du bouquet garni dans nos préparations culinaires, est principalement utilisé en médecine traditionnelle pour soigner les troubles de l'appareil digestif, ainsi que les douleurs arthritiques (**Bendjersi, 2017**) et les maladies de la peau et la cicatrisation de plaies (**Ali-Shtayeh et al., 2000**), le parkinsonisme et la névralgie (**El Malti et Amarouch, 2009**), des rhumatismes, de l'épilepsie, de cancer et plusieurs maladies infectieuses (**Peixoto et al., 2017**). A également des effets hypothermique, anesthésique, relaxante musculaire (**Dallmeier et Carlini, 1981**), analgésiques, diaphorétiques, antipyrétiques bien connus. Il est utilisé dans les industries de la parfumerie et du savon (**Jeffrey et al., 2016**).

Ses huiles essentielles sont dotées de pouvoirs antibactérien et antifongique avérés (**Ouibrahim et al., 2015**). Très utilisées par l'industrie agroalimentaire surtout par les conserveries des poissons. Aussi, la plante peut être utilisée traditionnellement en phytothérapie (**Taarabt et al., 2017**). En plus de leur importance médicinale, les feuilles de ces plantes sont utilisées comme agent aromatisant et pour augmenter la durée de conservation des aliments ; les olives (**Elharas et al., 2013**), les saucisses (**Da Silveira et al., 2014**), les poissons (**Snuossi et al., 2016**) car elles contiennent une activité antimicrobienne (**Nadeem et al., 2018**) et une activité anti-oxydante (**Dias et al., 2014**) et d'améliorer en général la sécurité des produits (**Houicher et al., 2016**). Les métabolites les plus divers de la feuille de Laurier, ont été étudiés pour leurs divers effets pharmacologiques tels que les effets cytotoxique (**Barla et al., 2007**), neuroprotecteurs (**Ham et al., 2011**).



Matériel et Méthodes

1. Le lieu et période d'étude

Cette étude a été menée au laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédical et l'Environnement (LAMAABE), université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen durant la période allant de Mars à Avril 2023.

2. Population d'étude

Notre étude a porté sur les patients hospitalisés ou suivis à titre externe dans le service de médecine interne, du centre hospitalo- universitaire Tidjani Damerджи de Tlemcen.

Tous les patients inclus dans l'étude sont des diabétiques, présentant une infection au niveau du pied traduite par l'apparition du pus dans le foyer infecté (pied diabétique).

Différents aspects et stades de l'infection sont inclus quel que soit le sexe et l'âge du patient (à l'exception de la population pédiatrique).

3. Prélèvements

- Les prélèvements bactériologiques sont réalisés en cas d'infection établie cliniquement.
- Avant tout prélèvement, un nettoyage a été réalisé avec une gaze imbibée de sérum physiologique stérile. L'élimination de la flore bactérienne commensale a été assurée en utilisant des antiseptiques doux.
- L'écouvillonnage de la plaie c'est la méthode la plus utilisée pour le prélèvement (**Lavigne et Sotto, 2007**). Elle consiste à faire passer un écouvillon stérile au sein de la plaie, dans un mouvement de zigzag combiné à une rotation. Il est préférable de ne pas prélever sur les bords de la plaie.
- Chaque prélèvement est accompagné d'une fiche de renseignement comportant des données telles que nom et prénom, âge, sexe, type de diabète, l'ancienneté de diabète, les complications et maladies associées ; type d'infection ; type de traitement.
- Les écouvillons, contenant les échantillons à analyser, et la fiche de renseignement sont immédiatement acheminés au laboratoire de microbiologie, afin d'être ensemencés sur des milieux spécifiques.



Figure 14 : Prélèvements des plaies infectées.

3.1. Traitement des échantillons

Le traitement des échantillons a été basé sur un enrichissement afin de favoriser la croissance des bactéries présentes et augmenter leurs nombres pour une meilleure détection (**Meriemeche et Nadir, 2016**).

Chaque écouvillon a été déchargé dans un 5 mL de bouillon BHIB pour enrichir le prélèvement pendant 24h à une température de 37°C.



Figure 15 : Prélèvement d'une plaie infectée dans un bouillon d'enrichissement BHIB.

4. Isolement et purification des bactéries

- L'isolement et l'identification bactérienne a concerné uniquement le genre *Staphylococcus* et *Pseudomonas* et ceci par l'utilisation de trois milieux gélosés :
 - **Le milieu Chapman** : La gélose Chapman est le milieu sélectif des bactéries halophiles et plus particulièrement fermentant le mannitol. C'est un milieu semi-synthétique. Il est utilisé pour l'isolement des *Staphylococcus*.
 - **La gélose Cétrimide** : La gélose au Cétrimide est utilisée 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 bleuvert par production de pyocyanine.
 - **La gélose Mac Conkey** : est un milieu d'isolement ordinaire, lactosé et sélectif des bacilles à Gram négatif non exigeants. Le désoxycholate de sodium et le cristal violet inhibe la croissance des bactéries à Gram positif.
- Les tubes récupérés, après enrichissement, sont soumis à un vortexage. Après homogénéisation, l'ensemencement des milieux cités, est effectué en surface à l'aide d'une anse de platine en utilisant la méthode d'épuisement. Les boîtes sont ensuite incubées pendant 48 heures à 37°C.
- La purification des souches se fait par l'ensemencement d'une seule colonie sur une nouvelle boîte de milieu gélosé jusqu'à l'obtention de souches pures qui seront identifiées et conservées par la suite.

5. Identification des bactéries

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

5.1. Examen macroscopique

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

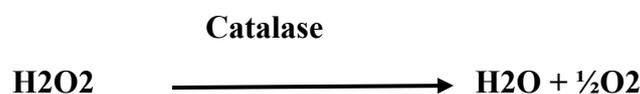
5.2. Examen microscopique

L'étude microscopique par coloration de Gram constitue la coloration de base en bactériologie, puisqu'elle permet une classification des bactéries selon leur structure, leur forme, leur regroupement et leur Gram (**Berrada, 2016**).

5.3. Identification biochimique

5.3.1 Test catalase

- La catalase a la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène. C'est l'action directe de l'enzyme qui est mise en évidence dans la masse bactérienne (**Garnier et Denis, 2007**).
- Une goutte d'eau oxygénée (H₂ O₂) est déposée sur une lame avec une colonie bien distincte d'une culture jeune de 24 h. Pour les bactéries catalase + il y'a un dégagement immédiat de bulles d'oxygène, et pour les bactéries catalase - pas de bulle d'oxygène.



5.3.2 Test coagulase

- La propriété de *Staphylococcus aureus* à provoquer la coagulation d'un plasma est due à la sécrétion d'une protéine extracellulaire ; la Staphylocoagulase ou la coagulase, qui joue un rôle central dans le pouvoir pathogène des *Staphylocoques*, en leur permettant de lutter contre les anticorps opsonisants et la phagocytose (**Benbouabdellah et Ziane, 2015**).

- La recherche de la Staphylocoagulase est le test essentiel qui permet de distinguer *Staphylococcus aureus* des staphylocoques à coagulase négatif.
- A partir d'une culture pure sur milieu Chapman, on ensemence un tube de B.H.I.B, après incubation à 37° C pendant 18h on prend 0.5 mL de cette culture dans un tube à hémolyse et on ajoute 0.5 mL de plasma de lapin.
- Une réaction positive se traduit par la coagulation du plasma à un temps variant de 1h à 24h.

5.4. Recherche des caractères biochimiques par galerie Api Staph et Api20 NE

- Afin d'étudier les caractères biochimiques des souches isolées , nous avons utilisé la galerie miniaturisé API Staph pour les bactéries du genre *Staphylocoques* et Api 20NE pour les *Pseudomonas*.
- Le principe consiste à inoculer dans les microtubes à l'aide d'une pipette pasteur une suspension bactérienne homogène qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification ou du logiciel d'identification (**Biomérieux®**, France) (**annexe 03**).



Figure 16 : Plaque de la galerie API Staph



Figure 17 : Plaque de la galerie API 20 NE

6. Conservation des souches

Toutes les souches identifiées sont conservées en double réplique sur :

- **Gélose nutritive inclinée** : est une technique de conservation à court terme. Il s'agit d'un ensemencement des tubes de gélose nutritive qui seront incubés 24h à 37°C suivi directement par une conservation dans le réfrigérateur à 4°C.
- La maintenance de la vitalité des souches dépend de la température et l'espèce microbienne.



Figure 18 : Conservation des souches dans la gélose nutritive.

- **Le glycérol** : est une technique de conservation à long terme qui consiste à préparer une suspension bactérienne à laquelle on ajoute du glycérol.
- Le glycérol est un cryoprotecteur qui assure l'absence des altérations cellulaires lors du refroidissement.



Figure 19 : Conservation des souches dans le glycérol.

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

7.1. Détection de la production de slime sur milieu Rouge Congo Agar (RCA)

- C'est une méthode indirecte qui permet de distinguer entre les souches productrices de slime de celles qui n'en produisent pas, en se basant sur la couleur de leurs colonies.
- Le milieu est composé de BHIB (37 g/L), de saccharose (50 g/L), d'agar agar (10 gr/L), et de rouge congo (0,8 g/L).
- Les souches sont ensemencées par stries en surface du milieu Rouge Congo coulé en boîtes après incubation à 37°C pendant 24h à 48h, les souches non productrices de slime sont de couleur rose rouges tandis que celle qui ont la capacité produire un slime sont de couleur noires (Nasr *et al.*, 2012). (Mathur *et al.*, 2006).
- Les souches de phénotype variable donnent des colonies à centre noir et à contour rouge ou centre rouge et à contour noir (Touati *et al.*, 2007).

7.2. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP)

- **Technique**

- Le test TCP décrit par O'Toole *et al.*, (2000) permet une évaluation quantitative de la formation du biofilm.
- A partir d'une culture de **18** heures dans le milieu BHIB, les puits d'une microplaque de **96** puits (polystyrène) sont inoculés avec **150**µL de la suspension bactérienne ajustée à une DO pour l'obtention de 10^8 UFC/mL et diluée au 1/100ème dans le même milieu (BHIB). Les microplaques sont incubées pendant **24** heures à **37°C**. Les puits sont lavés 3 fois avec l'eau distillée stérile afin d'éliminer les bactéries libres (planctoniques). Les biofilms formés par l'adhérence des organismes sessiles sont colorés avec du cristal violet (**0,1%**) pendant **15** min. L'excès du colorant est ensuite rincé par un lavage en profondeur avec de l'eau distillée et les plaques sont laissées pour le séchage pendant 10 à 20 minutes. Les microplaques sont ensuite remplies avec **150**µL d'une solution d'éthanol (**95%**) afin d'évaluer l'importance de la coloration du biofilm en mesurant la densité optique au moyen d'un lecteur ELISA (figure 20) a une longueur d'onde de **490** nm (Stepanovic *et al.*, 2000 ; Hola et Ruzicka, 2011).

- **Lecture**

Les souches ont été classées comme suit :

- **$DO \leq DO_t$ (Témoin)** : non formatrice du biofilm.
- **$DO_t \times 2 \leq DO \leq DO_t \times 4$** : Modérément formatrice du biofilm.

- **$DO_t \times 4 \leq DO$** : Fortement formatrice du biofilm (Christensen *et al.*, 1985).



Figure 20 : Microplaque de 96 puits

8. Étude de l'activité antimicrobienne de *Lavandula stoechas* et *Laurus nobilis* sur les souches planctoniques

L'étude du pouvoir antimicrobienne des HE étudiées, a été effectué, *in vitro*, sur 23 souches bactériennes isolées à partir des pieds diabétiques et sur six souches de références (tableau 02) qui font partie de la collection des souches bactériennes du laboratoire de Microbiologie et ceci par la méthode des puits.

Tableau 2 : Caractéristique des souches de référence utilisées

Nom de la souche	N° ATCC	Gram	Famille
<i>Enterococcus faecalis</i>	6538 ATCC	+	<i>Enterococcaceae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	2785 ATCC3	+	<i>Staphylococaceae</i>
<i>Escherichia coli</i>	25922 ATCC	-	<i>Entérobactériaceae</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15307 ATCC	-	<i>Pseudomonadaceae</i>
<i>Klebsiella pneumonia</i>	700602 ATCC	-	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Micrococcus</i>	49452 ATCC	+	<i>Microccaceae</i>

ATCC: American Type culture Collection

- **Méthode de diffusion sur gélose (méthode de puits)**

C'est la technique de base utilisée pour étudier la capacité d'une substance à exercer un effet antimicrobien, elle est aussi appelée : la technique de dilution en gélose pour la détermination des extraits actifs.

Des boîtes de Pétri contenant du milieu Mueller Hinton agar sont ensemencées par écouvillonnage avec une suspension de 10^8 UFC /mL qui provient d'une culture jeune de bactéries .

A l'aide d'une pipette pasteur stérile, réaliser des puits d'environ 6mm de diamètre sur la gélose MH bien refroidie. Les cavités ainsi formées sont remplies avec les deux extraits *Lavandula stoechas* et *Laurus nobilis* (100 μ L par puits) en évitant tout débordement à la surface.

Les boîtes sont mises à incubées dans une étuve à 37°C pendant 24h. L'action inhibitrice se manifeste par la formation d'une auréole autour des puits. La lecture des résultats s'effectue par mesure des diamètres des zones d'inhibitions à l'aide d'une règle graduée. Un produit est considéré actif, si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 8 mm (**Djendli et Bouali, 2022**).

Selon **Ponce et al, (2003)** L'échelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne et classé comme suit :

- Extrêmement sensible (+++) : plus de 20mm
- Très sensibles (++) : de 15mm à 19mm
- Sensibles (+) : 8 mm à 14mm
- Non sensibles (-) : moins de 8 mm

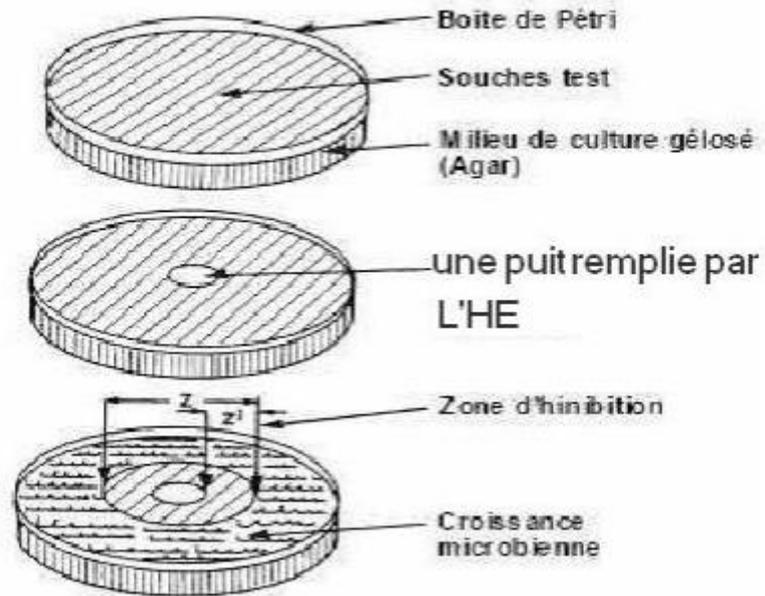


Figure 21 : Illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétri (Pibiri, 2005).

9. Étude de l'activité antibiofilm de *Lavandula stoechas* et de *Laurus nobilis* sur plaques TCP

Après formation d'un biofilm jeune de 24 h par la technique TCP décrite précédemment, les microplaques de 96 puits sont rincées 3 fois avec de l'eau distillée avant l'ajout de 100 μ L de BHIB additionné de 50 μ L d'huile essentiel dans chaque puit.

Après incubation de 24h à 37°C les puits de la microplaque sont soigneusement rincés, séchés et colorés avec du cristal violet suivant la technique standard. La DO est mesurée à 590 nm par le lecteur ELISA et l'élimination de la formation du biofilm par les huiles se traduit par une densité optique inférieure à celle de la DO initiale.



Figure 22 : Plaque ELISA après incubation de 24h.



Résultats et Discussion

1. Résultats des prélèvements

Sur une période d'un mois allant de Mars à avril 2023 un ensemble de 12 prélèvements ont été prélevés chez 12 patients à pied diabétique infecté hospitalisés plus de 48 heures dans le service de médecine interne du CHU Tlemcen (Algérie). Les caractéristiques de ces patients sont résumés dans le **tableau 3**.

Tableau 3 : Caractéristiques des 12 patients de notre étude.

Sexe	Services	Age	Type de diabète
H1	Médecine interne	31 ans	Type 2
F1		43 ans	Type 2
H2		77 ans	Type 2
H3		32 ans	Type 1
H4		62 ans	Type 2
F2		70 ans	Type 1
H5		75 ans	Type 2
F3		64 ans	Type 2
H6		71 ans	Type 1
H7		59 ans	Type 1
F4		54 ans	Type 2
H8		57 ans	Type 2

H : Homme, F : Femme

Selon le tableau 3 tous les patients sont hospitalisés au service de médecine interne CHU de Tlemcen. La répartition selon la tranche d'âge montre que les patients les plus atteints de l'infection du pied diabétique sont ceux âgés entre 61 et 70 ans, suivi par la tranche d'âge [51-60] ans.

Dans une étude similaire à la nôtre réalisée par (**Hanoune, 2020**) ; la répartition selon la tranche d'âge montre que les patients les plus atteints de l'infection du pied diabétique sont ceux âgés entre 61 et 70 ans ce qui explique le rôle important que joue le facteur âge dans le développement des ulcères du pied à cause de la poly-pharmacie chez les gens âgés. **Vishwanathan et al., 2002** montrent que les personnes âgées vivant avec le diabète pour une longue période sont plus susceptibles à développer un ulcère du pied.

Les infections du pied diabétique sont plus répondues chez les sujets de sexe masculin (75%) par rapport au sexe féminin (25%), ces observations seraient certainement liées à un niveau plus élevé d'activités extérieures chez les hommes qui les exposent plus à des blessures (**Sharma et al., 2006**) et (**Gasmi et Sahraoui, 2018**).

Selon **Ben moussa *et al.*, 2016** et **Ravisekhar *et al.*, 2006** les sujets diabétiques de type 2 développent généralement un ulcère de pied plus que les diabétiques de type 1. Ceci peut être due à l'obésité et le style de vie non équilibré qui sont des facteurs de risque de l'apparition de diabète de type 2.

2. Résultat de l'analyse bactériologique des prélèvements

2.1 Caractère phénotypique des souches isolées

Sur les 12 prélèvements effectués sur pied diabétique un total de 23 souches dont 13 *Staphylocoques* sur milieu Chapman et 10 *Pseudomonas* sur milieu Cétrimide et Mac Conkey ont été isolées.

- Sur le milieu *Chapman* et après 48h d'incubation à 37°C, les *Staphylocoques* forment des colonies de petite taille, rondes et lisses qui apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une auréole jaune, elles sont arrondies à bords régulier de 1 à 2 mm (**Figure 23**).



Figure 23 : Aspect des colonies de *Staphylococcus aureus* sur gélose Chapman.

- Sur le milieu *Cétrimide* et après 24h d'incubation à 37°C , les *Pseudomonas* forment des colonies de quelques millimètres de diamètre, plates ou surélevées, opaques, limitées par un bord régulier, prenant en vieillissant des reflets métalliques, présentant une pigmentation caractéristique bleue ou bleu-vert due à la sécrétion de la pyocyanine, accompagnée d'une odeur caractéristique de seringa (**Figure 24**) .



Figure 19 : Aspect des colonies de *Pseudomonas aeruginosa* sur gélose Cétrimide .

- Sur le milieu *Mac conkey*, les bacilles Gram négatif se présentent en colonies rose ou rouge grâce à la fermentation de lactose (Lactose +), les autres bactéries (Lactose -), apparaissent incolore ou beige sur ce milieu .



Figure 20 : Aspect des colonies de *Pseudomonas aeruginosa* sur gélose Mac Conkey .

2.2. Répartition des souches

2.2.1. Test de catalase

Toutes les bactéries isolées, testées pour la production d'une catalase, ont décomposé l'eau oxygénée en eau et en oxygène qui se dégage. Ce qui se traduit par le dégagement des bulles de gaz.

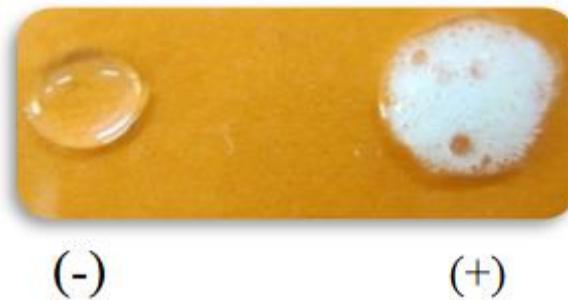


Figure 21 : Résultat de la recherche des enzymes respiratoires.

2.2.3. Test de coagulase

Après un temps d'incubation de 01 h à 24h à 37°C de mélange (culture de 24h à 48h de la souche *S.aureus* + plasma de lapin nous avons remarqué l'apparition d'un caillot qui est observée en inclinant le tube à 90°C ce qui se traduit par la libération d'enzyme coagulase.

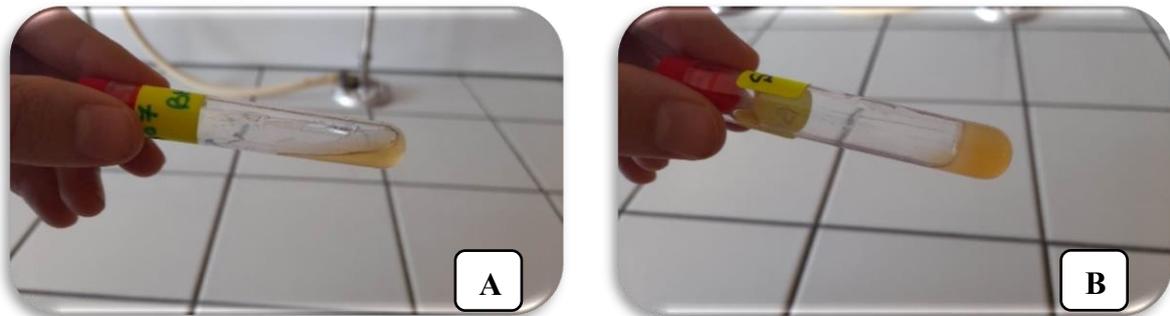


Figure 27 : Production de coagulase par les souches isolées, A : Réaction négatif, B Réaction positif.

2.2.1. Galerie Api Staph et Api 20NE

Sur les 23 souches isolées 10 *Pseudomonas aeruginosa* ont été identifiés par plaque Api 20^{NE} et 13 *Staphylocoques aureus* par Api Staph, et confirmés pas le test de coagulase et de catalase (Figure 28), (Figure 29).



Figure 22 : Identification de *Staphylococcus aureus* par la galerie Api Staph (biotype 731646).

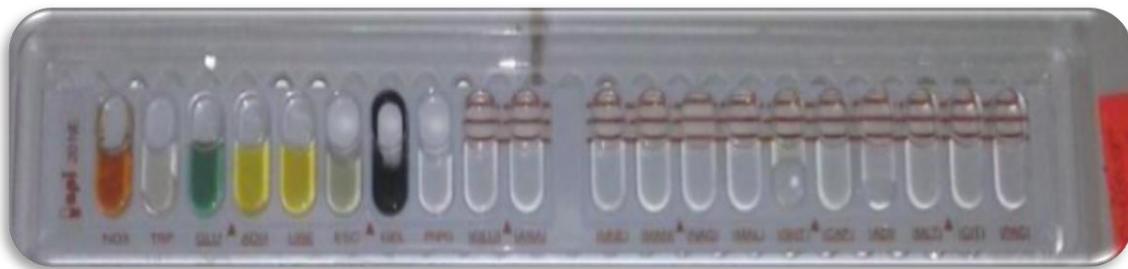


Figure 23 : Identification de *Pseudomonas aeruginosa* par la galerie Api 20NE (biotype 1054571).

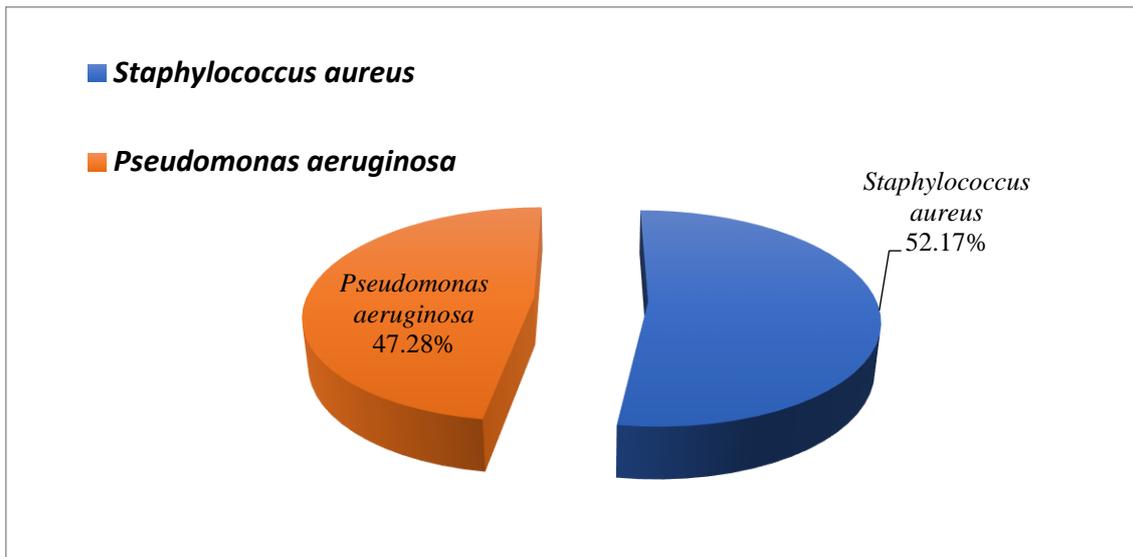


Figure 24 : Répartition des souches bactériennes isolées des pieds diabétiques.

Staphylococcus aureus était le principal germe isolé au cours de notre étude, suivi par *Pseudomonas aeruginosa* qui venait en tête des bacilles à Gram négatif non fermentaire (**Figure 30**).

En effet, plusieurs études réalisées sur ce sujet confirment que le *Staphylococcus aureus* est le pathogène le plus fréquemment isolé dans les infections du pied diabétiques.

Nos résultats sont en accord avec ceux retrouvés par **Guira et al., en 2015** qui a montré des résultats proches de ceux notés par notre étude ou les cocci à Gram positif (CGP) étaient prédominants avec un taux de 76% et *Staphylococcus aureus* était l'espèce la plus fréquemment isolée avec un taux de 32.4%.

Pseudomonas aeruginosa était la deuxième espèce la plus fréquemment retrouvée et la plus dominante des bacilles à Gram négatif (BGN) avec un taux de 47,28 %. Ces résultats sont proches de ceux rapportés par **Jadid en 2014** où *Pseudomonas aeruginosa* était le deuxième pathogène le plus fréquemment isolé après *Staphylococcus aureus* (**Jadid , 2014**).

La littérature médicale rapporte que les infections du pied diabétique sont dominées par les bactéries à Gram positif (BGP) (**Richard et al.,2011**). Cette prédominance reste cependant non universelle puisque des études récentes, menées dans des pays d'Afrique et d'Asie, ont rapporté la prédominance des bactéries à Gram négatif (BGN) dans les infections du pied diabétiques (**Turhan et al.,2013**) ;(**Durgad et al .,2014**). Cette disparité géographique n'a pas encore d'explication claire. Elle serait liée à des facteurs environnementaux climatiques, à la prise

préalable d'antibiotiques ou aux pratiques d'hygiène personnelle ou de chaussage. Des facteurs techniques de prélèvements ou de culture pourraient également être à l'origine de cette différence (Uçkay, 2014).

3. Résultats de l'évaluation de la formation du biofilm *in vitro*

Actuellement, les bactéries ont réussi à développer divers mécanismes dont la production de biofilm pour survivre dans l'environnement hospitalier. En effet, les bactéries productrices du biofilm sécrètent certaines substances chimiques qui les protègent contre les désinfectants, les agents antimicrobiens et le système immunitaire de l'hôte, ce qui engendre des infections sévères et difficiles à traiter (Saitou, 2009).

Dans cette partie nous avons choisie 07 souches de *S. aureus* et 07 souches de *P. aeruginosa* pour tester leurs capacités à produire un biofilm par les techniques RCA et TCP.

3.1. La détection de la formation de biofilms par la méthode de Rouge Congo Agar (RCA)

La production de slime, par certaines bactéries, est considérée comme l'un des facteurs les plus importants qui favorisent l'adhérence bactérienne, Ainsi, la détection de production de slime peut être utilisée comme un bon indicateur pour déterminer le potentiel pathogénique des bactéries (Chatane et Ziadi, 2016).

La recherche de la production de slime sur milieu rouge Congo a révélé que sur les 07 souches de *P.aeruginosa* isolées des pieds diabétiques aucune n'a produit de slime et a révélé des colonies rouges sur le milieu RCA. Par contre, sur les 07 souches de *S. aureus* isolés toutes produisent un slime sur le milieu RCA . Les résultats sont montrés dans le tableau 04 et la figure 31.

Tableau 4 : Résultats de la production de slime par la méthode RCA.

Souches	Nombre de souches	Slime +	Slime -
<i>S. aureus</i>	07	07	00
<i>P.aeruginosa</i>	07	00	07



Figure 25 : Détection de la production de slime et formation de biofilm sur RCA.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Chibi, en 2015** où elle a trouvé que **100%** des souches de *Staphylococcus aureus* isolées des surfaces sont productrices de slime.

De même, l'étude de **Zmantar et al., 2010** traitant la caractérisation phénotypique de la production de biofilm de *S. aureus* a révélé que 56,5 % de souches isolées des appareils auditifs sont productrices de slime.

Ces résultats se concordent aussi avec ceux retrouvés par **Arciola et al., 2001** où la production de slime est beaucoup plus importante chez les *S.aureus* (60.8%) comparés aux autres souches bactériennes.

Pour *P. aeruginosa*, **Sambyal et al., 2017** ont trouvé que sur 142 isolats de *P. aeruginosa*, 81 souches sont productrices de biofilm (57,04%) alors que 61 souches étaient non productrices de biofilm (42,9%).

Chibi en 2015 a montré dans son étude sur les 33 souches isolées de surface, que sur un nombre de 21 souches de *Pseudomonas aeruginosa* seules 23% étaient susceptibles de produire un slime.

La production de slime est plus importante chez les staphylocoques et est révélée par l'apparition de colonies noires sur le milieu rouge Congo. Cet aspect est dû à la production des exopolysaccharides (PIA) qui réagissent avec le milieu de culture ; décrite la première fois chez *S. epidermidis* par **Mack et al., 1996**. La PIA est principalement localisée à la surface de la cellule. Elle est codée par le locus *ica* et joue un rôle important dans l'adhésion intercellulaire et de ce fait a été reconnue comme un facteur crucial dans les infections à staphylocoques.

3.2. Formation de biofilms en microplaques TCP

Afin de quantifier les capacités de production de biofilms par les souches étudiées, l'essai de coloration au CV est souvent préféré en raison de sa simplicité et sa fiabilité. Cette méthode permet une culture et une quantification *in vitro* du biofilm bactérien.

Dans cette partie nous avons analysé 14 souches dont 07 *P. aeruginosa* et 07 *S.aureus* isolées des infections sur pied diabétique pour leur capacité à former un biofilm par la méthode TCP et 06 souches de références décrites dans la partie matériel et méthodes.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 5, la figure 32 et 33.

Tableau 5 : Résultats de la production de biofilm par la méthode TCP.

Souches	Technique TCP		
	Fort	Modéré	Faible
<i>S.aureus</i>	02	05	00
<i>P. aeruginosa</i>	03	04	00

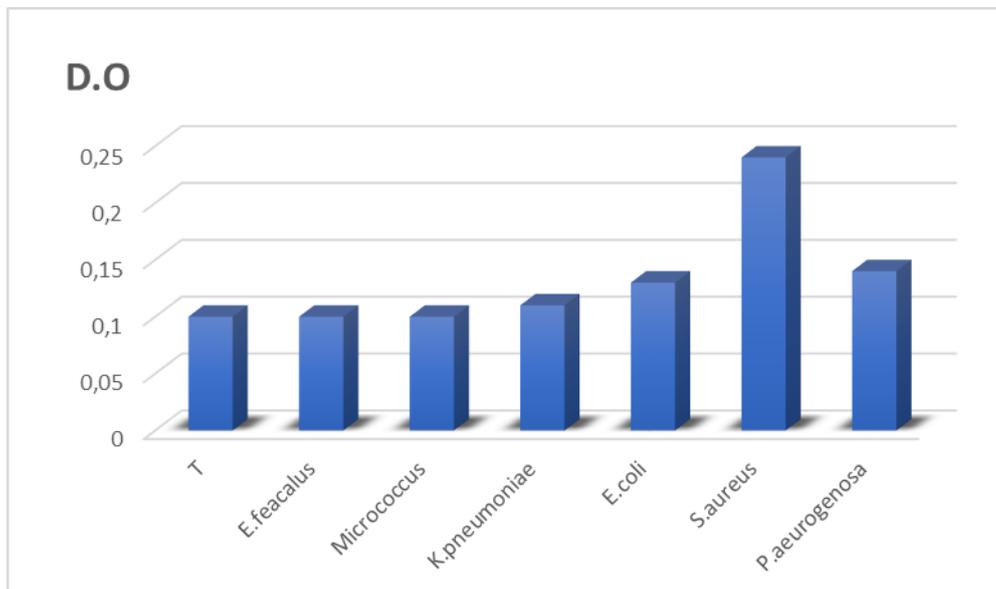


Figure 26 : Résultats d'évaluation de la formation du biofilm par la méthode TCP.

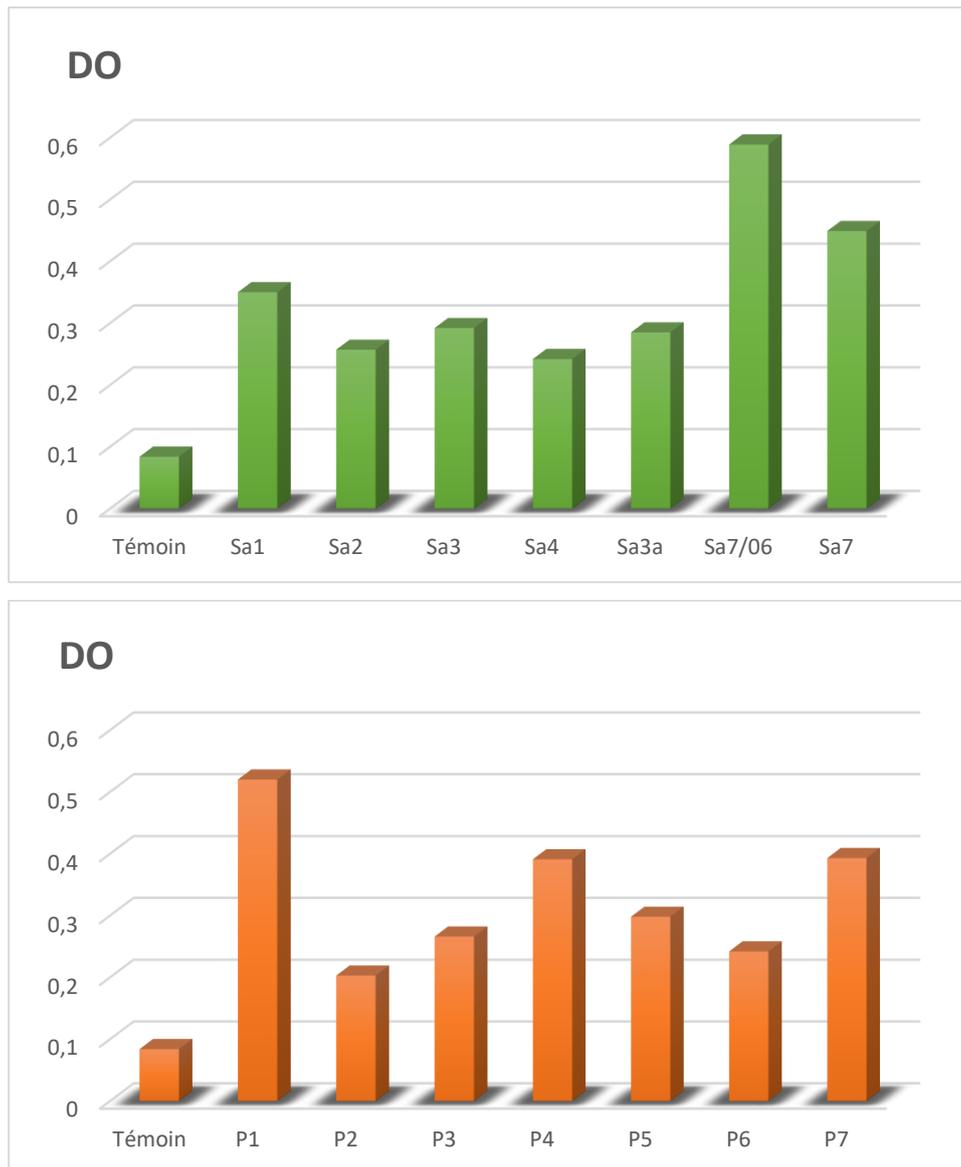


Figure 27 : Quantification de la formation de biofilm par les Staphylocoques et les Pseudomonas en microplaques à 37°C.

Selon le tableau 5 la Figure 32 et 33, il a été remarqué que les souches de références testées ne forment pas de biofilm par la techniques TCP contrairement aux souches hospitalières isolées des pieds diabétiques ou on remarque que chez les *Staphylococcus aureus* aucune souche isolé n'a été faiblement formatrice, 5 souches sont modérée et 2 souches sont fortement formatrice de biofilm.

Pour les *Pseudomonas aeruginosa* sur les 07 souches testées , 3 souches sont fortement formatrice de biofilm, 04 modérées et aucune souche n'a été faiblement formatrice de biofilm.

Les biofilms sont responsables d'un large éventail d'infections chez l'homme. Plus de 80% des infections bactériennes chroniques sont associées à la présence de biofilms (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

Les biofilms formés sur les plaies des pieds diabétiques peuvent retarder la cicatrisation (**Fromantin et al., 2017**) et l'éradication des biofilms bactériens pose de graves problèmes sur le plan médical puisque si les traitements ATB classiques sont efficaces sur les bactéries planctoniques, ils s'avèrent bien moins probants sur les biofilms (**Filloux et vallet, 2013**).

Une étude montre que sur un nombre total de 50 souches de *S. aureus*, il s'est avéré que 34 étaient biofilm positif dont 20 faiblement adhérentes, 10 modérément et 4 fortement adhérentes. Les autres souches 16 (32%) étaient non adhérentes (**Namvar et al., 2013**).

Pour *P. aeruginosa* cette bactérie existe rarement sous forme planctonique dans la nature, mais plutôt sous la forme de biofilm (**Méar, 2014**). C'est l'une des bactéries les plus étudiées dans le contexte des biofilms (**Musk et al., 2005**).

En 2014, **Saxena et al.**, ont montré que sur 80 souches de *Pseudomonas*, isolées à partir de crachat, seulement 16 souches ont été de bonnes formatrices de biofilm par contre 47 ont donné une formation faible.

Les études de (**Majtan et al., 2014**) et (**Banerjee, 2014**) sur *P. aeruginosa* ont montré également la capacité des isolats cliniques de *P. aeruginosa* à produire des biofilms, ils ont remarqué que sur les 88 souches testées, 100 % sont productrices de biofilm par la technique TCP.

Coban et al., 2009 et **Oncel et al., 2010** ont utilisé aussi la technique TCP pour étudier la capacité des *P. aeruginosa* isolées de fibrose kystique à produire un biofilm dont la majorité des souches étaient de bonnes formatrices.

La méthode TCP est la meilleure technique pour le dépistage de la formation du biofilm *in vitro*. **Bellifa et al., 2013** et **kara Terki, 2014** ont montré que la méthode des microplaques était la plus efficace et la mieux indiquée pour une évaluation quantitative de l'adhésion bactérienne sur une surface.

D'après **Racha et ses collaborateurs**, cette méthode permet de tester plusieurs souches simultanément ainsi la détermination quantitative de leur capacité d'adhésion (**Racha et al., 2012**). En plus, c'est une technique pratique et économique pour la détermination des facteurs et des conditions de cultures optimales pour la formation du biofilm. Cependant, elle peut être moins précise pour déterminer la capacité des souches à sécréter le slime bactérien (**Poliana de Castro Melo et al., 2013**).

Cependant, l'étude de **Poliana de castro melo et al., 2013** a montré que la méthode RCA devrait être utilisée comme un test complémentaire à la méthode de la microplaque.

4. Comparaison entre l'adhésion des *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* par la technique TCP et RCA

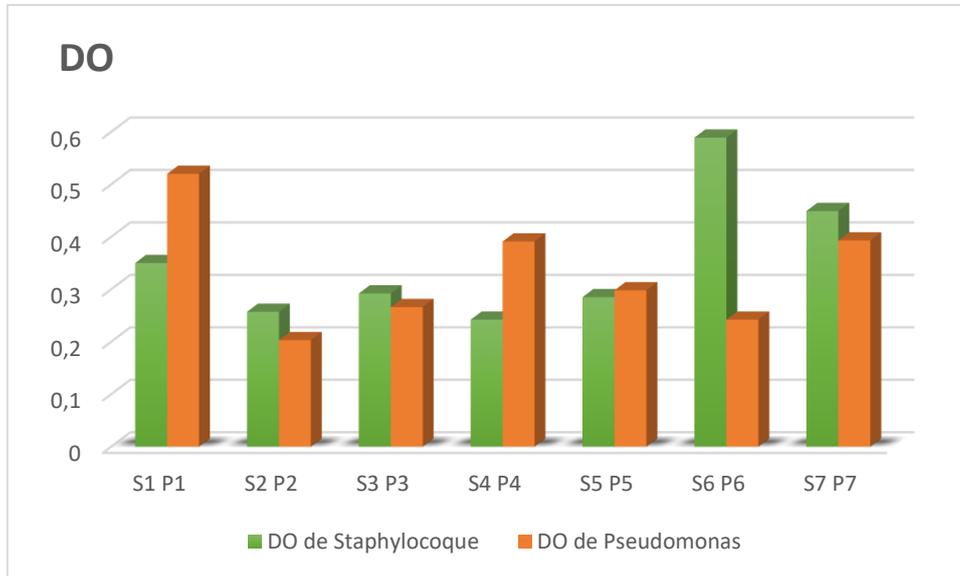


Figure 28 : Comparaison des résultats de la formation du biofilm entre les Staphylocoques et les Pseudomonas.

Tableau 6 : Comparaison entre l'adhésion de la formation de biofilm sur RCA et TCP

Souches	Nombre	Technique TCP		Technique RCA	
		Formatrice biofilm	Non formatrice	Productrice de slime	Non productrice
<i>Staphylococcus aureus</i>	07	07	00	07	00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	07	07	00	00	00

On remarque selon la figure 34 et le tableau 06 que les souches de *P. aeruginosa* et *S. aureus* isolées des pieds diabétiques adhèrent sur les microplaques TCP avec des intensités différentes par contre seuls les staphylocoques produisent un slime par la technique RCA.

Selon l'étude de **Rewatkar et al., 2013** les deux bactéries *P.aeruginosa* et *S. aureus* viennent en tête de liste des souches les plus productrices de biofilm dans la nature et dans le domaine hospitalier en particulier.

D'après **Nasr et al., 2012 ; Kord et al., 2018** la méthode des plaques de microtitrage ou TCP reste généralement un meilleur outil pour le criblage de la production de biofilms , mais la capacité à former un biofilm étaient différentes de chaque isolat ,car en général plusieurs facteurs influencent cette capacité tels que les caractéristiques physico-chimiques des souches, l'interaction physique entre les constituants, type de surface, le pH, la température etc (**Nirwati et al., 2019**).

En effet, Il a été démontré que l'adhésion de *P. aeruginosa* dépend de la surface du carbone pyrolytique, de l'énergie libre et de la rugosité. Au contraire, l'adhésion de *S. aureus* est indépendante des facteurs précédents et est contrôlée par les gènes *ica A/ica D* responsable de la production de PIA .

Ainsi, un modèle *in vitro* ne peut pas imiter la composition et la structure des biofilms formés *in vivo*. Pour cette raison, les résultats dérivés des modèles de biofilm *in vitro* doivent être interprétés avec prudence pour des résultats plus pertinents sur le plan clinique (**Seneviratne , 2017**).

5. Evaluation de l'activité antibactérien des deux huiles essentielles de *Lavandula stoechas* et *Laurus nobilis*

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir anti bactérien des extraits de *Lavandula stoechas* et *Laurus nobilis* par la méthode de diffusion des puits sur un milieu gélosé Mueller-Hinton. Cette activité estime le diamètre de la zone d'inhibition autour des puits contenant les extraits à tester vis-à-vis des souches de références citées dans le tableau 07 et 14 souches isolées des pieds diabétiques infectées.

Les figures 35 et le tableaux 07 et 08 montrent les résultats obtenus par cette méthode.

Tableau 7 : Résultats du test de sensibilité des souches de références à l'HE de *Lavandula stoechas* et *Laurus nobilis* et catégorie d'inhibition (méthodes des puits)

Souches de références	<i>Lavandula stoechas</i>		<i>Laurus nobilis</i>	
	Diamètre moyen d'inhibition (mm)	Catégorie d'inhibition	Diamètre moyen d'inhibition (mm)	Catégorie d'inhibition
<i>Micrococcus luteus</i> 15307 ATCC	20	Extrêmement sensible	25	Extrêmement sensible
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538 ATCC	19	Très sensibles	20	Extrêmement sensible
<i>Escherichia coli</i> 25922 ATCC	68	Extrêmement sensible	35	Extrêmement sensible
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 700602 ATCC	14	Sensibles	10	Sensibles
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853 ATCC	10	Sensibles	09	Sensibles
<i>Enterococcus faecalis</i> 49452 ATCC	30	Extrêmement sensible	22	Extrêmement sensible

Tableau 8 : Résultats du test de sensibilité des autres souches à les HEs de *Lavandula stoechas* et *Laurus nobilis* et catégorie d'inhibition (méthodes des puits)

Souches bacteriennes	<i>Lavandula stoechas</i>		<i>Laurus nobilis</i>	
	Diamètre moyen d'inhibition (mm)	Catégorie d'inhibition	Diamètre moyen d'inhibition (mm)	Catégorie d'inhibition
Sa07	26	Extrêmement sensible	40	Extrêmement sensible
Sa04	18	Très sensibles	10	Sensibles
Sa05	20	Extrêmement sensible	10	Sensibles
Sa03	20	Extrêmement sensible	38	Extrêmement sensible
Sa01	22	Extrêmement sensible	12	Sensibles
Sa02	12	Sensibles	17	Très sensibles
Sa 7/06	12	Sensibles	10	Sensibles
Pa 1	00	Résistant	00	Résistant
Pa 2	06	Résistant	00	Résistant
Pa 3	00	Résistant	07	Résistant
Pa 4	00	Résistant	00	Résistant
Pa 5	00	Résistant	00	Résistant
Pa 6	05	Résistant	07	Résistant
Pa 7	00	Sensibles	00	Résistant

Selon le tableau 10 et 11 en remarque que l'huile de *L. stoechas* et *L. nobilis* ont un effet sur les souches de références testées et sur la majorité des *S.aureus* isolées des pieds diabétiques avec des diamètres de plus 26 mm pour l'huile de *L. stoechas* et 40 mm pour l'huile de *L. nobilis*. Par contre une faible activité a été remarquée seulement contre les 7 souches de *P. aeruginosa* avec des diamètres de 06 mm pour l'huile de *L. stoechas* et 07mm pour l'huile de *L. nobilis*.

L'étude réalisée par **Iguer en 2009**, qui porte sur l'huile essentielle de la lavande révèle que la souche, *E.faecalis* et *M.luteus* sont très sensibles à cette dernière, ces résultats concordent aux nôtres.

Par contre les recherches menées par **Bachiri et al., 2016** sur l'HE de *L. stoechas* ne montre aucun effet sur *S. aureus* contrairement à nos résultats ou l'huiles essentielles extraites à partir de la partie aérienne exercent une très bonne activité inhibitrice.

L'activité antibactérienne des HEs de *L. stoechas* L. réside généralement dans les monoterpènes (spécialement oxygénés) plutôt que dans sesquiterpènes (**Burt, 2004; Tajkarimi et al., 2010**). Cette huile est formée d'une grande proportion de composés sesquiterpéniques (63,99%) et seulement de 18,62% de composés monoterpéniques (**Cherrat, 2013**), elle exprime des activités antimicrobiennes intéressantes spécialement vis-à-vis des souches Gram+ similairement à d'autres HEs riches en sesquiterpènes. **Demirci et al., 2008 ; Maxia et al., 2009, Delaquis et al., 2002** ont estimé aussi la présence des composés mineurs présents à l'état de trace qui sont connus pour avoir une activité antibactérienne, tels que le linalol, l'aldéhyde de cinnamyl, le carvacrol, le géraniol, le myrténal et l'eugénol.

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* présentent un effet inhibiteur sur les souches testés, l'inhibition la plus importante est obtenue avec la souche *Staphylococcus aureus* ATCC25923 avec une auréole d'inhibition de 40mm de diamètre.

Les résultats sont en accord avec ceux de (**Fradj et Seridji, 2021**) ont montré que cette huile s'est avérée active contre *Staphylococcus aureus* à une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 0,25 mg/ mL, et contre *E.coli* avec une concentration inhibitrice (CMI) de 0,5 mg/mL.

Elharas et al., 2013 montrent dans leur étude que l'huile de *Laurus nobilis* a une activité qui a même inhibé la croissance de *Micrococcus luteus* LA 2971.

Bekhti et al., 2020 ont confirmé que *Staphylococcus aureus* était la souche la plus sensible à l'huile de *Laurus nobilis* avec une zone d'inhibition de 13,6 mm, une activité modeste a été observée contre *Escherichia coli* avec des zones d'inhibition de 9 mm, *Pseudomonas aeruginosa* ont été les souches les plus résistantes à l'huile avec la zone d'inhibition la plus faible moins de 7,4 mm.

L'action antimicrobienne de notre huile peut être facilement attribuée à sa richesse en mono terpènes oxygénés 1,8-cineole qui a montré son pouvoir à lutter contre plusieurs souches bactériennes testées **(Derwich *et al.*, 2009) ; (Elharas *et al.*, 2013).**

Dans cette étude *P. aeruginosa* est plus résistante aux huiles testées, contrairement à *S. aureus* qui est plus sensible.

Nos résultats sont en accord avec la littérature selon laquelle les bactéries à Gram positif montrent une plus grande sensibilité vis-à-vis des huiles essentielles que les bactéries à Gram négatif **(Pool, 2001) ; (Kheyar *et al.*, 2014) ;(Russel, 1991).**

Selon **(Burt., 2004)** la grande résistance des bactéries Gram négatif à l'huile essentielle liée en partie à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces microorganismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries Gram positif.

Il est probable que ce résultat soit dû à une différence dans la capacité de pénétration des composés actifs présents dans les huiles essentielles. Chez les bactéries à Gram négatif, la membrane externe constitue une barrière de perméabilité efficace ; le lipopolysaccharide, grâce à ses charges négatives de surface empêche la diffusion des molécules hydrophobes. Les bactéries à Gram positif sont moins protégées contre les agents antibactériens, le peptidoglycane n'entrave que la diffusion des poids moléculaires à 50KD **(Kheyar *et al.*, 2014).**

Cependant, *E. coli* ATCC 25922 s'est avérée très sensible aux huiles testées, malgré qu'elle est Gram négatif. En effet, les différents composants des huiles essentielles montrent différents degrés d'activité contre des bactéries G- et G+ **(Dorman et Deans, 2000).**

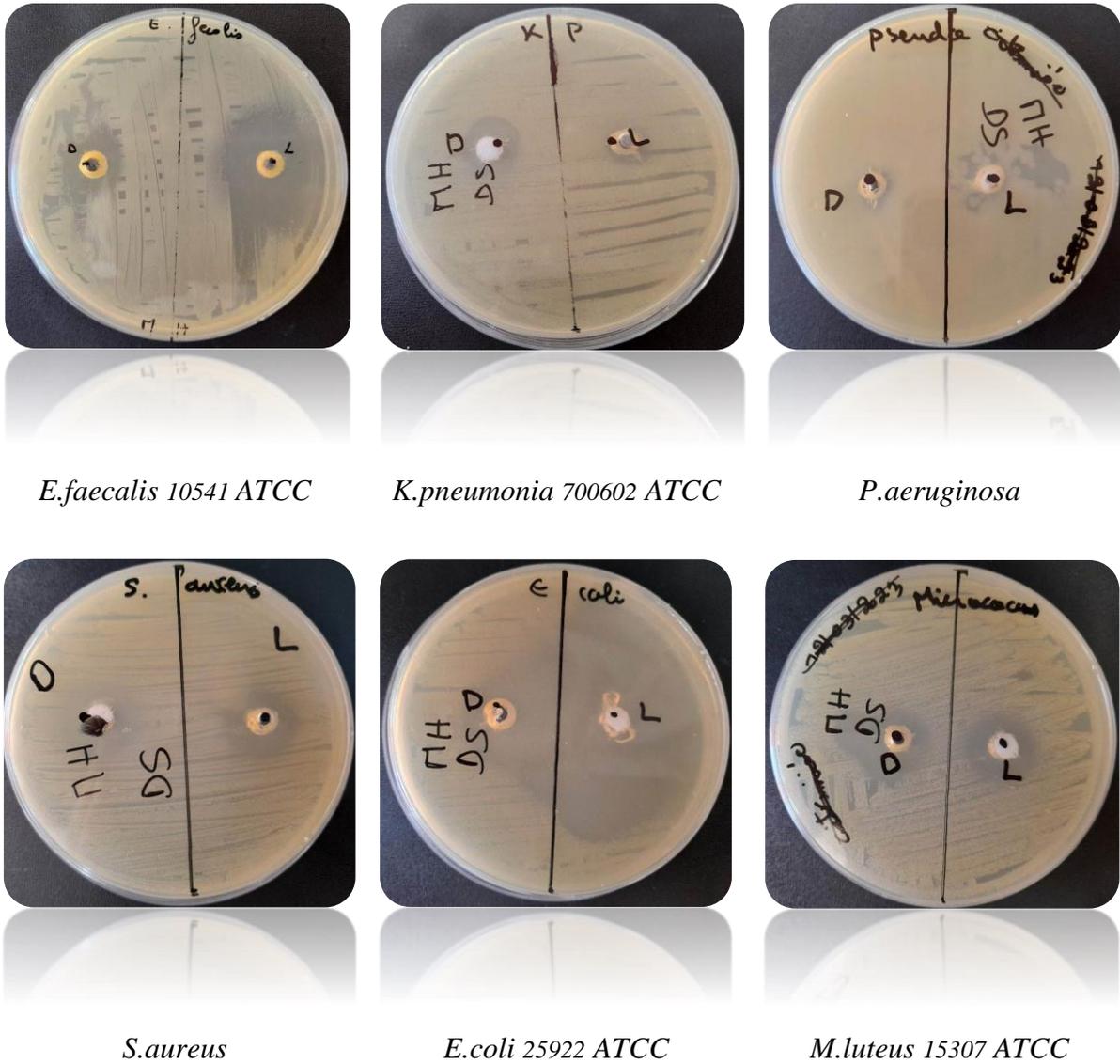


Figure 29 : Photographies correspondants aux résultats de l'activité antibactérienne des HEs *Lavandula .stoechas* et *Laurus .nobilis*.

6. Résultats de l'activité antibiofilm

Dans le but de mettre en évidence l'effet antibiofilm des deux huiles essentielles de *Lavundula stoaechas* et *Laurus nobilis*, l'activité inhibitrice de ces derniers a été réalisé à l'encontre de biofilm formé par les souches de *S. aureus* et *P.aeurginosa*.

Le travail a été réalisé seulement sur des souches les plus performantes dans la formation de biofilm. Le tableau 09 et la figure 36 résume les résultats obtenus .

Tableau 9 : Souches bactériennes utilisées

Codes	Souches bactérienne	<i>L. stoechas</i>		<i>L. nobilis</i>	
		DO avant	DO après	DO avant	DO après
Pa1B	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,57	0,477	0,57	0,412
Pa1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,57	0,562	0,57	0,041
Sa1	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,85	0,485	0,85	0,77
S07	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,45	0,556	0,45	1,055
SRPa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853 ATCC	0,67	0,771	0,67	0,63
SRSa	<i>Staphylococcus aureus</i> 6538 ATCC	0,72	0,403	0,72	0,87
Pa7B	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,56	0,583	0,56	1,01
Sa2	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,3	0,549	0,3	1,306

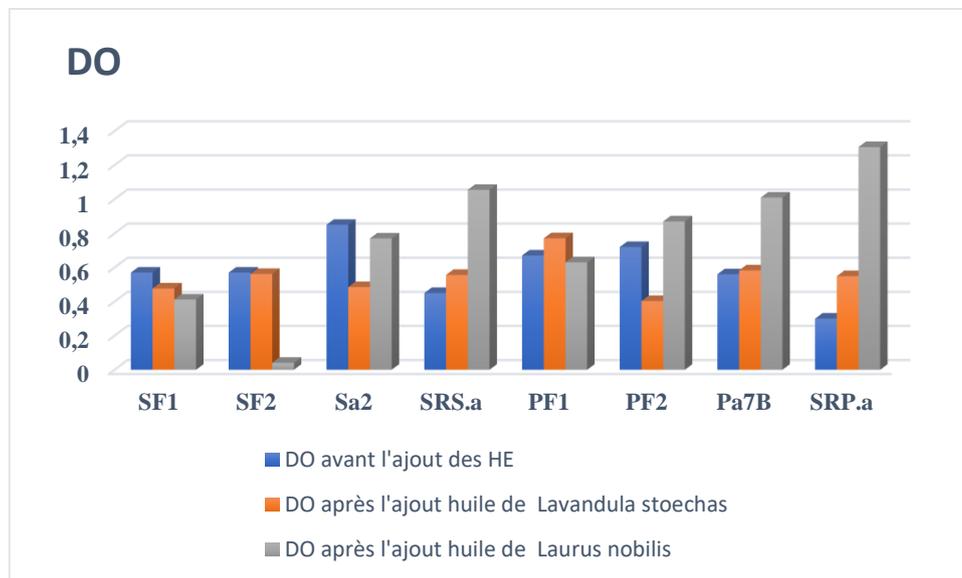


Figure 30 : Résultat de l'activité antibiofilm de *Lavandula stoechas* et *Laurus nobilis* sur les souches *S. aureus* et *P. aeruginosa* avant et après l'ajout des HEs.

D'après les résultats obtenus on remarque que *Lavandula stoechas* a un effet sur les souches SF1, Sa2, PF2 ou la densité optique a diminué à des valeurs de 0,477 ; 0,487 et 0,043 ; respectivement.

Et pour *Laurus nobilis* on remarque qu'elle a un effet sur les souches de *S. aureus* ;SF1, SF2, Sa2, PF1 ou la densité optique a diminué à des valeurs de 0,412 ; 0,041 ; 0,77 et 0,63; respectivement, et surtout sur la souche SF2 ou en remarque qu'il n'y a pas formation de biofilm. Pour les trois souches SF1, Sa2 et PF1 il y a une diminution légère de la formation de biofilm.

Les résultats obtenus montrent le potentiel du Laurier comme agent antibiofilm, notamment contre *S. aureus* (**Miao et al., 2017**), ces résultats concordent avec les résultats obtenus par **Molina et al., 2020**, qui montrent que HE étaient de puissants inhibiteurs de la biomasse du biofilm de *S. aureus* et par microscopie ils ont confirmé ces résultats et ont également révélé un effet létal sur les cellules présentes dans le biofilm .

D'après **Fradj et Seridji en 2021**, l'huile essentielle de *Laurus nobilis* de Sousse (*L. nob. S*) a exercé un effet anti-attachement avec un pourcentage d'inhibition du biofilm supérieur à 70 % contre toutes les souches testées.

Cette huile a montré selon **Merghni et al., 2016** un effet important sur l'inhibition et l'éradication du biofilm de *S. aureus*, aussi pour **Peixoto et al., 2017**, leurs résultats révèlent qu'HE de *Laurus nobilis* a des propriétés prometteuses contre la formation de biofilm.

Les résultats de (**Fradj et Seridji, 2021**) indiquent que les deux extraits de Laurier ont une action préventive sur la formation du biofilm de *S. aureus*.

La réduction de la densité cellulaire serait due à la forte concentration de l'huile essentielle du laurier en 1,8-Cineol ,qui présente une importante activité antibactérienne (**Alejo-Armijo et al., 2017**).

De ce fait, le QS et la communication intercellulaire sont interrompus et le développement du biofilm est inhibé (**El-Tarabily et al., 2021**).

Outre son activité antibactérienne, le 1,8-Cineol exercerait un effet anti-attachement des cellules planctoniques à la surface du support abiotique colonisé. Cet agent inhiberait également la mobilité des cellules planctoniques qui joue un rôle primordial dans le mécanisme du QS (**Merghni et al., 2018**).

Il a également été constaté que le 1,8-cinéole avait un effet significatif sur l'EPS. En effet, il réduirait de manière significative la production d'EPS. En même temps, le 1,8-cinéole réduirait considérablement l'activité hydrophobe des cellules planctoniques (**Karuppiah *et al.*, 2021**).



Conclusion

Les infections du pied diabétique restent une complication silencieuse du diabète, mais grave et constituent la cause la plus fréquente des amputations chez les patients diabétiques.

La visualisation microscopique combinée avec des approches moléculaires a confirmé que les biofilms polymicrobiens sont présents partout dans les ulcères du pied diabétique infectés et non cicatrisants, et qu'ils sont notoirement résistants aux antibiotiques conventionnels.

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

Notre étude effectuée sur un nombre de 12 patients présentant la symptomatologie d'une infection du pied diabétique, nous a permis de confirmer une dominance des infections du pied diabétique chez le sexe masculin avec un taux de 75% et chez la tranche d'âge des plus de 58 ans.

L'isolement des souches a permis de mettre en évidence la prédominance des bactéries du genre *Staphylococcus aureus*, suivie par *Pseudomonas auroginosa* qui sont connus pour leurs pouvoir pathogènes .

La gravité des infections du pied diabétique est étroitement liée à la capacité des souches à former un biofilm , ceci a été confirmé dans notre étude ou on remarque que toutes les souches isolées ont la capacité de produire un biofilm par la technique TCP et produisent un slime par la méthode RCA .

Les traitements des infections à biofilms sont complexes , car ils sont responsables de la tolérance aux antibiotiques. Si l'effet antibactérien de nombreuses huiles essentielles est depuis quelque décennie largement étudié, ce n'est que récemment qu'un certain nombre d'étude s'intéressent aux propriétés anti-biofilm, dont sont doté des HE, là où un bon nombre d'ATB demeurent inefficaces.

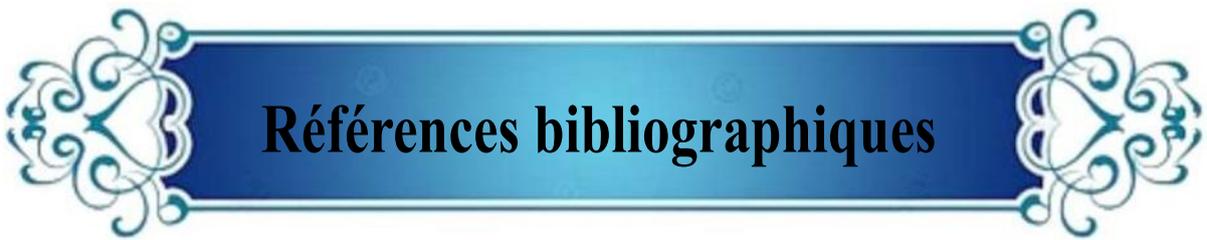
L'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* et *Laurus nobilis*, montrent qu'elles sont plus efficace sur les souches planctoniques de *Staphylococcus aureus* avec des zones d'inhibition variant entre 10 mm et 40 mm, que *Pseudomonas auroginosa* qui était plus résistante.

L'huile essentielle de *L.stoachas* présente une bonne activé antibiofilm contre trois souches bactériennes a l'expection de *SRS.a*, *PF7B*, *SRPa* et *PF1*. S'ajoute à cela une autre plante qui a

brillé par son efficacité remarquable sur l'inhibition de biofilm du staphylocoque c'est *L.nobilus*.

Toutefois, ces résultats restent préliminaires et afin de les approfondir, d'autres approches et études sont souhaitables à réaliser :

- Elargir l'étude antibactérienne sur la majorité des souches pathogènes provoquant des maladies graves.
- L'utilisation des huiles essentielles dans le traitement contre les infections associées aux biofilms.
- D'approfondir nos connaissances sur le mécanisme d'action des HEs afin d'inhiber l'installation de biofilm .
- Fabriquer des médicaments à base huiles essentielles pour remplacer les antibiotiques.
- Faire des études sur d'autres huiles essentielles qui n'ont pas été testés auparavant.



Références bibliographiques

A

- Ahmad, J. The diabetic foot. Diabetes Metab Syndr.National Library of medicine (National Centre for Biotechnology information) ,2016, Vol. 10. pp 49-50.
- Ait Lhaj Ou Said Z. Prise en charge en milieu d'urgence du pied diabétique. Th doct : médecine : Université de Médecine et de Pharmacie Marrakech,2014 ,p 02
- Akwah, L., Ntungwen Charles, F, Nukenine Nchinwan, E., Kagning Tsinda, E., Nwabo Kamdje, A H. Bacteriology of Diabetic Foot Ulcers with Reference to Multidrug Resistance Strains at the Yaounde Central Hospital (Cameroon). 2015, Vol .1(4), p 53 .
- Alejo-Armijo A., Altarejos J et Salido S. Phytochemicals and Biological Activities of Laurel Tree (*Laurus nobilis* L.). Natural Product Communications. 2017 .Vol 12 (5), pp 743-757.
- Ali-Shtayeh, M ; Yaniv ,Z ; Mahajna,J. Ethnobotanical survey in the Palestinian area: a classification of the healing potential of medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology.2000.Vol 73, pp221–232 .
- Amarir, M. Gestion Du Pied Diabétique En Milieu Traumatologique Orthopédique, Analyse Et Autocritique. Th. doct : Médecine : Université Mohammed V – Souissi,Rabat,2014, pp29-33.
- Amouyal C ; Hartemann A . Quelle antibiothérapie et pour quelle durée devant un tableau d'infection cutanée chez le patient diabétique avec une plaie ?.2017.Vol 42.p 68.
- Arciola C.R., Campoccia D., Baldassarri L., Donati M.E., Pirini V., Gamberini S., Montanaro L. Détection de la formation de biofilm chez *Staphylococcus epidermidis* à partir d'infections implantaires. Comparaison d'une méthode de PCR qui reconnaît la présence de gènes Ica avec deux méthodes phénotypiques classiques. J Biomed Mat Res .2005.Vol 76, pp425-430.
- Asimgil A. Sifali Bitkiler. İstanbulu Timas Yayınları.1997, pp147–148.
- Atefbeibu,E S I.Contribution a l'étude des tanins et de l'activité antibacterienne de acacia nilotica var adansonii.Th . doct :Pharmacie :Université Cheikh Anta Diop De Dakar , 2002,p7 .
- Azri, K. Les défis de l'industrie pharmaceutique face à la transition sanitaire en Algérie, 2018, Vol 14 (1), 55p.
- Azzoug, M. D. Pied Diabétique. Journal of Medical Sciences,2017, Vol 4(2), p 135.

B

- Bachiri ,L ; Echchegadda ,G ; Ibjibijen ,J; Nassiri , L. Etude Phytochimique Et Activité Antibactérienne De Deux Espèces De Lavande Autochtones Au Maroc : «*Lavandula stoechas* L. et *Lavandula dentata* L.» . European Scientific Journal October .2016. Vol.12(30), pp 1857 – 7881
- Bagamboula C.F., Uyttendaele M. and Debevere J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Higella sonnei* and *S. flexneri*, Food Microbiology, 2004; pp 33-42.
- Balouiri, M. Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne de trois extraits de Plantes Médicinales et Aromatiques cultivées dans le jardin de l'institut national des plantes médicinales et aromatiques -Taounate. Mémoire master : Sciences et Techniques : Biotechnologie Microbienne. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah-Taounate ;2011,9p.
- Banerjee, G. Comparative Study of Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients of Lower Respiratory Tract Infection. Journal of clinical and diagnostic research. 2014, 11 p.
- Barbier, E. Les lavandes et l'apiculture dans le sud-est de la France. Les Annales de l'Abeille. INRA Editions, 1963. Vol 6 (2). 88p.
- Barla, A ; Topcu,G; Ouksuz,S; Tumen,G; Kingston, DGI. Identification of cytotoxic sesquiterpenes from *Laurus nobilis* L. Food Chemistry. 2007. Vol 104, pp1478–1484.
- Bekhti N., Piras A., Belabdali F., Falconieri D., Guenaoui K., Fedoul F. F., Sekkal-Rahal M. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Laurus nobilis* leaves. Natural Product Research: 2020. pp 1-5.
- Bellifa S., Hafida H., Damien B., Nicolas C., Imane M. hamedi Ibtissem K.T., Merieme L., Wafae D., Christiane F. Evaluation of biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical devices at the University Hospital of Tlemcen, Algeria. Afr. J. Microbiol. Res. 2013 .Vol 07, pp 5558–5564.
- Bellifa, S. Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Th. doct : maîtrise du développement microbien : Université abou bekr belkaid, Tlemcen, 2014, pp14-55.
- Beloued, A. Plante médicinales d'Algérie. Offices des publications universitaires. 2005. pp 20-150.

- Ben moussa, M ; Khalfallah, M; Boutiba Ben Boubaker, I ; Nouira,R; Slim,A; Jerraya, H; Dziri.C. Bacteriological and therapeutic profile of diabetic foot infection: a prospective study of 100 patients. La tunisie medicale .2016 ; Vol 94 (2) ,p 101.
- Benabdelkader, T. Biodiversité, bio activité et biosynthèse des composés terpéniques volatils des lavandes ailées, *Lavandula stoechas* sensu lato, un complexe d'espèces méditerranéennes d'intérêt pharmacologique. Th. doct :Biologie et Ecophysiologie végétale : Université Jean Monnet-Saint Etienne faculté des sciences et techniques
- Benbouabdellah, S ; Ziane, D. Prévalence de souches de *Staphylococcus aureus* dans le lait cru et les produits laitiers artisanaux. Mémoire master : Microbiologie appliquée. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou,2015 ;p 60 .
- Bendjarsi, F Z; Tazerouti,F; Belkhef-Slimani,R; Djerdjouri ,B ; Meklati ,B Y. Phytochemical composition of the Algerian *Laurus nobilis* L. leaves extracts obtained by solvent-free microwave extraction and investigation of their antioxidant activity. Journal of Essential oil research,2016.Vol 14 (55) ,p 09.
- Bendjarsia, F Z. Etude de la composition chimique des extraits de *laurus nobilis* L. Th. doct : Chimie organique appliquée. L'université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, 2016 ,p 107.
- Berrada, S. Gestion du risque infectieux en hémodialyse par la mise en place d'une démarche qualité : cas du centre d'hémodialyse de l'hôpital EL Ghassani. Th doct .Faculté des sciences Dhar EL Mehrez Fès .2016 .
- Besse, J.-L. Le pied diabétique : place de la chirurgie orthopédique Revue de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique, 2011, Vol. 97. pp 315-318.
- Bezoui, M. Biofilms bactériens et leur implication en pathologie humaine. Th. doct : pharmacie : Université Mohammed V-Rabat. 2016.pp15-17.
- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review, International Journal of Food Microbiology,2004; pp 223-253.

C

- Cavanagh, H M A; Wilkinson, J M. Biological Activities of Lavender Essential Oil. 2002.pp305-306.
- Chakroun, M. Antibiothérapie des infections ostéo-articulaires aiguës communautaires à pyogènes.2007, Vol 01(02) ,p 36.

- Chatane,I; Ziadi,C. Analyse phénotypique et quantitatification de la formation de biofilm par les bactéries d'intérêt médical. Mémoire master : Microbiologie Générale et biologie Moléculaire des Microorganismes. Université des Frères Mentouri Constantine.2016 ; p 40.
- Cherrat, L. Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles de 5 plantes aromatiques et médicinales du Maroc et évaluation de leurs effets combinés avec des méthodes de conservation alimentaire. Th doct : Microbiologie : Université AbdelMalek Essaadi . 2013,p 167 .
- Chibi A. Thèse de doctorat. Evaluation de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* isolées de CHU Tlemcen.2015 .p79.
- Chidiac, C., Bru, J-P., Choutet, P ; Decazes, J-M ; Dubreuil, L ; Leport, C ; Bruno, L ; Perronne, C ; Pouchain, D ; Quinet, B ; Weinbreck, P. Recommandations pour la pratique clinique Prise en charge du pied diabétique infecté. Médecine et maladies infectieuses.2007, Vol. 37, pp.11-12.
- Christensen G. D, Simpson W.A, Younger J., et al.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. 1985.Vol 22 ;pp 996–1006.
- Chu, J C; Kemper, K J. Lavender (*Lavandula* spp.). Longwood Herbal Task Force: <http://www.mcp.edu/herbal/> .2001,p 32.
- Coban A., Ciftci A., Onuk E. Investigation of biofilm formation and relationship with genotype and antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis. Mikrobiyoloji Bulteni.2009.Vol 43 ,pp 563-573.

D

- Da Silveira, S M ; Luciano,F B ; Fronza ,N ; Cunha, A ; Scheuermann ,G N; Werneck Vieira,C R. Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7 C°.. LWT - Food Science and Technology .2014.p 08.
- Dallmeier K ; Carlini, E A.Anesthetic Hypothermic Myorelaxant and Anticonvulsant Effects of Synthetic Eugenol Derivatives and Natural Analogues.Pharmacology.1981.Vol 22,pp 113-127.

- Delaquis ,P J ; Stanich,K; Girard,B; Mazza , G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. International Journal of Food Microbiology .2002.Vol 74 ,pp 101 – 109.
- Demirci , F ; Guven ,K ; Demirci ,B ; Dadandi ,MY ; Baser, KHS . Antibacterial activity of two Phlomis essential oils against food pathogens . Food Control .2008. Vol 19 ,pp 1159–1164.
- Derwich E., Benziane Z. Et Boukir A. Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. Aust. J. Basic et Appl. Australian Journal of Basic and Applied Sciences,2009; pp3818-3824
- Diane, S.C; Luce, L. L’ulcère du pied diabétique. 2017.Vol 14(01) ,p 41.
- Dias, M I ; Barros,L; Dueñas ,M; Alves ,R C ; Oliveira,M BPP; Santos-Buelga,C; Ferreira ,I CFR. Nutritional and antioxidant contributions of *Laurus nobilis* L. leaves: Would be more suitable a wild or a cultivated sample?. Food Chemistry.2014.Vol 156, pp 339–346.
- Dinh, L; Veves, A. A review of the mechanisms implicated in the pathogenesis of the diabetic foot. Int J Low Extrem Wounds. National Library of medicine (National Centre for Biotechnology information) ,2005, Vol. 4. p 155 .
- Djendli, S ; Bouali, L. Etude de l’activité antibactérienne des huiles essentielles de la plante médicinale « *Eucalyptus globulus* ». Mémoire master : Biochimie Appliquée. Université Frères Mentouri, Constantine 1,2022 ; pp 34-37.
- Dorman, H.J.D; Deans , S G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology . 2000, Vol 88,pp 308–316.
- Durgad S, Koticha A, Nataraj G, Deshpande A, Mehta P. Diabetic foot ulcers—where do we stand microbiologically? International Journal of Diabetes in Developing Countries. 2014.Vol34(3);pp169-173.

E

- Edmonds, M. The treatment of diabetic foot infections: focus on ertapenem. Vascular Health and Risk Management .2009, Vol 05, pp 949-963
- El Allali, B. Prise En Charge Chirurgicale Du Pied Diabetique. Th. doct: Medicine: Universite mohammed v, rabat ,2015,p 52.
- El Malti, J E ; Amarouch, H. Antibacterial effect, histological impact and oxidative stress studies from *Laurus nobilis* extract. urnal of Food Quality.2009. Vol 32, pp190–208.

- El Ouarradi, A. Pied Diabétique : Profil Epidémiologique Thérapeutique Et Pronostique. Th doct : Médecine. Université Cadi Ayyad, Marrakech ,2019, pp 02-55.
- Elharas, K ; Daagare, A ; Mesfioui ,A ; Ouhssine, M. Activité antibactérienne de l'huile essentielle des inflorescences de *Laurus Nobilis* et *Lavandula Angustifolia*. Afrique Science. 2013.Vol 09(2) , pp134 – 141.
- El-Tarabily K.A., El-Saadony M.T., Alagawany M., Arif M., Batiha G.E., Khafaga A.F., Elwan H.A.M., Elnesr S.S et El-Hack M.E. Using essential oils to overcome bacterial biofilm formation and their antimicrobial resistance. Saudi Journal of Biological Sciences.2021. Vol 28 (9), pp 5145-5156.

F

- Falanga, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. Lancet, 2005; Vol 366, pp 1739-1740.
- Fathalahi,S. Interêt et principales utilisations à l'officine de six huiles essentielles à activite antibacterienne. Th. doct : Pharmacie : Université de Lille, 2020,p59.
- Festy, D ; Dupin, C.La lavande, c'est malin : Huile essentielle, fraîche ou séchée, découvrez les incroyables vertus de cette fleur, pour la beauté, la santé, la maison, Ed.Leduc's.2012.
- Filloux A,Vallet, I. Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. Med Sci (Paris).2013.Vol 19,pp 77–83.
- Fradj ,M ; Seridji,H. Etude de quelque effets biologiques des extraits du Laurier "*Laurus nobilis* ".Mémoire Master : Biochimie Appliquée . Université Mohamed Khider de Biskra.2021 ;pp34-36.
- Fromantin, I. Florence, R ; Maxime, C ; Marguerite, N. Biofilm et plaies. Revue Francophone de Cicatrisation .2017, Vol 1 (2).p 10.

G

- Gadepalli, R; Dhawan, B; Sreenivas, V; Kapil, A; Ammini, AC; Chaudhry, RA. Clinico-microbiological study of diabetic foot ulcers in an Indian tertiary care hospital. Diabetes Care. 2006. Vol 29, p 1727.
- Game, F., Jeffcoate, W. MRSA and osteomyelitis of the foot in diabetes. Diabetic Medicine.2004, Vol .21(s4), pp .16-19.

- Gardner, E S; Haleem, A ; Jao,L-Y; Hillis, S L; Femino,J E ; Phisitkul,P; Heilmann,K P ; Lehman,S M; Franciscus C L. Cultures of Diabetic Foot Ulcers Without Clinical Signs of Infection Do Not Predict Outcomes.2014.Vol 37,p2697
- Garnier F, Denis F. Bactériologie médical : Techniques usuelles : Cocci à Gram positif. Masson. Chapitre. 2007.Vol 29,pp 251- 254.
- Gasmi,K ; Sahraoui,H. Antibiorésistance des souches bactériennes impliquées dans les infections du pied diabétique.Mémoire master : Microbiologie Appliquée. Université Kasdi Merbah-Ouargla,2018 ;p 40.
- Giray, E S ; Kırıcı ,S ; Kaya,D A; Turk,M; Sonmez ,O; Inan.,M. Comparing the effect of sub-critical water extraction with conventional extraction methods on the chemical composition of *Lavandula stoechas* . Talanta .2008.Vol 74, pp930–935.
- Gören ,A C ; Topcu ,G; Bilsel ,G; Bilsel,M; Aydogmus ,Z; Pezzuto.J M. The Chemical Constituents and Biological Activity of Essential Oil of *Lavandula stoechas* ssp. *Stoechas*.2002.p798.
- Goudjil , M . Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de trois plantes aromatiques. Mémoire master : Genie des procedes et environnement.Universite kasdi merbah – Ouargla, 2016, pp05-07.
- Grumbach, M.-L., Richard, J.-L. Pour La Prévention Et Le Traitement Local Des Lésions Des Pieds Chez Les Diabétiques,2005, p 06 .
- Guitton, Y. Diversité des composés terpéniques volatils au sein du genre *Lavandula* : aspects évolutifs et physiologiques. Th. doct : Biologie et Physiologie Végétales : Université de Saint-Etienne - Jean-Monnet, 2011,pp 49-51.
- Guzmán-Soto, I., McTiernan, C., Gonzalez-Gomez, M., Ross, A., Gupta, K., Suuronen, E J., Mah, T-F; Griffith, M; Alarcon, E I. Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in in vitro and in vivo biofilm models. iScience,2021. Vol 24(5), pp 03-08.

H

- Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. Cellular
- Ham, A; Shin ,J; Oh ,K; Lee,S-J; Nam,K-W; Koo,U; Kim,K H; Mar ,W. Neuroprotective Effect of the n-Hexane Extracts of *Laurus nobilis* L. in Models of Parkinson’s Disease. Biomol Ther. 2011.Vol 19(1), pp 118-125.

- Hanoune, S. La flore bactérienne colonisant le pied diabétique:étude prospective et rétrospective.. Mémoire master : Biologie Moléculaire des Microorganismes. Université des Frères Mentouri Constantine .2020, p 46.
- Hartemann-Heurtier, A ; Senneville, E. Diabetic foot osteomyelitis. Diabetes and Metabolism .2008, Vol 34, pp 92-93.
- Haussein, M.H. A review of beekeeping in Arab countries, Bee World .2000.Vol 81,pp56-71.
- Hola V; Ruzicka F. The Formation of Poly-Microbial Biofilms on Urinary Catheters. 2011.pp 157-159.
- Houicher A., Hechachna H., Teldji H., &Ozogul F. In vitro study of the antifungal activity of essential oils obtained from *Mentha spicata*, *Thymus vulgaris*, and *Laurus nobilis*. Recent patents on food, nutrition & agriculture.2016.Vol 8(2) , pp99-106.

I

- Iguer, A . Etude comparative des activités antimicrobiennes de quelques extraits végétaux.Mémoire Master : Génie de l'Environnement . Ecole nationale supérieure polytechnique. 2009 ,p05.

J

- Jadid L. Aspects microbiologiques des prélèvements au cours des infections du pied diabétique : Etude rétrospective sur cinq ans à l'HMIMV (2009-2014). Faculté de médecine et de pharmacie-Rabat, Université Mohammed V Souses; 2015.
- Jeffcoat, G. F. The role of proinflammatory cytokines in the cause of neuropathic. National Library of medicine (National Centre for Biotechnology information) ,2005, Vol 366, pp 2059-2060.
- Jeffrey K. A., Dphil, M B , Hon FBPhS, Hon FFPM. *Lauraceae*. Dans K. Aronson, Meyler's Side Effects of Drugs 16th Edition The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions. Isbn: Elsevier Science .2016,pp. 484-486.
- Julien, C.A. Etat des lieux de la prise en charge du pied de Charcot diabétique en France : étude EPiChar. Th. doct: Médecine: Université de montpellier,2020, p 33.
- Jullien J. Guide de reconnaissance Plantes hôtes potentielles de *Xylella fastidiosa* subsp. Multiplex en France, Surveillance biologique du territoire (SBT) dans le domaine végétal,

Symptôme d'une infection de *Xylella fastidiosa* subsp. *multiplex* sur *Polygala myrtifolia* – 1ère édition, France,2016,47p.

K

- Kara Terki I. Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Telemcen .Th doct : Biologie cellulaire et biochimie :Université Abou Bakr Belkaid, Telemcen.2014 ,p33.
- Karuppiah V., Thirunanasambandham R et Thangaraj G. Anti-quorum sensing and antibiofilm potential of 1,8-cineole derived from *Musa paradisiaca* against *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.2021. Vol 37(4).
- Kavanaugh NL, Ribbeck K. Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Appl Envir Microbiol*. 2012 ;Vol 78(11) ; pp 4057-4061.
- Khan, F., Oloketuyi, S. F., et Kim, Y. M. Diversité des bactéries et des produits bactériens comme anti-biofilm et antiquorumsensant les médicaments contre les bactéries .2019.Vol 20(11) ; pp1156-1179.
- Kheyar, N; Meridja,D; Belhamel,K. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia . *Algerian Journal of Natural Products*.2014.Vol 2(1),pp 18-26.
- Kone, A.B. Profils clinique et bactériologique de l'atteinte des extrémités chez les patients diabétiques a l'hôpital du mali. Th. doct: Médecine: Université des sciences ; des techniques et des technologies de Bamako ,2021,p 15.
- Kostakioti, M; Hadjifrangiskou M; Hultgren J S. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. 2013.pp 03-05.

L

- Lamri, L; Gripiotis, E; Ferrario, A. Diabetes in Algeria and challenges for health policy: a literature review of prevalence, cost, management and outcomes of diabetes and its complications. *Globalization and Health*. 2014. Vol 10, pp 07-14.

- Lavigne, J-P ; Sotto, A. Recommandations pour la bonne pratique du prélèvement microbiologique dans les infections cutanées et osseuses : à propos du pied diabétique. 2007.Vol 159, p 30.
- Leone, S; Pascale, R; Vitale, M; Esposito, S. Epidemiology of diabetic foot. *Le Infezioni in Medicina, Suppl.*2012.Vol 1, pp 8-13.
- Lipsky, B A. Medical treatment of diabetic foot infection. *Clin Infect Dis.* 2004. Vol 39, pp S107-S109.
- Lipsky, B A., Berendt, A R., Deery, H G., Embil, J M., Joseph, W S., Karchmer, A W., Lefrock, J L; Lew, P D; Mader, T J; Norden, J; Tan, S J. Diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Guideline for diabetic foot infections.* 2004. Vol 39, pp S226-S227.
- Lipsky, BA. Infectious problems of the foot in diabetic patients. 2008.Vol 14 ,p 306.
- Lipsky, BA; Berendt, AR; Cornia, PB; Pile, JC; Peters, EJ; Armstrong, DJ; Deery, HG; Embil, JM; Joseph, WS; Karchmer, AW.; Pinzur, MS; Senneville, E.2012 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Diabetic Foot Infections. *Clin Infect Dis.* 2012, Vol 54,p e133.
- Lipsky, BA; Peters, EJ; Berendt, AR; Senneville, E; Bakker, K; Embil, JM; Lavery, LA; Urbancic-Rovan, V; Jeffcoate, WJ. International Working Group on Diabetic Foot: Specific guidelines for the treatment of diabetic foot infections 2011, 2012 *Diabetes Metab Res Rev* 28 Suppl, pp234-235.
- Lushiku, E B (2006). Le pied diabétique. *Rev Med Brux.* 27, pp S317-S 318.

M

- Maatallah., S ; Nasri ,N ; Hajlaoui,H ; Albouchi , A ; Elaissi,A. Evaluation changing of essential oil of laurel (*Laurus nobilis* L.) under water deficit stress conditions. *Industrial Crops and Products* .2016.Vol 91,pp 170–178 .
- Mack D.,Fischer W., Krokotsh A.,Leopold K.,Hartmann R., Egge H., Laufs R.The intercellular adhesion involed in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan : purification and structural analysis.*Journal of Bacteriology.*1996,Vol 43; pp 113-125 .
- Maganga, A. influence of Variety and Organic Cultural Practices on Yield and Essential Oil Content of Lavender and Rosemary in Interior BC. Prepared for South Thompson

- Organic Producers Association (STOPA): Ecorational Technologies, Kamloops, BC.2004,p 6.
- Majtan .J., Bohova.J., Miroslava. H. Anti-Biofilm Effects of Honey Against Wound Pathogens *Proteus Mirabilis* and *Enterobacter Cloacae*: Honey kills wound biofilm.Phytotherapy Research .2014.Vol 28 (1) , pp 69-75.
 - Malgrange, D. Physiopathologie du pied diabétique La revue de médecine interne,2008, Vol. 29. pp S232-S234.
 - Malone, M; Bjarnsholt, T; McBain, A.J; James, G.A; Stoodley, P; Leaper, D; Tachi, M; Schultz, G; Swanson, T; Wolcott, R.D. The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published 0data. 2017.Vol 26(01) ,24p.
 - Maroselli, C. Le pied diabétique physiopathologie, nouvelles thérapeutiques et place du pharmacien d'officine. Th. doct : Pharmacie : Université Joseph Fourier Faculté de Pharmacie de Grenoble, 2002, pp16-26.
 - Martini, J ; Senneville, E. Le pied diabétique. MCED .2018. Vol 92, p 96.
 - Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay D., Fatma T., Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: An evaluation of three different screening methods. 2006.Vol 24(01), p 26 .
 - Maxia , A; Marongiu ,B; Piras ,A; Porcedda , S; Tuveri ,E; Gonçalves ,M J; Cavaleiro , C; Salgueiro , L. Chemical characterization and biological activity of essential oils from *Daucus carota* L. subsp. *carota* growing wild on the Mediterranean coast and on the Atlantic coast. Fitoterapia.2009.Vol 80 ,57–61.
 - Méar J-B. Étude de la modulation de la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* par *Candida albicans* dans un modèle de pneumonie. Th doct :Université Lille nord de France, France.2014.
 - Medjati, I ; Matrak, N E-H ; Etude de la resistance des bacteries isolees a partir des plaies chroniques du pied diabetique . Mémoire master : Microbiologie et Contrôle de qualité. Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen,2020 ;p 21.
 - Mennal H ; Chennafi,S. Synthèse bibliographique des résultats de recherche sur l'application des huiles essentielles de quelques espèces de la famille des lamiacées obtenues à l'Université de Khemis Miliana . Mémoire master : Sciences et Techniques des Productions Animales. Université de Khemis Miliana. 2015 ,p14.
 - Merghni A., Noumi E., Hadded O., Dridi N., Panwar H., Ceylan O et Snoussi M. Assessment of the antibiofilm and antiquorum sensing activities of *Eucalyptus globulus*

- essential oil and its main component 1,8-cineole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Microbial Pathogenesis*.2018. Vol 118, pp74-80.
- Meriemeche,L ; Nadir,F . Etude de la formation de biofilms associés aux plaies chroniques du pied diabétique. Mémoire master : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes. Université des Frères Mentouri Constantine,2016 ;p 25.
 - Miao J., Liang Y., Chen L., Wang W., Wang J., Li B., Xu Z. Formation and development of *Staphylococcus* biofilm: With focus on food safety. *Journal of Food Safety*.2017.Vol 37(4) ,p e12358.
 - Molina R. D. I., Campos-Silva R., Díaz M. A., Macedo A. J., Blázquez M. A., Alberto M. R., & Arena M. E. Laurel extracts inhibit *Quorum sensing*, virulence factors and biofilm of foodborne pathogens. *LWT*,2020.Vol 134,pp 109-899.
 - Muhammad M. H., Idris A. L., Fan X., Guo Y., Yu Y., Jin X., ... Huang T. Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. *Front Microbiol*,2020. Vol 11, p 928.
 - Musk D.J., Banko D.A., and Hergenrother P.J. Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry & Biology*; 2005 .Vol 12,pp 789– 796.

N

- Nadeem, M ; Aasim, M ; Kırıcı,S ; Karık, Ü ;Nawaz,M A ; Yılmaz,A; Maral,H; Khawar,K M; Baloch, F S. Laurel (*Laurus nobilis* L.): A Less-Known Medicinal Plant to the World with Diffusion, Genomics, Phenomics, and Metabolomics for Genetic Improvement. Springer Nature Singapore Pte Ltd.2018,p 653.
- Nadkarni,K M. Indian materia medica. 3 éme edition . Bombay -Indian .1982 , p 1272.
- Namvar A.E., Asghari B., Ezzatifar F., Azizi G., and Lari A.R. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *GMS Hygiene and Infection Control*; 2013.Vol 8(1) , pp2196-5226.
- Nasr, S.A., Abushady, H.M., Hussein, H.S. Biofilm formation and presence of *ica* AD gene in clinical isolates of staphylococci. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 2012.Vol 13,p 270.
- Nirwati H., Sinanjung K., Fahrnunissa F., Wijaya F., Napitupulu S., Hati V.P., Hakim M.S., Meliala A., Aman A.T., Nuryastuti T. Biofilm formation and antibiotic resistance of

Klebsiella pneumoniae isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. BMC Proc.2019.Vol 13,p20.

- Nordmann, P., Poirel, L. Résistances aux antibiotiques émergentes et importantes chez les bactéries Gram négatif : épidémiologie, aspects théoriques et détection. Maladies infectieuses. 2014, Vol. 427(16), p 902 .

O

- O'Toole, G. A., Kaplan, H. B., Kolter, R. Biofilm formation as microbial development. The Annual Review of Microbiology. 2000.Vol 54, pp 49-79.
- Omar, A; Wright, J. B; Schultz, G; Burrell, R; Nadworn, P. Microbial Biofilms and Chronic Wounds.2017.Vol 05 ,p 02.
- OMS. Programme Diabète de l'OMS [en ligne]. (consulté le 30.10.20) <https://www.who.int/diabetes/fr/> (accessed 10.30.20).
- Oncel S., Pinar E., Sener G., Calli C., Karagoz U. Evaluation of bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis. Journal of Otolaryngology--Head & Neck Surgery,2010.Vol 39(1).
- Ouibrahim, A ; Tlili-ait Kaki,Y ; Bennadja,S ; Mansouri,R ; Ait Kaki ,S ; Khbizi ,S ; Djebar, M R. Activité antioxydante et anti-candidosique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. provenant de la région d'El Kala (Nord–Est Algérien) . Algerian Journal of Natural Products . 2015. Vol 3(3), pp209-2016.

P

- Peixoto, L R; Rosalenb ,P L ; Silva Ferreiraa ,G L ; Freiresb ,I A; De Carvalho , F G ; Castellano ,L R ; De Castro ,R D. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. Archives of Oral Biology .2017. Vol 73, pp179–185.
- Pessereau, C. Etude de facteurs biotiques et abiotiques qui contrôlent l'implantation des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* dans les réseaux de distribution d'eau thermale. Th. doct : Microbiologie / Environnement. Université Nantes Angers Le Mans France,2016,p 42.
- Pibiri.M C . Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Th doct : Environnement Naturel, Architectural Et Construit : École Polytechnique Fédérale De Lausanne , Canada . 2005.p36.

- Poliana, C M; Ferreira , L M ; Filho ,AN; Zafalon ,L F; Vicente ,HIG ; Souza ,V. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. Brazilian Journal of Microbiology .2013.Vol 44(1) , pp119-124.
- Ponce A.G., Fritz R., De Lvalle C. Et Roura S.I. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Lebensm.- Wiss.u.-Technol,2003.Vol 36 , pp679-684.
- Poole, K. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. 2001 ;pp 500-508.

R

- Rabin, N ; Zheng, Y ; Opoku-Temeng ,C ; Du, Y ; Bonsu, E ; O Sintim, H . Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. 2015.Vol 7(4),pp498-499
- Racha A. N., Abu Shady H.M., Hussein H.S. Biofilm formation and presence of icaAD gene in clinical isolates of staphylococci. Egyptian Journal of Medica. Human and Genetic 2012.Vol 13, pp 269–274.
- Ravisekhar,G M ; Benu,D ; Vishnubhatla , S ; Arti , K ; Ammini , A C; Chaudhr, Y R. A Clinico-microbiological Study of Diabetic Foot Ulcers in an Indian Tertiary Care Hospital. Diabetes Care .2006. Vol 29(8),p1732.
- Ren, Y; Wang, C; Chen, Z; Allan, E; van der Mei, H C; Busscher, H J. Emergent heterogeneous microenvironments in biofilms: substratum surface heterogeneity and bacterial adhesion force-sensing. 2018. Vol 42.p268.
- Rewatkar A.R, Wadher B.J . Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa-biofilm formation methods. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences,2013.Vol 8(5);pp 36-40.
- Richard JL, Lavigne JP, Got I, et al. Management of patients hospitalized for diabetic foot infection: results of the French OPIDIA study. Diabetes & metabolism. Jun 2011.Vol 37(3);pp208-215.
- Roeckl-Wiedmann, I; Bennett, M; Kranke, P. Systematic review of hyperbaric oxygen in the management of chronic wounds. British Journal of Surgery. 2005. Vol 92, p24.
- Rose, G W ; Schultz, G .Les biofilms : une énigme clinique Reconnaissance et prise en charge des plaies recouvertes d'un biofilm.Wound Care Canada .2012,Vol 10 (01), p 39.

- Roux, A ; Ghigo, J-M. Les biofilms bactériens. Bulletin de l'Académie vétérinaire de France.2006, Vol (1), p 261.
- Russel, A. D. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and pharmaceutical preservatives. Journal of Applied Bacteriology .1991.Vol 71 ,pp 191-201.

S

- Said, H. M. Medicinal Herbs, Bait al-Hikmah, Madinat al-Hikmah: Pakistan. 1996.Vol 1.
- Saitou K., Furuhashi K., Kawakami Y., Fukuyama M. Biofilm formation abilities and disinfectant-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cockroaches captured in hospitals. Biocontrol science.2009, Vol 14(2), pp 65-68.
- Sambyal, S S; Sharma, p; Shrivastava,D. Anti-biofilm Activity of Selected Plant Essential Oils against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* . Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.2017.Vol 6(3) ,pp 444-450.
- Saviuc C-M,Drumea V, Olariu L ,Chifiriuc M-C,Bezirtzoglou E,Veronica L. Essential Oils with Microbicidal and Antibiofilm Activity .2015 ; Vol 16(02) ;pp137-151.
- Saxena S., Banerjee G., Garg R., Singh M. Comparative Study of Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients of Lower Respiratory Tract Infection. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2014.Vol-8(5) , pp 09-11.
- Sedef Nehir, E ; Karagozlu ,N ; Karakaya,S ; Sahn ,S. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils Extracted from *Laurus nobilis* L. Leaves by Using Solvent-Free Microwave and Hydrodistillation. Food and Nutrition Sciences, 2014.Vol 5, pp 97-106 .
- Seneviratne C.J . Microbial Biofilms: Omics Biology, Antimicrobials and Clinical Implications. Boca Raton: CRC Press. 2017.Vol 13; p978
- Sharma, VK;Khadka, P B;Joshi,A; Sharma, R. Common pathogens isolated in diabetic foot infection in Bir Hospital. Kathmandu University Medical Journal. 2006, Vol 4(3), , pp 295-301.
- Siddiqui, M A; Khalid, M ; Akhtar, J; Badruddeen, S HH ; Ahmad, U; Ahsan, F ; Khan, M M ; Ahamd, M; Ali, A.Lavandula Stoechas (Ustukhuddus): A miracle plant.JIPBS.2016, Vol 3 (1), pp 96-102.
- Simou, F. Pied diabétique et pratiques traditionnelles. Th. doct: Médecine: Université Cadi Ayyad Marrakech,2020, pp 42-46.

- Skoula, M ; Abidi, C ; Kokkalou, E. Essential Oil Variation of *Lavandula stoechas* L. ssp. *Stoechas* Growing Wild in Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology*, 1996. Vol.24(3), pp. 255-260.
- Snuossi, M ; Trabelsi, N ; Ben Taleb, S ; Dehmeni, A ; Flamini G ; De Feo, V. *Laurus nobilis*, *Zingiber officinale* and *Anethum graveolens* Essential Oils: Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities against Bacteria Isolated from Fish and Shellfish. *Molecules* .2016, Vol 21, p 20.
- Sosa, S ; Altinier, G ; Bracab, P A ; Morelli, I ; Loggia, R D . Extracts and constituents of *Lavandula multifida* with topical anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*. 2005; Vol 12, pp 271–277.
- Sotto, A ; Dunyach, R. C ; Lavigne, J.P. Le microbiote cutané : étude de la diversité microbienne et de son rôle dans la pathogénicité. *Revue Francophone des Laboratoires special issues*. 2015, Vol 46. p 56 .
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B.S., Vabic-Vlahovic, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 2000. Vol 40, p 177 .
- Suzuki Y., Kaji S., Nisjiyama M., Iguchi A. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected from river water in Japan to antipseudomonal agents. *Science of the Total Environment*, 2015; pp 148-154.

T

- Taarabt, K O ; Koussa, T ; Najib Alfeddy, M. Caractéristiques physicochimiques et activité antimicrobienne de l'huile essentielle du *Laurus nobilis* L. au Maroc. *Afrique Science* .2017. Vol 13(1) ,pp 349 - 359.
- Tajkarimi, M.M; Ibrahim, S.A; Cliver, D.O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* .2010. Vol 21, pp 1199–1218.
- Tomar O., Akarca G., Gok V et Ramadan M.F. Composition and Antibacterial Effects of Laurel (*Laurus nobilis* L.) Leaves Essential Oil. *Journal Of Essential Oil*. 2020; Vol 23 (2), 414-421.
- Toty, A A; Guessennd, N; Bahi, C; Kra, A. M; Otokore, D. A; Dosso, M. Évaluation in-vitro de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *Harungana madagascariensis* sur la croissance de souches multi-résistantes. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. 2013. Vol 82, pp 12 - 21.

- Touati, A., Achour, W., Abbassi, MS., Ben Hassen, A. Détection des gènes ica et de la production de slime parmi des souches de *Staphylococcus epidermidis* isolées d'infections liées aux cathéters chez des patients neutropéniques, Pathologie Biologie. 2007.Vol 55, p 278.
- Toumi, A., Bernard, L., Chakroun, M. Antibiothérapie des infections du pied diabétique. Revue Tunisienne d'infectiologie.2011, Vol : 5, pp .62-63.
- Toyofuku, M; Inaba, T; Kiyokawa, T; Obana, N; Yawata, Y; Nomura, N. Environmental factors that shape biofilm formation. 2016.Vol 14 .p 01.
- Turhan V, Mutluoglu M, Acar A, et al. Increasing incidence of Gram-negative organisms in bacterial agents isolated from diabetic foot ulcers. Journal of infection in developing countries.2013.Vol7(10);pp707-712.

U

- Ulbrecht, JS ; Cavanagh, PR, Caputo, GM. Foot problems in diabetes: an overview. Clin Infect Dis, 2004, Vol 39 (02), p S77.
- Usmanghani ,K ;Saeed, A.Indusyunic Medicine. Traditional Medicine of Herbal, Animal and Mineral Origin in Pakistan, University of Karachi. University of Karachi Press,1997, p 273 .

V

- Veves, A; Falanga, V; Armstrong, DG; Sabolinski, ML. Graftskin, a human skin equivalent, is effective in the management of noninfected neuropathic diabetic foot ulcers: a prospective randomized multicenter clinical trial. Diabetes Care ,2001, Vol 24, p 290 .

W

- Wolcott, RD., Phillips, PL. Fletcher.J. Biofilm made easy. 2011, Vol 1(3). p 01.
- Wu, Y.-K., Cheng, N.-C., Cheng, C.-M. Biofilms in Chronic Wounds: Pathogenesis and Diagnosis. Trends in Biotechnology. 2019.Vol 37,p 01 .

Z

- Zhang, P; Lu, J; Jing, Y; Tang, S; Zhu, D; Bi, Y. Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis. Annals of Medicine. 2017. Vol 49, pp 107-109.

- Zhao, G; Usui, M L; Lippman, S I; James, G A; Stewart, P S; Fleckman, Ph; Olerud, J E. Biofilms and Inflammation in Chronic Wounds.2013. Vol 00, pp 03-04.
- Zmantar T., Kouidhi B., Miladi H., Mahdouani K., Bakhrouf A. A Microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. New microbiologica .2010.Vol 33,pp 137-145.
- Zouad,A; Siari ,R. Initiation à la recherche sur la formation de biofilms par quelques bactéries cliniques isolées à partir des lésions du pied diabétique. Mémoire Master : Biologie Moléculaire des Microorganismes. Université des Frères Mentouri Constantine.2020 ;pp13-27.



Annexe

Annexe 1

« Fiche de renseignement »

DATE :

NOM :

PRENOM : TEL :

NE :

ÂGE :

SEXE : H F

VILLE : Région :

QUELLE EST VOTRE TAILLE :

/.....//...../...../ m

QUEL EST VOTRE POIDS :

/.....//...../...../ kg

TYPE DE DIABÈTE : Type I Type II

DURÉE D'ÉVOLUTION (depuis la découverte)

.....

TTT : oui non Insuline ADO PIED DIABETIQUE : Oui Non TYPE DE LÉSIONS : GANGRENE MAL
PERFORANTNIVEAU : ORTEILS AVANT PIED PIED JAMBE CUISSSE

Annexe 2

« Milieux de culture »

I Les milieux de cultures liquides :**1 Brain heart broth BHIB (pH =7.4) :**

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

**II - Les milieux de cultures solides :****1 Milieu de Chapman (pH =7.6) :**

- Extrait de viande (bovin ou porcin).....1g
- Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin)....10g
- Chlorure de sodium.....75g
- Mannitol.....10g
- Agar.....15g
- Rouge de phénol.....0,025g

**2 Milieu Mac Conkey :**

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



- Rouge neutre.....0,03g
- Chlorure desodium.....05g
- Ag.....13g
- ZnSO4.....0,07g

3 Gélose Cétrimide

- Peptone de gélatine.....16.0 g
- Peptone de caséine.....10.0g
- bromure de tétradonium (cétrimide).....0.2 g
- acide nalidixique.....15.0mg
- sulfate de potassium.....10.0 g
- Chlorure de magnisium1.4g
- Agar.....10.0g



4 Gélose nutritive inclinée pour la conservation (pH =7.3) :

- Peptone.....10.0g
- Extrait de viande.....5g
- Chlorure de sodium.....5g
- Agar.....10.0g



5 Gélose Mueller-Hinton (MH) (pH =7.3) :

- Infusion de viande de boeuf..... 300ml
- Peptone de caséine.....17.5g
- Amidon de mais.....1.5g
- Agar.....10.0g



9 Rouge Congo Agar (pH=7) :

- TSB..... 37g
- Saccharose.....50g
- Rouge Congo..... 0.8g

- Agar10g
- Eau distillée..... 1L



Annexe 3

	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	
														Proba	typicité	Incompa.	Test sur proba	Test sur typicité								
1	Staphylococcus aureus													0,962	0,28	0	Excellente Id	Bonne typicité								
2	Staphylococcus epidermidis													0,009	-0,02	1	mauvaise indentific	mauvaise typicité								
3	Staphylococcus sciuri													0,008	-0,03	1	mauvaise indentific	mauvaise typicité								
4	Staphylococcus hominis													0,007	0,12	0	mauvaise indentific	mauvaise typicité								
5	Staphylococcus simulans													0,007	0,00	0	mauvaise indentific	mauvaise typicité								
	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	INT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	IMG	ADH	URE	LSTR	classement	P(taxon/ profil)	P(taxon/ profil)	P(plus typique)	T	
	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	?					#####	
	100	100	95	96	88	91	80	0	0	83	97	78	1	0	97	2	90	80	80	0	1	#####	96,2%	#####	0,28	

Figure : Identification du catalogue analytique API® Staph

	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	
														Proba	typicité	Incompa.	Test sur proba	Test sur typicité								
1	Pseudomonas aeruginosa													1,000	0,57	0	Excellente Id	TB typicité								
2	Ralstonia pickettii													0,000	-0,01	0	mauvaise indentific	mauvaise typicité								
3	Burkholderia pseudomallei													0,000	-0,15	0	mauvaise indentific	mauvaise typicité								
4	Pseudomonas fluorescens													0,000	-0,01	0	mauvaise indentific	mauvaise typicité								
5	Burkholderia cepacia													0,000	-0,17	0	mauvaise indentific	mauvaise typicité								
	N03	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU _b	APA _a	MNE _a	MAN _b	NAGA	MAL _a	GN _{1a}	CAPA	AD _{1a}	ML _{1a}	CT _{1a}	PAC _a	OX	classement	P(taxon/ profil)	P(taxon/ profil)	P(plus typique)	
	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	?				
	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	36	20	96	99	94	93	100	16	#####	0,0%	#####	

Figure : Identification du catalogue analytique API 20 NE

ملخص

يُعرف مرض السكري بأنه مرض أيضي مزمن، ويعتبر من أحد التحديات الصحية الرئيسية في القرن. تدريجيًا، يمكن أن يتلف هذا المرض العديد من أعضاء جسم الإنسان ويزيد من خطر الإصابة بقرحة القدم. تتميز هذه المضاعفات الخطيرة بتكوين غشاء حيوي مقاوم للمضادات الحيوية.

الهدف من عملنا هو دراسة تقييم تكوين الأغشية الحيوية للبكتيريا المعزولة عن القدم السكرية على مستوى خدمة الطب الباطني، CHU Tlemcen، من خلال طرق نوعية وكمية مختلفة، وثانيًا سنختبر التأثير المضاد للبكتيريا والأغشية الحيوية للزيوت الأساسية في *Laurus nobilis* و *Lavandula stoechas* على السلالات المعزولة.

جعل عزل سلالات الأقدام السكرية من الممكن تسليط الضوء على هيمنة البكتيريا من جنس *Staphylococcus aureus*، متبوعًا بـ *Pseudomonas auroginosa*، جميع السلالات المعزولة لديها القدرة على إنتاج أغشية حيوية بواسطة تقنية TCP وإنتاج السلايم بطريقة RCA. أظهرت دراسة القوة المضادة للميكروبات للزيوت الأساسية في *Lavandula stoechas* و *Laurus nobilis*، أنها أكثر نشاطًا على سلالات العوالم من *Staphylococcus aureus* على *Pseudomonas auroginosa*، من ناحية أخرى، أظهر النشاط المضاد للبيوفيلم أن زيت *Lavandula stoechas* يمتلك قوة قوية على النمو اللاإرادي للمكورات العنقودية والزائفة. اتضح أن زيت *Laurus nobilis* ليس له كفاءة مهمة مقابل هذه السلالات القوية من الأغشية الحيوية..

أصبح استخدام الطب العشبي أكثر إثارة للاهتمام بسبب ثراء النباتات التي تمتلك قوة مضادة للبكتيريا ومضادة للغشاء الحيوي. لذلك، فإن اكتشاف عوامل مضادة للميكروبات جديدة وفعالة مشتقة من موارد جديدة ضد البكتيريا المقاومة له أهمية قصوى.

الكلمات المفتاحية

مرض السكري- قرحة - الغشاء الحيوي - القدم السكرية- تأثير المضاد للبكتيريا-تأثير المضاد للبيوفيلم-الزيوت الأساسية-

Laurus nobilis-Lavandula stoechas

Résumé

Le diabète, maladie chronique et métabolique, est connu comme l'un des grands défis sanitaires du siècle. D'une manière progressive, cette maladie peut endommager plusieurs organes du corps humain et augmentent le risque d'ulcère du pied. Cette complication grave se caractérise par la formation d'un biofilm résistant aux antibiotiques.

L'objectif de notre travail vise à étudier par différentes méthodes qualitatives et quantitatives l'évaluation de la formation de biofilm des bactéries isolées de pied diabétique au niveau de service de médecine interne, CHU Tlemcen, et en deuxième lieu on va s'intéresser à tester l'effet antibactérien et anti biofilm des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* et *Laurus nobilis* sur les souches isolées-

L'isolement des souches des pieds diabétiques a permis de mettre en évidence la prédominance des bactéries du genre *Staphylococcus aureus*, suivie par *Pseudomonas auroginosa*, toutes les souches isolées ont la capacité de produire un biofilm par la technique TCP et produisent un slime par la méthode RCA . L'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* et *Laurus nobilis*, a montré que 'elles sont plus actives sur les souches planctoniques de *Staphylococcus aureus* que *Pseudomonas auroginosa* , par contre l'activité antibiofilm a montré que l'huile de *Lavandula stoechas* possède un fort pouvoir sur la croissance sessile de *Staphylococcus* et *Pseudomonas* . Il s'avère que l'huile de *Laurus nobilis* n'a pas une efficacité importante vis-à-vis de ces souches performantes de biofilm .

Le recours à la phytothérapie devient de plus en plus intéressant en raison de la richesse des plantes possédant un pouvoir antibactérien, et anti-biofilm remarquable. Par conséquent, la découverte de nouveaux , et efficaces agents antimicrobiens dérivés de nouvelles ressources contre les bactéries résistantes est d'une importance primordiale.

Mots clés

Le diabète – ulcère - biofilm – pied diabétique – effet antibactérien - effet antibiofim- huiles essentielles -*Lavandula stoechas*- *Laurus nobilis* - la phytothérapie

Abstract

Diabetes, a chronic and metabolic disease, is known as one of the major health challenges of the century. Gradually, this disease can damage several organs of the human body and increase the risk of foot ulcers. This serious complication is characterized by the formation of an antibiotic-resistant biofilm.

The objective of our work is to study by various qualitative and quantitative methods the evaluation of biofilm formation of bacteria isolated from diabetic foot at the level of internal medicine service, CHU Tlemcen, and secondly we will test the antibacterial and anti-biofilm effect of the essential oils of *Lavandula stoechas* and *Laurus nobilis* on isolated strains.

The isolation of strains of diabetic feet made it possible to highlight the predominance of bacteria of the genus *Staphylococcus aureus*, followed by *Pseudomonas auroginosa*, all isolated strains have the ability to produce a biofilm by the TCP technique and produce slime by the RCA method . The study of the antimicrobial power of the essential oils of *Lavandula stoechas* and *Laurus nobilis*, showed that they are more active on the planktonic strains of *Staphylococcus aureus* than *Pseudomonas auroginosa*, On the other hand, the antibiofilm activity showed that the oil of *Lavandula stoechas* possesses a strong power on the sessile growth of *Staphylococcus* and *Pseudomonas*. It turns out that the oil of *Laurus nobilis* does not have an important efficiency vis-to these powerful biofilm strains.

The use of herbal medicine is becoming more and more interesting due to the richness of plants possessing a remarkable antibacterial power, and anti-biofilm. Therefore, the discovery of new, effective antimicrobial agents derived from new resources against resistant bacteria is of paramount importance.

Keywords

Diabetes – ulcer – biofilm - diabetic foot – antibacterialeffect- anti biofilm effect- essential oils- *Lavandula stoechas-Laurus nobilis*