

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Hassiba Benbouali de Chlef

Faculté : Science de la nature et la vie

Département : Biologie



THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT

Filière : Biologie

Spécialité : Génomique microbienne

Par

Nerdjes FERHAOUI épouse BITAT

Thème :

Évaluation de la diversité bactérienne du pied diabétique : approche moléculaire et métagénomique

Soutenue le **19/04/2026** devant le jury composé de :

Mohammed El Amine BEKARA	MCA	UHBC (Chlef)	Président
Mohammed SEBAIHIA	Professeur	UHBC (Chlef)	Rapporteur
Rachida ALLEM	Professeur	UHBC (Chlef)	Examinatrice
Fatima NEHAL	MCA	UHBC (Chlef)	Examinatrice
Sid Ahmed REBIAHI	Professeur	UAB (Tlemcen)	Examinateur
Mammar KHAMES	MCA	UYF (Médéa)	Examinateur

Dédicace

Cette thèse est tout particulièrement dédiée à mon époux, **Mohamed El Hadi BITAT**, pour sa précieuse contribution à ce travail universitaire, son soutien sans faille, ses encouragements et sa patience, notamment dans les moments les plus éprouvants. Tu as été ma force silencieuse, mon équilibre, mon pilier dans l'ombre.

Je ne pourrai jamais te rendre tout ce que tu as sacrifié pour moi, ni mesurer l'ampleur de ton engagement à mes côtés. Que Dieu te bénisse, te récompense pour tout le bien que tu m'as apporté, et te préserve pour notre famille.

À mes enfants, **Yanis** et **Alicia**, qui illuminent ma vie et remplissent mon cœur de bonheur. Que Dieu vous protège, vous guide et veille sur vous toujours.

Je dédie ce travail à mes parents, **Ali** et **Djamila CHEBIL**, ainsi qu'à toute ma famille, pour leur amour inconditionnel, leur soutien indéfectible et les innombrables sacrifices consentis tout au long de mon parcours.

Je dédie également ce travail à ma belle-famille, et plus particulièrement à mes beaux-parents, **Salim BITAT** et **Leila DAFRI**, pour leur soutien constant et leurs encouragements tout au long de ce chemin.

Je tiens aussi à adresser une dédicace toute particulière à ma sœur de cœur, la future Docteure **Lina TALHI**, ainsi qu'à sa famille. Nous avons partagé des moments aussi difficiles qu'inoubliables, tissés de souvenirs précieux et de défis surmontés ensemble.

Ton soutien constant, tes encouragements et ta présence bienveillante m'ont aidée à persévérer et à mener ce travail à son terme.

Sache que tu es pour moi une amie précieuse et irremplaçable, et que je te serai toujours reconnaissante. Je te souhaite de tout cœur de réaliser chacun de tes rêves, de t'épanouir pleinement dans ta carrière et de connaître tout le bonheur que tu mérites.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements à **Pr Mohammed SEBAIHIA**, Professeur à la Faculté SNV de l'Université Hassiba Benbouali de Chlef et Directeur du Laboratoire de Biologie Moléculaire, Génomique et Bioinformatique, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de diriger cette thèse. Je lui suis reconnaissante pour son encadrement, ses orientations scientifiques, ainsi que pour la pertinence des thématiques de recherche proposées, en lien avec des enjeux de santé publique.

Veuillez recevoir, **Pr SEBAIHIA**, l'expression de ma gratitude, de mon respect sincère et de mon admiration.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à l'ensemble des membres du jury pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'évaluer ce travail et pour leur présence lors de la soutenance. J'adresse mes remerciements à **M. Mohammed El Amine BEKARA**, Maître de conférences A à l'Université Hassiba Benbouali de Chlef, président du jury, ainsi qu'à **Mme Rachida ALLEM** et **Mme Fatima NEHAL**, respectivement Professeure et Maître de conférences A à la même université, pour avoir accepté d'examiner cette thèse. J'exprime également ma gratitude à **M. Sid Ahmed REBIAHI**, Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, et à **M. Mammam KHAMES**, Maître de conférences A à l'Université Yahia Fares de Médéa, pour avoir accepté de participer à l'évaluation de ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à **Pr Makoto KURODA**, Directeur du Centre de Génomique des Pathogènes à l'Institut National des Maladies Infectieuses (NIID), Japon, pour m'avoir fait l'honneur de m'ouvrir les portes de son laboratoire.

Je lui suis profondément reconnaissante pour la mise à disposition de l'équipement et des réactifs nécessaires à l'achèvement de ce travail, ainsi que pour ses précieuses orientations.

Je tiens à remercier chaleureusement **Dr Tsuyoshi SEKIZUKA**, chercheur à NIID, pour avoir assuré l'analyse des données bioinformatiques.

Mes remerciements à l'ensemble des membres du Centre de Génomique des Pathogènes, pour leur gentillesse, leur disponibilité et leurs orientations tout au long de mon séjour. Leur accueil et leur soutien ont grandement contribué à la réalisation de ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au **Colonel Pr Ahmed HAMADA**, Directeur médical de l'Hôpital Militaire Régional Universitaire de Constantine (HMRUC), pour m'avoir accueillie au sein de l'établissement et pour m'avoir ouvert les portes des services cliniques et des laboratoires.

Je remercie également **Dr Chawki GUITARI**, Chef du Service de Médecine Interne de l'HMRUC, pour sa bienveillance et son soutien.

Mes sincères remerciements vont aussi à **tout le personnel du laboratoire de microbiologie de l'HMRUC**, pour leur accueil chaleureux, leur collaboration et leur disponibilité tout au long de mon stage.

Je remercie sincèrement **Dr Mohammed El Amine BEKARA**, Doyen de la Faculté SNV de l'UHBC, ainsi que **Dr Abderrezak Kamel TOUBAL**, Vice-Doyen chargé de la Post-graduation, de la Recherche Scientifique et des Relations Extérieures de la même faculté, pour leur disponibilité, leur rigueur dans le travail et les informations précieuses qu'ils ont su fournir.

Je leur suis particulièrement reconnaissante pour leur implication et pour avoir facilité les différentes démarches administratives.

Résumé

Le diabète constitue un problème majeur de santé publique, associé à une vaste gamme de complications affectant divers organes. L'ulcère du pied diabétique (UPD) est l'une des complications les plus graves, représentant une cause importante d'amputations des membres inférieurs. Les patients atteints d'UPD présentent un risque élevé de développer des infections du pied diabétique (IPD) impliquant les tissus mous et/ou l'os.

Cette thèse est divisée en deux parties : la première concerne la caractérisation génomique des souches de *Staphylococcus* et *Mammaliococcus* spp. isolées des IPD et de la peau saine du pied contralatéral (PSPC) chez les mêmes patients ; la deuxième partie porte sur l'évaluation de la diversité et de la structure des communautés bactériennes des IPD comparées à celles de la PSPC, en utilisant le séquençage métagénomique shotgun.

Dans un premier temps, 58 souches de *Staphylococcus/Mammaliococcus* spp. isolées de 44 patients ont été séquencées, annotées pour identifier les gènes de résistance aux antimicrobiens et de virulence, puis soumises à un typage *in silico* (MLST, *spa*, *SCCmec*) ainsi qu'à une analyse du pangéome. Dans un second temps, des échantillons provenant de 32 patients ont été analysés par séquençage métagénomique afin d'examiner la composition bactérienne et la diversité des IPD et de la PSPC.

Au total, 32 isolats de *Staphylococcus aureus* et 10 *Staphylococcus epidermidis* ont été isolés à la fois à partir des IPD et de la PSPC. Par contre, *Staphylococcus haemolyticus* (n = 8), *Mammaliococcus sciuri* (n = 1), *Staphylococcus hominis* (n = 1) et *Staphylococcus simulans* (n = 3) ont été isolés uniquement à partir de la PSPC, tandis que *Staphylococcus caprae* (n = 2) et *Staphylococcus saprophyticus* (n = 1) étaient spécifiques aux IPD.

Le typage des 32 isolats de *S. aureus* a révélé 6 types ST (ST672, ST80, ST241, ST1, ST97, ST291) et 4 ST non définis (STNF), 8 types *spa* (t044, t037, t3841, t1247, t127, t639, t937, t9432), ainsi que 2 types *SCCmec* (IV et III (A)). Parmi les staphylocoques à coagulase négative (SCoN), les isolats de *S. epidermidis* appartenaient aux ST54, ST35 et ST640, et ceux de *S. haemolyticus* aux ST3, ST25, ST29, ST1 et ST56. L'isolat unique de *M. sciuri* possédait un *SCCmec* de type III(A).

Une large diversité de gènes de résistance et de virulence a été identifiée, avec une répartition variable selon les espèces ou les ST. L'analyse du pangéome a mis en évidence une population hautement clonale, notamment parmi les isolats de *S. aureus*.

L'analyse métagénomique a révélé une prédominance d'anaérobies stricts appartenant aux Bacteroidetes dans les IPD de grade PEDIS 4, tandis que PEDIS 3 et 2 étaient dominés par les Proteobacteria. La PSPC présentait une composition bactérienne relativement stable à travers tous les grades, dominée par les genres *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* et *Cutibacterium*. La diversité bactérienne était plus élevée dans la PSPC que dans les IPD pour les grades PEDIS 3 et 4, alors qu'elle était comparable entre les deux sites pour le grade PEDIS 2.

L'analyse PCoA a mis en évidence des structures communautaires distinctes entre les IPD et la PSPC, *Prevotella*, *Bacteroides* et *Porphyromonas* étant les principaux contributeurs à cette différenciation. Les analyses par Neighbor-Net ont confirmé une diversité réduite et une composition bactérienne dominante plus homogène dans les IPD comparativement à la PSPC.

Mots clés : Infection du pied diabétique, *Staphylococcus*, *Mammaliococcus*, Séquençage du génome entier, Microbiome, Métagénomique shotgun.

Abstract

Diabetes is a major public health problem associated with a wide range of complications affecting various organs. Diabetic foot ulcer (DFU) is one of the most serious complications and represents a major cause of lower-limb amputations. Patients with DFU are at high risk of developing diabetic foot infections (DFI) involving soft tissues and/or bone.

This thesis is divided into two parts: the first concerns the genomic characterization of *Staphylococcus* and *Mammaliicoccus* spp. strains isolated from DFI and from contralateral healthy foot skin (CHFS) of the same patients; the second focuses on the evaluation of the diversity and structure of bacterial communities in DFI compared to CHFS, using shotgun metagenomic sequencing.

In the first part, 58 *Staphylococcus/Mammaliicoccus* spp. strains isolated from 44 patients were sequenced and annotated to identify antimicrobial resistance and virulence genes, followed by *in silico* typing (MLST, *spa*, *SCCmec*) and pan-genome analysis. In the second part, samples from 32 patients were analyzed by metagenomic sequencing to examine the bacterial composition and diversity of DFI and CHFS. A total of 32 *Staphylococcus aureus* and 10 *Staphylococcus epidermidis* isolates were recovered from both DFI and CHFS. In contrast, *Staphylococcus haemolyticus* (n = 8), *Mammaliicoccus sciuri* (n = 1), *Staphylococcus hominis* (n = 1), and *Staphylococcus simulans* (n = 3) were isolated exclusively from CHFS, while *Staphylococcus caprae* (n = 2) and *Staphylococcus saprophyticus* (n = 1) were specific to DFI.

Typing of the 32 *S. aureus* isolates revealed six sequence types (ST672, ST80, ST241, ST1, ST97, ST291) and four undefined STs (STNF), eight *spa* types (t044, t037, t3841, t1247, t127, t639, t937, t9432), and two *SCCmec* types (IV and III(A)). Among coagulase-negative staphylococci (CoNS), *S. epidermidis* isolates belonged to ST54, ST35, and ST640, while *S. haemolyticus* isolates belonged to ST3, ST25, ST29, ST1, and ST56. The unique *M. sciuri* isolate carried an *SCCmec* type III(A). A wide diversity of resistance and virulence genes was identified, with variable distribution across species and STs. Pangenome analysis revealed a highly clonal population, particularly among *S. aureus* isolates.

Metagenomic analysis showed a predominance of strict anaerobes belonging to *Bacteroidetes* in PEDIS grade 4 DFI, whereas grades 3 and 2 were dominated by *Proteobacteria*. CHFS exhibited a relatively stable bacterial composition across all grades, dominated by the genera *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, and *Cutibacterium*. Bacterial diversity was higher in CHFS than in DFI for PEDIS grades 3 and 4, while it was comparable between both sites for grade 2.

PCoA analysis revealed distinct community structures between DFI and CHFS, with *Prevotella*, *Bacteroides*, and *Porphyromonas* being the main contributors to this differentiation. Neighbor-Net analyses confirmed reduced diversity and a more homogeneous dominant bacterial composition in DFI compared to CHFS.

Keywords: Diabetic foot infection, *Staphylococcus*, *Mammaliicoccus*, whole-genome sequencing, microbiome, shotgun metagenomics.

المخلص

يُعدّ مرض السكري مشكلة صحية عامة كبرى، ويرتبط بمجموعة واسعة من المضاعفات التي تؤثر على عدة أعضاء في الجسم. ويُعدّ قرحة القدم السكرية (DFU) من أخطر هذه المضاعفات، وتمثل سبباً رئيسياً في بتر الأطراف السفلية. المرضى المصابون بقرحة القدم السكرية معرضون بشكل كبير لتطور عدوى القدم السكرية (DFI)، والتي قد تصيب الأنسجة الرخوة و/أو العظم.

تنقسم هذه الأطروحة إلى جزأين: يتناول الجزء الأول التوصيف الجينومي لسلاسلات *Staphylococcus* و *Mammaliicoccus* المعزولة من عدوى القدم السكرية ومن الجلد السليم للقدم المقابلة (CHFS) لدى نفس المرضى، وذلك باستخدام تقنية تسلسل الجينوم الكامل بينما يركّز الجزء الثاني على تقييم تنوع المجتمع البكتيري وبنيته في عينات DFI مقارنة بـ CHFS، باستخدام تسلسل الميتاجينوم الشامل (Shotgun metagenomics).

في المرحلة الأولى، تم عزل 58 سلالة من *Staphylococcus* و *Mammaliicoccus* من 44 مريضاً، ثم خضعت هذه السلالات للتسلسل الجينومي الكامل، وتحديد جينات مقاومة المضادات الحيوية والضرارة، بالإضافة إلى إجراء تصنيف جيني عبر المحاكاة الحاسوبية (MLST، *spa*، *SCCmec*)، وتحليل الجينوم الكامل (pan-genome). في المرحلة الثانية، تم تحليل عينات من 32 مريضاً باستخدام الميتاجينوم الشامل لدراسة تركيبية وتنوع المجتمع البكتيري في DFI و CHFS.

تم عزل *Staphylococcus aureus* (n = 32) و *Staphylococcus epidermidis* (n = 10) من عينات DFI و CHFS على حد سواء. في المقابل، تم عزل *Staphylococcus haemolyticus* (n = 8)، *Mammaliicoccus sciuri* (n = 1)، *Staphylococcus simulans* (n = 3) و *Staphylococcus caprae* (n = 2) فقط من عينات CHFS، بينما تم عزل *Staphylococcus saprophyticus* (n = 1) فقط من عينات DFI.

أظهر تصنيف عزلات *S. aureus* الـ 32 وجود ستة أنواع تسلسلية (ST672، ST80، ST241، ST1، ST97، ST291) وأربعة أنواع غير معرّفة (STNF)، وثمانية أنواع *spa* (t044، t037، t3841، t1247، t127، t639، t937، t9432) ونوعين من *SCCmec* (النوع IV والنوع III[A]). أما بين الستافيلوكوكسات السالبة للأنزيم المخثر (CoNS)، فقد انتمت عزلات *S. epidermidis* إلى ST54 و ST35 و ST640، في حين انتمت عزلات *S. haemolyticus* إلى ST3 و ST25 و ST29 و ST1 و ST56. أما عزلة *M. sciuri* الوحيدة فكانت تحمل عنصر *SCCmec* من النوع III(A).

تم تحديد مجموعة واسعة من جينات مقاومة المضادات الحيوية والضرارة، مع تباين في التوزيع بحسب النوع أو النوع التسلسلي (ST). أظهر تحليل الجينوم الكامل وجود تجمعات استنساخية مرتفعة، خاصةً بين عزلات *S. aureus*.

كشفت التحليلات الميتاجينومية عن سيطرة اللاهوائيات الصارمة التابعة لشعبة Bacteroidetes في حالات DFI من الدرجة 4 PEDIS، بينما سادت Proteobacteria في الدرجتين 3 PEDIS و 2. أما CHFS فاحتفظت بتركيبية بكتيرية مستقرة نسبياً عبر جميع درجات PEDIS، وكانت مهيمنة من قبل أجناس *Corynebacterium* و *Staphylococcus* و *Pseudomonas* و *Cutibacterium*. كان التنوع البكتيري أعلى في CHFS مقارنة بـ DFI في الدرجتين 3 PEDIS و 4، بينما كان متقارباً بين الموقعين في الدرجة 2 PEDIS.

أظهرت تحليلات PCoA وجود بنى مجتمعية متميزة بين DFI و CHFS، وكان كل من *Prevotella* و *Bacteroides* و *Porphyromonas* من أبرز المساهمين في هذا الاختلاف. وأكد تحليل Neighbor-Net على انخفاض التنوع ووجود مجتمعات بكتيرية مهيمنة أكثر تجانساً في DFI مقارنة بـ CHFS.

الكلمات المفتاحية: عدوى القدم السكرية، *Staphylococcus*، *Mammaliicoccus*، تسلسل الجينوم الكامل، الميكروبيوم، الميتاجينوم الشامل.

Table des matières

Dédicace

Remerciements

Résumé

Abstract

المخلص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale..... 1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Généralités sur le diabète.....	4
1.1. Classification du diabète.....	4
1.1.1. Diabète de type 1	4
1.1.2. Diabète de type 2	5
1.1.3. Diabète sucré gestationnel	5
1.1.4. Autres types de diabète	5
1.2. Complications du diabète	6
2. Pied diabétique.....	6
2.1. Définition.....	6
2.2. Ulcère du pied diabétique.....	6
2.3. Morbidité et mortalité	7
2.3.1. Infection du pied diabétique.....	7
2.3.2. Récidive	7
2.3.3. Amputation	8
2.3.4. Mortalité.....	8
2.4. Épidémiologie de l'UPD.....	9
2.4.1. Prévalence et incidence de l'UPD	9
2.4.2. Facteurs de risque de l'UPD.....	10
a. Neuropathie périphérique diabétique.....	10
b. Angiopathie diabétique	11
c. Maladies cardiovasculaires.....	11
d. Immunopathie.....	12
e. Age et durée de diabète	12
f. Sexe	12
g. Glycémie	13
h. Obésité	13
2.4.3. Physiopathologie.....	13
3. Diagnostic	16
4. Systèmes de classification des UPD/IPD.....	17
4.1. Classification de Meggitt-Wagner	17
4.2. Classification de l'Université du Texas	19

4.3.	Classification SINBAD	19
4.4.	Classification PEDIS.....	21
4.5.	Classification WHI	22
5.	Pathogénie et étiologie de l'IPD.....	25
5.1.	Microbiote cutané	25
5.2.	Confirmation de l'infection	26
5.3.	Nature polymicrobienne des IPD et biofilm	28
5.4.	Microbiote du pied diabétique.....	31
5.5.	Principales bactéries dominantes dans les IPD	34
5.5.1.	Bactéries à Gram positif	34
a.	<i>S. aureus</i>	34
b.	Les staphylocoques à coagulase négative (SCoN).....	36
c.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	36
d.	<i>Enterococcus</i> spp.....	37
5.5.2.	Bactéries à Gram négatif	38
a.	<i>P. aeruginosa</i>	38
b.	<i>Enterobacteriaceae</i> et genres associés.....	38
i.	<i>E. coli</i>	39
ii.	<i>P. mirabilis</i>	39
6.	Téchniques d'analyse de la composition du microbiote des UPD/IPD	40
6.1.	Prélèvement	40
6.2.	Téchniques basées sur la culture	41
6.2.1.	Culture conventionnel.....	41
6.2.2.	Culturomique.....	42
6.3.	Téchniques moléculaires.....	43
6.3.1.	Séquençage du gène de l'ARNr 16S.....	43
6.3.2.	Métagénomique	43
7.	Prise en charge du pied diabétique.....	44
7.1.	Hospitalisation.....	44
7.2.	Chirurgie.....	44
7.3.	Antibiothérapie.....	45
7.4.	Thérapies adjuvantes.....	49

Chapitre II : Matériel et méthodes

1.	Lieu et période de l'étude.....	50
2.	Population d'étude.....	50
2.1.	Critères d'inclusion	50
2.2.	Critères d'exclusion.....	50
3.	Classification des IPD.....	50
4.	Prélèvements.....	51
4.1.	Prélèvements à partir des IPD	51
4.2.	Prélèvements à partir de la PSPC	51
5.	Isolement des souches de <i>Staphylococcus/Mammaliococcus</i> spp.....	51

6. Extraction de l'ADN génomique.....	52
6.1. Extraction de l'ADN génomique à partir des souches de <i>Staphylococcus/Mammaliococcus</i> spp.....	52
6.1.1. Prétraitement à l'achromopeptidase	52
6.1.2. Lyse cellulaire et purification de l'ADN génomique	52
6.2. Extraction de l'ADN génomique à partir des prélèvements des IPD et de la PSPC.....	53
7. Next Generation Sequencing.....	54
7.1. Préparation des bibliothèques de séquençage	54
7.1.1. Fragmentation	54
7.1.2. Ligation des adaptateurs	54
7.1.3. Lavage	55
7.1.4. Amplification des bibliothèques de séquençage.....	55
7.1.5. Purification des bibliothèques de séquençage	55
7.1.6. Dénaturation, normalisation et pooling des bibliothèques de séquençage.....	56
7.2. Réactions de séquençage	57
8. Analyse bioinformatique.....	57
8.1. Analyse bioinformatique des génomes de <i>Staphylococcus/Mammaliococcus</i> spp.....	57
8.1.1. Démultiplexage, contrôle de la qualité et assemblage des séquences.....	57
8.1.2. Annotation, génotypage et détection des gènes.....	58
8.1.3. Analyse du pangéome.....	58
8.2. Analyse bioinformatique des des métagénomes dans les pieds diabétiques et les PSPC.....	58
8.2.1. Visualisation et caractérisation taxonomiques des communautés bactériennes.....	58
8.2.2. Visualisation des métagénomes.....	59
8.2.3. Analyses de la diversité et abondance relative des taxa.....	59
a. Analyses de la diversité des taxa.....	59
b. Analyses de l'abondance relative des taxa.....	59
9. Analyse statistique.....	60
 Chapitre III : Résultats	
1. Caractéristiques des patients.....	61
2. Isolement de <i>Staphylococcus</i> et <i>Mammaliococcus</i> spp.....	64
3. Identification des isolats de <i>Staphylococcus/Mammaliococcus</i> spp. par séquençage du génome entier.....	64
4. Typage moléculaire des isolats de <i>Staphylococcus/Mammaliococcus</i> spp.....	65
4.1. Typage par MLST.....	65
4.2. Typage spa.....	67
4.3. Typage SCCmec.....	67
4.4. Caractérisation des clones de <i>S. aureus</i> par combinaison des typages ST-SCCmec-spa.....	67
5. Analyse des gènes de virulence chez les isolats de <i>S. aureus</i>	68
5.1. Adhésines.....	71
5.2. Toxines.....	71
5.2.1. Hémolysines.....	72

5.2.2. Entérotoxines et entérotoxines-like.....	72
5.2.3. Toxines similaires à l'exotoxine staphylococcique.....	72
5.2.4. Autres toxines.....	72
5.3. Système de sécrétion de type VII.....	73
5.4. Exoenzymes.....	73
5.4.1. Lipases.....	73
5.4.2. Protéases.....	73
5.4.3. Hyaluronidases.....	74
5.4.4. Coagulases.....	74
5.4.5. Autres exoenzymes.....	74
5.5. Protéines d'échappement au système immunitaire.....	74
6. Analyse des gènes de résistance aux antibiotiques chez les isolats de <i>S. aureus</i>	74
6.1. β -lactamines.....	76
6.2. Enzymes modifiant les aminosides (EMA).....	76
6.3. Macrolides.....	76
6.4. Tétracyclines.....	76
6.5. Acide fusidique.....	77
6.6. Triméthoprime-sulfaméthoxazole.....	77
6.7. Fosfomycine.....	77
7. Analyse des gènes de virulence chez les isolats de SCoN/ <i>Mammaliicoccus</i> spp.....	77
8. Analyse des gènes de résistance aux antibiotiques chez les isolats de SCoN/ <i>Mammaliicoccus</i> spp.....	78
8.1. β -lactamines.....	79
8.2. EMA.....	79
8.3. Macrolides.....	79
8.4. Tétracyclines.....	80
8.5. Acide fusidique.....	80
8.6. Autres gènes de résistance aux antibiotiques et aux biocides	80
9. Analyse du pangéome.....	80
9.1. Analyse phylogénétique basée sur le pangéome.....	81
9.1.1. Analyse phylogénétique basée sur le pangéome des <i>S. aureus</i>	81
9.1.2. Analyse phylogénétique basée sur le pangéome des SCoN/ <i>Mammaliicoccus</i> spp.....	82
10. Caractérisation du microbiote des IPD et de la PSpC par séquençage métagénomique shotgun.....	84
10.1. Analyse de la diversité bactérienne des IPD en comparaison avec la PSpC.....	86
10.1.1. Diversité alpha.....	86
10.1.2. Diversité beta.....	88
a. Analyse PCoA.....	88
b. Analyse Neighbor-Net.....	89
10.2. Comparaison de la composition des microbiotes des IPD et de la PSpC.....	90
10.2.1. Comparaison de la composition des microbiotes au niveau du phylum.....	90
10.2.2. Comparaison de la composition des microbiotes au niveau du genre.....	91
10.3. Comparaison de la composition des microbiotes des IPD et de la PSpC selon les grades PEDIS.....	93
10.3.1. Comparaison de la composition des microbiotes des IPD et de la PSpC selon les grades PEDIS au niveau du phylum.....	93
10.3.2. Comparaison de la composition des microbiotes des IPD et de la PSpC selon les grades PEDIS au niveau du genre.....	94
10.3.3. Comparaison de la composition des microbiotes des IPD et de la PSpC au sein de chaque grade PEDIS.....	96

Chapitre IV:

Discussion.....	97
Conclusion générale.....	109
Références bibliographiques.....	111
Annexes.....	128

Liste des abréviations

ACME arginine catabolic mobile element

Agg substance d'agrégation

ADB Agarose Dissolving Buffer

ADN Acide Désoxyribonucléique

ARN Acide Ribonucléotidique

ARNr Acide Ribonucléotidique ribosomique

aur gènes codant l'aureolysine

blaZ gènes codant la β -lactamase

BLSE bacilles à gram négatif producteurs de β -lactamases à spectre élargi

clfA et **clfB** gènes codant les protéines de liaison au fibrinogène

Cna la protéine de liaison au collagène

CHFS contralateral healthy foot skin

coa gènes codant la coagulase

cgMLST typage multilocus de la séquence du génome de base

DFI diabetic foot infection

DFU diabetic foot ulcer

DG diabète gestationnel

dfrG gènes codant la résistance au triméthoprim-sulfaméthoxazole

DT1 diabète sucré de type 1

DT2 diabète de type 2

EbpS protéine de liaison à l'élastine

edinB codant des inhibiteurs de la différenciation cellulaire épidermique

EGM éléments génétiques mobiles

EI écart interquartile

EMA enzymes modifiant les aminosides

eta et etb gènes de toxine du choc toxique

esa, essA, esx codant le système de sécrétion Ess/Type VII

Esp protéine de surface extracellulaire

erm, msr(A), mph(C) gènes codant pour la résistance aux macrolides

ERV entérocoques résistants à la vancomycine

ExPEC souches pathogènes extra-intestinales

FEP pathogènes fonctionnellement équivalents

FISH Hybridation in situ en fluorescence

fnbA* et *fnbB gènes codant des protéines de liaison à la fibronectine

fosB gènes codant la résistance à la fosfomycine

fus gènes codant la résistance à l'acide fusidique

GAS streptocoque du groupe A

GeIE métalloprotéase

geh, lip gènes codant des lipases

GISA *S. aureus* de sensibilité intermédiaire aux glycopeptides.

HbA1c hémoglobine glycosylée

hla/hly gènes codant l' α -hémolysine

hlb β -hémolysine

hlg gènes codant γ -hémolysine

hld gènes codant δ -hémolysine

hysA gènes codant l'hyaluronate lyase

IEC cluster d'évasion immunitaire innée humaine

IDSA Société Américaine des Maladies Infectieuses

IMC Indice de Masse Corporelle

IPEC pathogènes intestinaux

IPD infection du pied diabétique

IRM Imagerie par Résonance Magnétique

IWGDF International Working Group on the Diabetic Foot

luk gènes codant les leucocidines

MALDI-TOF MS Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight mass spectrometry

mecA gène de résistance à la méticilline

MePIC Metagenomic Pathogen Identification for Clinical Specimens

mer monomer (longueur en nucléotides)

mg milligrammes

min minute

mL millilitre

MLST Multi Locus Sequence Typing

mmHg millimètre de mercure

MSCRAMM microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules

NADPH Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

ng nanogramme

NGS Next Generation Sequencing

OTUs unités taxonomiques opérationnelles

Pb paires de bases

PCR Polymerase Chain Reaction

PCoA Analyse en Coordonnées Principales

PEDIS perfusion, extent/size, depth/tissue loss, infection, sensation

PBP2 protéine de liaison à la pénicilline supplémentaire

PFGE électrophorèse sur gel en champ pulsé

PSPC peau saine du pied contralatéral

qacB gènes codant la résistance aux composés d'ammonium

rpm rotation par minute

SAGs exotoxines superantigènes

SARM *S. aureus* résistant à la méticilline

SARM-AC *S. aureus* résistant à la méticilline acquis dans la communauté

SARM-AH *S. aureus* résistant à la méticilline acquis à l'hôpital

SCCmec cassette chromosomique staphylococcique

SCoN staphylocoques à coagulase négative

Spa la protéine staphylococcique A

se gènes codant entérotoxines

sec seconde

sel gènes codant les entérotoxines-like

set gènes codant pour des toxines similaires à l'exotoxine

SINBAD Site, Ischaemia, Neuropathy, Bacterial Infection, Area, Depth

spp espèces du même genre

ssp gènes codant des protéases

str gènes codant la résistance à la streptomycine

STNF séquence type non identifié

TMA amputation trans-métatarsienne

Tris-EDTA Tris-acide éthylène-diamine-tétraacétique

tet gènes codant la résistance aux tétracyclines

UFC Unité Formant Colonie

UPD ulcère du pied diabétique

UV Rayons ultraviolets

vat*, *vgb gènes codant la résistance à la streptogramine

vWbp gènes codant la protéine de liaison au facteur de Willebrand

VISA vancomycin intermediate *S. aureus*

WIFI Wound, Ischemia, foot Infection

μM micromolaire

μL microlitre

Liste des Figures

Figure 1: Prévalence mondiale de l'UPD selon les continents, issue d'une méta-analyse.	9
Figure 2: Les facteurs favorisant les UPD	10
Figure 3: Exemples représentatifs d'ulcères préulcératifs, neuropathiques, neuroischémiques et ischémiques dans les UPD	15
Figure 4: Facteurs influençant la cicatrisation altérée des UPD.....	27
Figure 5: Facteurs influençant le retard de cicatrisation des plaies.	29
Figure 6: Images représentatives obtenues par microscopie confocale à balayage laser de <i>S. aureus</i> et <i>P. aeruginosa</i>	30
Figure 7: Vue d'ensemble des étapes de la culturomique, de l'échantillon clinique aux applications génomiques.....	42
Figure 8: Représentation du pangénome de <i>Staphylococcus/Mammaliicoccus</i> spp.....	81
Figure 9: Analyse phylogénétique de <i>S. aureus</i> basée sur les pangénomes avec Roary.....	82
Figure 10: Analyse phylogénétique des SCoN.....	83
Figure 11: Analyse phylogénétique de <i>M.sciuri</i> basée sur les pangénomes avec Roary.....	84
Figure 12: Analyse des lectures de séquences (NGS reads) issus du séquençage métagénomique shotgun.	85
Figure 13: Analyse de la diversité alpha utilisant l'indice de diversité de Shannon-Weaver H' des échantillons de la PSPC et d'IPD au niveau du genre bactérien.....	86
Figure 14: Analyse de la diversité alpha utilisant l'indice de diversité de Shannon-Weaver H' des échantillons de la PSPC et d'IPD selon la classification PEDIS.....	87
Figure 15: Analyse de la diversité beta des IPD (DFI) et de la PSPC (CHFS) par PCoA, basée sur les distances de dissimilarité de Bray–Curtis.....	88
Figure 16: Analyse de la diversité beta des IPD (DFI) et de la PSPC (CHFS) par Neighbor Net, basée sur l'indice de similarité de Goodall.....	89
Figure 17: Représentation de l'abondance relative des phyla bactériens les plus abondants dans les groupes PSPC et IPD, basée sur le nombre de lectures de séquences.	91
Figure 18: Représentation de l'abondance relative des genres bactériens les plus abondants dans les groupes PSPC et IPD, basée sur le nombre de lectures de séquences.	92
Figure 19: Représentation de l'abondance relative des phylums bactériens les plus abondants selon les grades de sévérité PEDIS dans les groupes PSPC et IPD.....	93
Figure 20: Représentation de l'abondance relative des genres bactériens les plus abondants selon les grades de sévérité PEDIS dans les groupes PSPC et IPD.....	95

Liste des tableaux:

Tableau 1: Systèmes de classification Meggitt-Wagner des UPD	18
Tableau 2: Système de classification l'Université du Texas des UPD	19
Tableau 3: Systèmes de classification SINBAD des UPD	20
Tableau 4: Système de classification PEDIS des IPD.....	21
Tableau 5: Système de classification Wifi des UPD.....	23
Tableau 6: Facteurs à prendre en compte lors de la sélection d'un régime antibiotique empirique pour les IPD.	47
Tableau 7: Données démographiques et cliniques des patients.....	61
Table 8: Caractéristiques moléculaires des souches de <i>Staphylococcus/Mammaliicoccus</i> spp. isolées des IPD et de la peau saine.....	65
Tableau 9 : Distribution des gènes de virulence parmi les différents clones de <i>S. aureus</i>	68
Tableau 10: Gènes de résistance aux antibiotiques détectés dans les isolats de <i>S. aureus</i>	75
Tableau 11: Gènes codant l'élément mobile catabolique de l'arginine dans les isolats de SCoN/ <i>Mammaliicoccus</i> spp.....	77
Tableau 12: Gènes de résistance aux antibiotiques et aux biocides détectés dans les isolats de SCoN/ <i>Mammaliicoccus</i> spp.....	78

Introduction générale

Introduction générale

Le diabète est un problème de santé publique majeur et l'une des principales causes de mortalité et d'incapacité dans le monde (Ong *et al.*, 2023). Il représente la huitième cause de décès et d'incapacité combinée, avec près de 529 millions de personnes vivant avec cette maladie en 2021 (Ong *et al.*, 2023).

Le diabète sucré regroupe un ensemble de troubles métaboliques caractérisés par une hyperglycémie chronique persistante (Cho *et al.*, 2018). Cette pathologie est associée à une large gamme de complications, entraînant des lésions vasculaires diffuses affectant divers organes. Parmi ces complications figurent les affections vasculaires, les troubles neuropathiques, ainsi que des pathologies graves telles que les maladies coronariennes, les accidents vasculaires cérébraux, les ulcères du pied diabétique (UPD), la perte de vision et l'insuffisance rénale (Cho *et al.*, 2018 ; Paula *et al.*, 2023).

La présence d'ulcères au niveau du pied représente une porte d'entrée pour les microorganismes invasifs, susceptibles d'atteindre les tissus profonds, les articulations ou les os, entraînant des infections graves pouvant nécessiter une hospitalisation, provoquer des amputations et augmenter le risque de mortalité prématurée (Lavery *et al.*, 2024 ; Pitocco *et al.*, 2019 ; Raspovic et Wukich, 2014).

Plusieurs facteurs contribuent au développement des infections du pied diabétique (IPD), notamment la présence d'ulcères chroniques, d'ulcères profonds ou atteignant l'os, des antécédents d'amputation, ainsi que l'artériopathie périphérique et l'immunopathie (Lavery *et al.*, 2006 ; Pitocco *et al.*, 2019).

Les IPD peuvent être causées par une large gamme de micro-organismes, principalement des bactéries. Parmi les cocci à Gram positif les plus fréquemment identifiés figurent notamment *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), un cocci aéro-anaérobie facultatif, qui constitue le pathogène le plus couramment isolé.

Introduction générale

D'autres espèces de *Staphylococcus*, telles que *S. epidermidis* et *S. haemolyticus*, généralement considérées comme des contaminants de la flore cutanée, sont également fréquemment retrouvées (Morsli *et al.*, 2024).

Dans les plaies chroniques, en particulier chez les patients ayant récemment suivi un traitement antimicrobien, les infections sont souvent polymicrobiennes et les agents pathogènes responsables sont plus diversifiés. Elles incluent des bacilles à Gram négatif de l'ordre des Entérobactériales, tels qu' *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus* et *Serratia*, ainsi que des bacilles à Gram négatif non fermentants comme *Pseudomonas*. On retrouve également des bacilles anaérobies obligatoires tels que *Propionibacterium*, *Clostridium* et *Porphyromonas* (Rajha *et al.*, 2024 ; Spichler *et al.*, 2015).

Dans les UPD, Les bactéries pathogènes et commensales forment des agrégats multicellulaires de manière symbiotique dans un biofilm pathogène, pour maintenir une infection chronique (Pouget *et al.*, 2020). Les interactions entre les organismes au sein de biofilms polymicrobiens favorisent la production de facteurs de virulence, tels que les hémolysines, les protéases et les collagénases, ainsi que des acides gras à chaîne courte, ce qui provoque une inflammation, entrave la cicatrisation des plaies et contribue à la chronicité de l'infection. De plus, le biofilm limite également la pénétration des agents antimicrobiens dans le site infecté (Citron *et al.*, 2007).

Le taux élevé d'isolement de pathogènes résistants aux antibiotiques les IPD constitue un défi majeur pour leur traitement. Cela inclut notamment *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM), *S. aureus* de sensibilité intermédiaire aux glycopeptides (GISA), des entérocoques résistants à la vancomycine (ERV), ainsi que des bacilles à gram négatif producteurs de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) ou de carbapénémases.

Une meilleure compréhension des étiologies microbiennes des IPD est essentielle pour une prise en charge efficace, notamment pour orienter la thérapie antimicrobienne et guider le développement de nouveaux traitements (Pitocco *et al.*, 2019).

Introduction générale

L'émergence des approches moléculaires a permis de réduire la durée des analyses tout en fournissant des résultats plus fiables que les méthodes de culture traditionnelles (Lavigne *et al.*, 2015).

Ces techniques ont offert un nouvel éclairage sur la communauté bactérienne complexe des IPD et ont joué un rôle crucial dans l'identification précise des bactéries. En outre, elles ont permis de découvrir de nouvelles espèces bactériennes ainsi que de nouveaux gènes impliqués dans ces infections (Heravi *et al.*, 2019).

Ce travail poursuit deux objectifs principaux. D'une part, nous visons à caractériser génétiquement des souches de *Staphylococcus* et *Mammaliicoccus* spp. isolées des IPD, en les comparant avec celles de la peau saine du pied contralatéral (PSPC) chez le même patient, en utilisant le séquençage du génome entier. Nous chercherons également à évaluer l'association potentielle entre les clones/espèces et/ou les gènes de virulence/résistance avec les grades de sévérité PEDIS et la source des isolats.

D'autre part, nous avons pour objectif d'évaluer la diversité et la structure des communautés bactériennes des IPD en comparaison avec la PSPC chez le même patient, en utilisant le séquençage métagénomique shotgun.

Synthèse bibliographique

1. Généralités sur le diabète

Le diabète est une maladie métabolique chronique caractérisée par des niveaux élevés de glucose dans le sang (glycémie), causée par une production insuffisante d'insuline par le pancréas ou par une inefficacité de l'utilisation de l'insuline par l'organisme (Lahoti et Kamat, 2018 ; OMS, 2023)

Le diabète sucré provoque un désordre du métabolisme des glucides, des lipides et des protéines, affectant ainsi divers organes, notamment le cœur, les vaisseaux sanguins, les yeux, les reins, la peau et les nerfs (Bonamigo *et al.*, 2023 ; OMS, 2023).

La prévalence mondiale du diabète est en forte augmentation, principalement à cause de l'augmentation de l'obésité. Entre 1980 et 2014, le nombre estimé de personnes atteintes de diabète dans le monde a presque quadruplé, passant de 108 millions à 422 millions (OMS, 2016).

En 2021, 529 millions de personnes vivaient avec le diabète, avec une prévalence normalisée selon l'âge de 6,1 % (Ong *et al.*, 2023). L'Afrique du Nord et le Moyen-Orient présentent les taux les plus élevés, atteignant 9,3 %, tandis qu'en Algérie, la prévalence est de 10,0 %. D'ici 2050, plus de 1,31 milliard de personnes pourraient être touchées, avec une prévalence élevée de 16,8 % en Afrique du Nord (Ong *et al.*, 2023).

1.1. Classification du diabète

La classification précise du diabète est une étape importante pour la prévention et le contrôle efficace de la maladie. Cependant, elle dépend des circonstances présentes au moment du diagnostic ; ainsi de nombreux patients ne se classent pas facilement dans une seule catégorie (Diabetes, 2013).

1.1.1. Diabète de type 1

Le diabète sucré de type 1 (DT1), anciennement appelé diabète juvénile, un diabète auto-immune associé à certains haplotypes des antigènes leucocytaires humains (Nandhini *et al.*, 2023).

DT1 est caractérisé par une déficience en insuline résultant de la destruction (apoptose) des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, médiée par les lymphocytes T du système immunitaire (Lahoti et Kamat, 2018 ; Rother, 2007).

1.1.2. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 (DT2) se caractérise par une synthèse insuffisante d'insuline et sa sécrétion, résultant d'une dysfonction des cellules β et d'une résistance à l'action de l'insuline dans les tissus cibles. Ce type de diabète est généralement identifié après la quatrième décennie de la vie (Kaul *et al.*, 2012).

Les principaux facteurs de risque associés à ce type de diabète sont l'obésité, l'inactivité physique, les antécédents de diabète gestationnel, les antécédents familiaux de diabète, l'hypertension et certaines origines ethniques (Kaul *et al.*, 2012 ; Nandhini *et al.*, 2023).

1.1.3. Diabète sucré gestationnel

Le diabète gestationnel (DG) est défini comme une intolérance au glucose de divers degrés, détectée pour la première fois pendant la grossesse (Buchanan et Xiang, 2005). Il résulte d'une résistance accrue à l'insuline et d'un dysfonctionnement des cellules bêta du pancréas (Imam, 2013).

1.1.4. Autres types de diabète

En plus du DT1, du DT2 et du DG, d'autres formes de diabète existent. Parmi celles-ci, on retrouve le diabète monogénique, qui résulte de mutations génétiques affectant la fonction des cellules bêta ou l'action de l'insuline, ainsi que le diabète lié à des maladies du pancréas (traumatisme, tumeur, inflammation, etc.). Il existe également le diabète médié par le système immunitaire, ainsi que certains cas de diabète induits par des médicaments ou des produits chimiques (OMS, 2020).

1.2. Complications du diabète

Les complications du diabète constituent un ensemble varié de troubles qui affectent de manière significativement la qualité de vie des patients (Dutta *et al.*, 2023). Parmi les complications les plus fréquentes figurent les maladies cardiovasculaires, l'artériopathie périphérique, les affections ophtalmiques, rénales, ainsi que la neuropathie périphérique. En outre, le diabète accroît le risque d'infections bactériennes, fongiques et virales, souvent observées chez les patients atteints de diabète de type 2 (Atreja *et al.*, 2023).

L'une des complications les plus sévères du diabète est le pied diabétique, résultant d'anomalies affectant la vascularité, les nerfs périphériques, la peau et le système musculo-squelettique (Dutta *et al.*, 2023).

2. Pied diabétique**2.1. Définition**

Le pied diabétique est l'une des complications les plus graves du diabète sucré. Il se définit comme toute ulcération, infection ou autre condition destructrice du membre inférieur chez les personnes atteintes de diabète (van Netten *et al.*, 2020).

Le pied diabétique est généralement associé à des anomalies neurologiques, ainsi qu'à des degrés variables de maladie artérielle périphérique dans les membres inférieurs, contribuant à un risque accru de complications (Abbas et Boulton, 2022).

2.2. Ulcère du pied diabétique

L'ulcère du pied diabétique (UPD) est défini comme une rupture de l'épiderme et du derme (McDermott *et al.*, 2023), causé souvent par une pression excessive sur les zones plantaires porteuses, des frottements et des traumatismes causés par des chaussures mal ajustées ou des anomalies de la marche, la présence de blessures d'autres origines, ainsi que la présence des déformations physiologiques (McDermott *et al.*, 2023 ; Schaper *et al.*, 2019).

2.3. Morbidité et mortalité

2.3.1. Infection du pied diabétique

Une infection du pied diabétique (IPD) est définie comme toute infection située sous la malléole chez une personne atteinte de diabète sucré. Ces infections résultent de l'invasion microbienne des tissus mous ou osseux, en nombre suffisant pour déclencher une réponse de l'hôte, ce qui entraîne une altération de la cicatrisation (Hurlow *et al.*, 2018).

Les IPD surviennent fréquemment comme conséquence des UPD, plutôt que comme leur cause. Toutefois, elles peuvent entraîner une détérioration significative et retarder la cicatrisation (Jeffcoate et Harding, 2003).

Les IPD se développent généralement à partir d'une rupture de la barrière cutanée, souvent causée par un traumatisme ou une ulcération. Bien que la plupart des IPD soient superficielles au moment du diagnostic, elles peuvent rapidement se propager par voie vasculaire vers les tissus sous-cutanés (Saeed *et al.*, 2020). Elle inclue diverses formes cliniques, notamment les infections des UPD, les panaris, les cellulites, les myosites, les abcès, les fasciites nécrosantes, les arthrites septiques, les tendinites et les ostéomyélites (Lipsky *et al.*, 2012b).

L'ostéomyélite est généralement considérée comme la forme la plus grave des IPD, car lorsqu'elle atteint les os, elle provoque une augmentation de la pression intraosseuse et altère la circulation sanguine, entraînant ainsi la nécrose osseuse ischémique (Hartemann-Heurtier et Senneville, 2008).

2.3.2. Récidive

Malgré une prise en charge clinique appropriée, les ulcères deviennent facilement des plaies chroniques (Jeffcoate et Harding, 2003). Chez les patients ayant guéri d'UPD, le taux de récurrence reste élevé, atteignant 57,5 % dans les trois ans suivant la guérison (Dubský *et al.*, 2013).

Plusieurs facteurs de risque sont associés à cette récurrence, notamment la localisation plantaire de l'ulcère, la présence d'ostéomyélite sous-jacente, ainsi qu'un mauvais contrôle glycémique (Dubský *et al.*, 2013).

L'incidence de récurrence des ulcères est estimée à 97 pour 1 000 personnes-années de suivi, ce qui souligne la nécessité d'une prévention ciblée et d'un suivi à long terme chez les patients à risque (Chamberlain *et al.*, 2022).

2.3.3. Amputation

L'UPD mène souvent à l'amputation, avec un taux de mortalité élevé. Les amputations se réalisent généralement à un stade avancé des maladies, telles que l'ischémie sévère, la gangrène, les infections sévères et les UPD chroniques non cicatrisants (Chen *et al.*, 2023).

La prévalence d'amputation chez les patients atteints d'UPD est de 18 %, avec une moyenne d'âge de 62,9 ans (Rodrigues *et al.*, 2022). Plusieurs facteurs de risque sont associés à des taux d'amputation plus élevés, notamment le sexe, la présence et la durée prolongée d'une UPD, l'âge avancé, un mauvais contrôle glycémique, la neuropathie périphérique, la maladie vasculaire périphérique, l'insuffisance rénale et le tabagisme (Bruun *et al.*, 2013 ; Rodrigues *et al.*, 2022).

L'amputation ne reflète pas toujours un échec dans la prise en charge des patients, mais peut résulter d'une approche appropriée visant à sauver des vies et à permettre un retour à une vie quotidienne plus indépendante. Toutefois, une forte prévalence des UPD, associée à une prise en charge tardive, conduit souvent à un taux élevé d'amputation et de mortalité (Jeffcoate et Harding, 2003).

2.3.4. Mortalité

Les taux de survie globale des patients atteints d'UPD sont de 86,9 % à 1 an, 66,9 % à 3 ans et 50,9 % à 5 ans. Les maladies cardiovasculaires et les infections, y compris les IPD représentent les deux principales causes de décès. De plus, l'âge avancé, le sexe masculin, l'amputation, la maladie artérielle périphérique et la maladie rénale chronique sont associés à des taux de mortalité élevés (Chamberlain *et al.*, 2022 ; Chen *et al.*, 2023).

Le taux de mortalité chez les patients ayant subi une amputation est alarmant, avec une estimation de 39 à 68 % à 5 ans (Dietrich *et al.*, 2017). De même, les patients ayant des antécédents d'UPD présentent un risque de mortalité accru de 2,3 fois par rapport à ceux qui n'en ont pas, sur une période de suivi de 5,9 ans (Chamberlain *et al.*, 2022).

2.4. Épidémiologie de l'UPD

2.4.1. Prévalence et incidence de l'UPD

D'après des méta-analyses récentes, la prévalence mondiale de l'UPD est estimée à environ 6,3 %, touchant près de 33 millions de personnes (McDermott *et al.*, 2023). La prévalence la plus élevée a été observée en Amérique du Nord (13,0 %), suivie de l'Afrique (7,2 %), et celle de l'Asie (5,5 %), tandis que la prévalence la plus faible a été rapportée en Océanie (3,0 %) (Zhang *et al.*, 2017) (**Figure 1**).

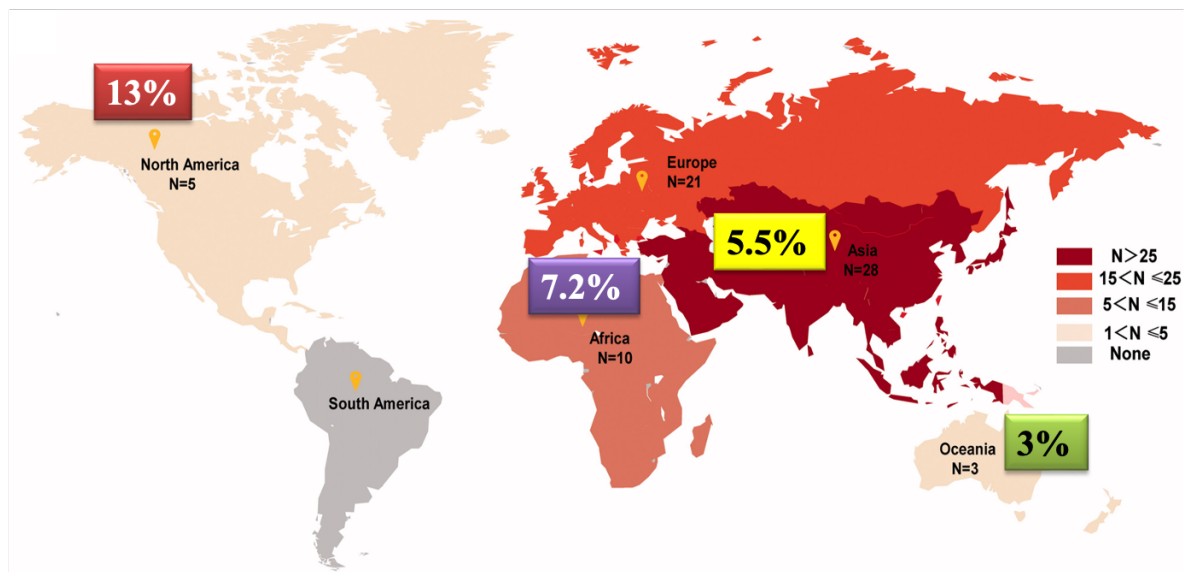


Figure 1: Prévalence mondiale de l'UPD selon les continents, issue d'une méta-analyse. N correspond au nombre d'études incluses dans la méta-analyse pour chaque continent (Zhang *et al.*, 2017).

Selon des données issues d'une autre méta-analyse, depuis 2010, l'incidence cumulée annuelle de l'UPD dans le monde a considérablement augmenté, atteignant des niveaux allant de 0,2 % à 11 % dans les milieux cliniques spécialisés et de 0,1 % à 8 % dans les communautés. Cette hausse notable reflète l'augmentation de la prévalence du diabète dans le monde (McDermott *et al.*, 2023).

2.4.2. Facteurs de risque de l'UPD

Les UPD résultent souvent d'une combinaison de facteurs mécaniques extrinsèques, tels que des pressions plantaires excessives ou des traumatismes, ainsi que de facteurs intrinsèques liés à l'hôte, notamment des complications du diabète comme la neuropathie périphérique, l'artériopathie périphérique, les maladies cardiovasculaires, et l'immunopathie (McDermott *et al.*, 2023 ; Tomic *et al.*, 2022) (Figure 2).

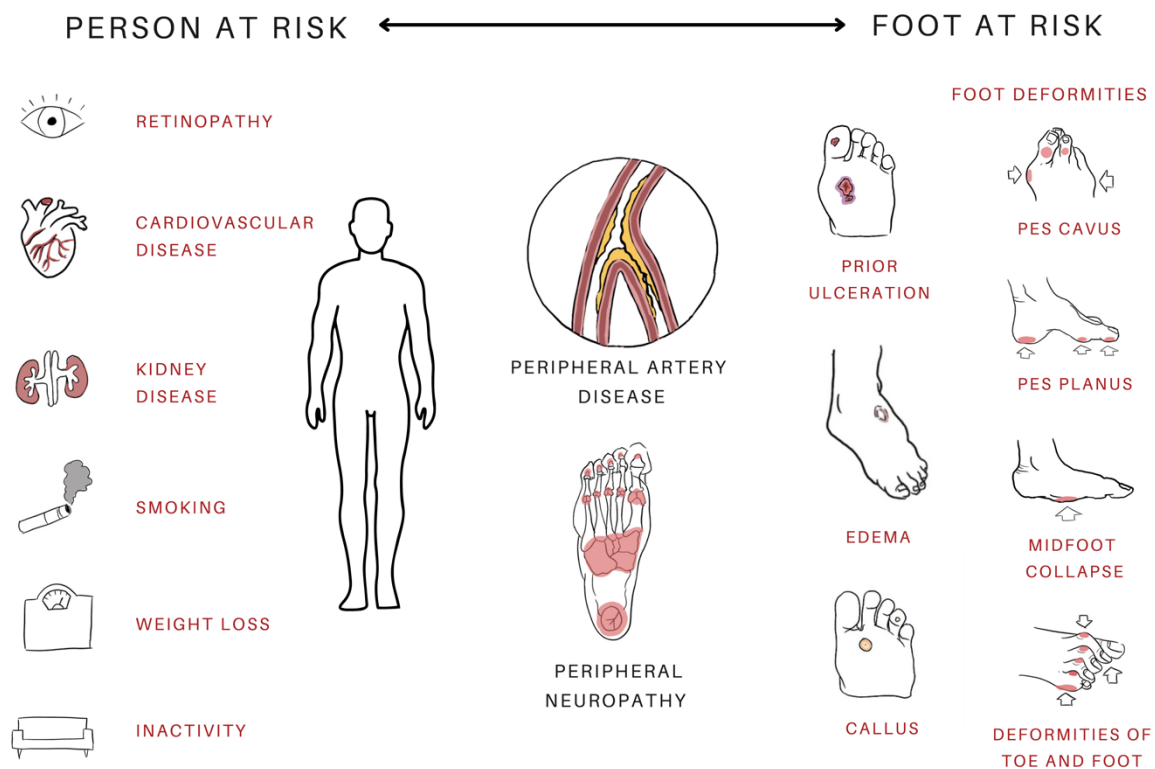


Figure 2: Les facteurs favorisant les UPD (McDermott *et al.*, 2023)

a. Neuropathie périphérique diabétique

La neuropathie périphérique diabétique désigne la présence de symptômes et/ou de signes de dysfonctionnement des nerfs périphériques, résultant d'une dysfonction nerveuse et d'une mort cellulaire causées par le stress oxydatif, l'inflammation et la dysrégulation des voies métaboliques liées à l'hyperglycémie et à la résistance à l'insuline (Hicks et Selvin, 2019 ; Pop-Busui *et al.*, 2017).

Elle touche près de 50 % des adultes atteints de diabète au cours de leur vie et est associée à une morbidité importante, notamment des amputations des membres inférieurs (Hicks et Selvin, 2019).

La neuropathie périphérique diabétique se manifeste par des douleurs et des paresthésies, mais peut également être asymptomatique dans jusqu'à 50 % des cas. Elle s'accompagne de déficits sensoriels, et la perte de la sensibilité proprioceptive à la douleur et à la température prédispose à des traumatismes, ce qui peut entraîner la formation d'ulcères et retarder souvent leur diagnostic (McDermott *et al.*, 2023).

b. Angiopathie diabétique

L'angiopathie diabétique est une complication courante chez les patients diabétiques, affectant les vaisseaux sanguins (Pitocco *et al.*, 2019). Cette affection résulte d'une athérosclérose accélérée due au diabète, où les parois artérielles s'épaississent et perdent leur élasticité, en grande partie à cause de l'accumulation de plaques lipidiques. Cela entraîne une réduction du flux sanguin et provoque une artériopathie périphérique des membres inférieurs (Pitocco *et al.*, 2019).

L'artériopathie périphérique diabétique est considérée comme la principale cause d'amputations des membres inférieurs et de liées à l'UPD (Peters *et al.*, 2005 ; Pitocco *et al.*, 2019).

c. Maladies cardiovasculaires

L'insuffisance cardiaque congestive, la maladie coronarienne et l'accident vasculaire cérébral sont les principales complications cardiovasculaires affectant jusqu'à 30 % des personnes atteintes de diabète (Dietrich *et al.*, 2017).

Les patients diabétiques atteints d'UPD présentent un taux de mortalité cardiovasculaire significativement plus élevé que ceux sans problèmes de pieds. En effet, 78 % des patients diabétiques souffrant d'ulcères du pied montrent des signes de dysfonctionnement cardiaque (Löndahl *et al.*, 2008).

d. Immunopathie

L'hyperglycémie persistante a un effet délétère sur l'immunité innée, ce qui pourrait entraîner des infections de la peau et des infections des tissus mous (Park *et al.*, 2009). Cet effet néfaste se traduit par des défauts dans la fonction des leucocytes ainsi que par des modifications morphologiques des macrophages (Pitocco *et al.*, 2019).

Il a été démontré que l'hyperglycémie altère l'activité phagocytaire des cellules mononucléées chez les patients atteints de DT2. Cette altération est due à l'activation de l'aldose réductase par l'hyperglycémie, ce qui conduit à la réduction de l'excès de glucose en sorbitol (Lecube *et al.*, 2011). Ce processus consomme une grande quantité de NADPH, réduisant ainsi sa disponibilité pour les fonctions des cellules mononucléées, ce qui altère leur pouvoir oxydatif de destruction des agents pathogènes (Lecube *et al.*, 2011).

De plus, l'hyperglycémie a été prouvée responsable de l'augmentation de l'apoptose dans les plaies diabétiques, notamment dans les plaies les plus sévères, ce qui retarde le processus de cicatrisation chez les diabétiques (Rai *et al.*, 2005).

e. Age et duration de diabète

L'âge et la durée du diabète ont été identifiés comme des facteurs de risque d'UPD, d'amputations des membres inférieurs et de mortalité (Chamberlain *et al.*, 2022).

Cependant, un jeune âge représente également un facteur de risque pour la récurrence des UPD, en raison des traumatismes répétitifs associés à des niveaux d'activité plus élevés au sein de cette population (Hicks *et al.*, 2020).

f. Sexe

Le sexe masculin a été identifié comme un facteur de risque majeur de complications liées au pied diabétique, avec un ratio de 1,5 pour les patients diabétiques masculins comparés aux patients diabétiques féminins (Rossboth *et al.*, 2021).

De plus, les patients masculins atteints d'UPD sont 3,4 fois plus susceptibles de subir une amputation par rapport aux patientes féminines (Moura Neto *et al.*, 2013). Cette différence entre les deux sexes peut être attribuée à l'engagement des hommes dans des activités de travail physique intense (Moura Neto *et al.*, 2013).

g. Glycémie

Un mauvais contrôle du diabète, reflété par des niveaux élevés des principaux biomarqueurs du diabète, tels que l'hémoglobine glycosylée (HbA1c), la glycémie à jeun, la glycémie postprandiale et le niveau d'insuline, a été identifié comme un facteur de risque majeur pour le développement des UPD et leurs complications (Jiang *et al.*, 2015 ; Rossboth *et al.*, 2021).

h. Obésité

Bien que l'obésité et le manque d'activité physique figurent parmi les principaux facteurs de risque du DT2, certaines études n'ont pas établi d'association entre l'obésité et l'UPD (Rossboth *et al.*, 2021).

Une étude récente a identifié l'obésité comme un facteur de risque significatif pour l'UPD chez les patients diabétiques, révélant que les individus ayant un IMC ≥ 45 présentent un risque 2,1 fois plus élevé d'ulcération du pied au cours des six années suivantes (Sohn *et al.*, 2014).

2.4.3. Physiopathologie

La neuropathie périphérique, qu'elle soit sensorielle, motrice ou vasomotrice (autonome), résulte d'interactions complexes entre les anomalies métaboliques et l'altération des vasa nervorum, ce qui affecte la sensation protectrice, l'innervation des muscles du pied et le contrôle vasomoteur (Lipsky *et al.*, 2016).

La neuropathie motrice altère la fonction des muscles responsables du mouvement normal du pied, modifiant ainsi la répartition des forces lors de la marche. Cela favorise la formation de callosités, et la nécrose ischémique des tissus sous-jacents peut entraîner une dégradation progressive de la peau et du tissu sous-cutané, générant des ulcères neuropathiques.

Ces plaies ouvertes sont souvent colonisées par la flore cutanée avant de devenir infectées (Jeffcoate et Harding, 2003).

La neuropathie vasomotrice perturbe la régulation nerveuse périphérique de la circulation sanguine au niveau des artérioles, réduisant ainsi l'irrigation des zones nécessitant un apport sanguin et favorisant l'ischémie tissulaire (Jeffcoate et Harding, 2003 ; Lipsky *et al.*, 2016). Toutefois, chez les patients diabétiques, elle constitue rarement la cause primaire des plaies du pied. Néanmoins, elle accroît le risque d'infection et complique son évolution. La perte de la sudation protectrice, conséquence de la neuropathie autonome, laisse la peau du pied ischémique rouge, sèche, fine, avec des ongles dystrophiques (Jeffcoate et Harding, 2003 ; Lipsky *et al.*, 2016)

Les ulcères neuropathiques se manifestent typiquement par des ulcérations rondes et perforées localisées sur les surfaces plantaires du pied, avec des bords surélevés, macérés ou sous-minés, associés à un épaississement callositaire périphérique (**Figure 3 B et C**). En revanche, les ulcères ischémiques ou neuroischémiques apparaissent sous forme de lésions irrégulières, avec une base pâle ou nécrotique, et peuvent évoluer vers une gangrène (McDermott *et al.*, 2023).

Les ulcères ischémiques et neuroischémiques ont tendance à être plus grands, localisés au niveau du médio-pied ou de l'arrière-pied, et sont fréquemment associés à la cellulite, aux abcès ou à l'ostéomyélite (**Figure 3 D–I**) (McDermott *et al.*, 2023).



Figure 3: Exemples représentatifs d'ulcères préulcératifs (A), neuropathiques (B et C), neuroischémiques (D–F) et ischémiques (G–I) dans les UPD (McDermott *et al.*, 2023).

3. Diagnostic

Tous les patients présentant une UPD/IPD nécessitent une évaluation à trois niveaux : l'état général du patient (statut cognitif, métabolique et hydrique), l'examen du pied (la présence d'une neuropathie et d'une insuffisance vasculaire) et l'évaluation de la plaie infectée (nécrose, tissu de granulation friable ou décoloré, sécrétions non purulentes, odeur fétide) (Lipsky *et al.*, 2016).

Le diagnostic clinique repose sur la présence d'au moins deux signes ou symptômes locaux et systémiques d'inflammation, tels qu'une rougeur péri-ulcéreuse ou une induration, un écoulement purulent accru, ainsi qu'une douleur exacerbée liée à la congestion tissulaire (Armstrong et Lipsky, 2004 ; Hurlow *et al.*, 2018 ; Lipsky *et al.*, 2016).

Un diagnostic et une prise en charge précoces des infections sont essentiels chez les diabétiques. Cependant, ce diagnostic peut être retardé car les signes et symptômes locaux d'infection sont souvent atténués dans une IPD en raison de la neuropathie périphérique et de l'artériopathie périphérique concomitantes (Hurlow *et al.*, 2018).

Après identification des UPD/IPD, les cliniciens doivent classer leur gravité à l'aide d'un système de classification adéquat, prenant en compte à la fois la présence et la gravité de l'infection (Lipsky *et al.*, 2016).

Lors du diagnostic initial et pendant le suivi des patients, des examens d'imagerie (radiographies standard, IRM, scintigraphie) et des tests de laboratoire (cultures, sensibilité aux antibiotiques, suivi des marqueurs inflammatoires sériques et examens histologiques) sont nécessaires pour définir l'étendue de l'infection et toute implication osseuse (Lipsky *et al.*, 2016).

4. Systèmes de classification des UPD/IPD

Actuellement, il existe 37 systèmes de classification pour les UPD/IPD. Cependant, seuls 19 sont conçus pour guider les soins cliniques et mener des audits. Les autres systèmes, principalement destinés à la recherche prospective, n'ont pas été validés pour évaluer les résultats cliniques (Monteiro-Soares *et al.*, 2020).

Les systèmes de classification prennent en compte divers facteurs liés au patient (l'insuffisance rénale), au membre affecté (l'artériopathie périphérique et la neuropathie), ainsi qu'à l'ulcère (surface, profondeur, localisation, nombre et présence d'infection) (IWGDF, 2023 ; Monteiro-Soares *et al.*, 2020).

Le groupe international de travail sur le pied diabétique (International Working Group on the Diabetic Foot, IWGDF) recommande l'utilisation de cinq systèmes de classification dans la pratique clinique courante, en fonction des objectifs visés (IWGDF, 2023) .

4.1. Classification de Meggitt-Wagner

Le système de classification des UPD de Meggitt-Wagner est un outil simple et facile à utiliser pour le personnel de santé (Meggitt, 1976 ; Wagner, 1979).

Il comprend six groupes distincts (grades 0 à 5) et offre une description des ulcères à différents stades de gravité (**Tableau 1**), en tenant compte de la profondeur de l'ulcère ainsi que de la présence d'ostéomyélite ou de gangrène (Oyibo *et al.*, 2001).

Tableau 1: Systèmes de classification Meggitt-Wagner des UPD (Mills *et al.*, 2014 ; Mponponsuo *et al.*, 2021)

Grades	Description
Grade 0	Peau intacte
Grade 1	Ulcère superficiel
Grade 2	Ulcère profond atteignant le tendon ou la capsule sans ostéomyélite ni abcès
Grade 3	Ulcère profonde avec atteinte osseuse, ostéomyélite ou formation d'abcès
Grade 4	Gangrène (partielle) des orteils ou de l'avant-pied
Grade 5	Gangrène de l'ensemble du pied.

Bien que cette classification soit la plus couramment utilisée en raison de sa simplicité d'application clinique, elle présente plusieurs limitations (Bravo-Molina *et al.*, 2018). Elle ne permet pas d'identifier l'artériopathie périphérique, la perte de la sensibilité ou l'infection, et ne distingue pas la gangrène causée par une infection de celle provoquée par l'ischémie, ce qui limite sa précision dans l'évaluation des complications (Karthikesalingam *et al.*, 2010 ; Schaper *et al.*, 2019).

De plus, elle ne fournit aucune indication sur le degré d'infection, l'intensité de l'ischémie ni l'étendue de la plaie, ce qui impacte la prise en charge optimale et la personnalisation des traitements (Mills *et al.*, 2014).

4.2. Classification de l'Université du Texas

La classification de l'Université du Texas a été développé en 1996 à l'Université du Texas (Lavery *et al.*, 1996). Elle évalue la présence d'ischémie, d'infection ou les deux, en fonction de la profondeur de la plaie, en utilisant une grille bidimensionnelle de 4 x 4 créant une matrice de 16 carrés (**Tableau 2**) (Bravo-Molina *et al.*, 2018 ; Lavery *et al.*, 1996).

Les facteurs liés aux patients, les déformations de pied, la perte de la sensibilité de protection, ainsi que la localisation et la taille de l'ulcère ne sont pas pris en considération dans cette classification (Mponponso *et al.*, 2021 ; Schaper *et al.*, 2019).

Tableau 2: Système de classification l'Université du Texas des UPD (Hobizal et Wukich, 2012 ; Lavery *et al.*, 1996)

	0	1	2	3
A	Pas de lésion ouverte	Ulcère superficielle	Plaie pénétrant au tendon ou à la capsule	Plaie pénétrant à l'os ou à l'articulation
B	Infection	Infection	Infection	Infection
C	Ischémie	Ischémie	Ischémie	Ischémie
D	Infection et ischémie	Infection et Ischémie	Infection et Ischémie	Infection et Ischémie

4.3. Classification SINBAD

Le système de classification SINBAD (Site, Ischaemia, Neuropathy, Bacterial Infection, Area, Depth) est un outil simple, basé sur l'examen clinique, particulièrement adapté aux contextes où les équipements spécialisés sont limités ou indisponibles. Il fournit des informations essentielles pour évaluer le pronostic de guérison de l'ulcère ou le risque d'amputation (IWGDF, 2023 ; Monteiro-Soares *et al.*, 2020).

Le système SINBAD prend en compte plusieurs paramètres, tels que la localisation et la profondeur de l'ulcère, ainsi que la présence d'artériopathie et de neuropathie. Chaque paramètre est noté de 0 à 1 point (**Tableau 3**), pour un score total maximal de 6 points.

En général, un score égal ou supérieur à 3 est associé à un pronostic moins favorable dans divers contextes cliniques (Monteiro-Soares *et al.*, 2020).

Tableau 3: Systèmes de classification SINBAD des UPD (IWGDF, 2023)

Pondération	Catégorie	Définition
0	Localisation	Ulcère situé à l'avant-pied
1		Ulcère situé au médio-pied ou arrière-pied
0	Ischémie	Débit sanguin conservé : au moins un pouls palpable
1		Signes cliniques de réduction du flux artériel au niveau du pied
0	Neuropathie	Sensibilité de protection intacte
1		Perte de la sensibilité de protection
0	Infection bactérienne	Absence d'infection bactérienne
1		Présence d'infection bactérienne
0	Surface	Surface d'ulcère < 1 cm ²
1		Surface d'ulcère ≥ 1 cm ²
0	Profondeur	Plaie superficielle limitée au tissu sous-cutané
1		Plaie profonde atteignant muscle, tendon
6	Score total possible	

Cette classification a été validée pour prédire à la fois la guérison de l'ulcère et le risque d'amputation. Elle est recommandée pour faciliter la communication entre les professionnels de santé concernant les caractéristiques de l'ulcère et est utilisée pour les audits des patients atteints d'UPD, permettant des comparaisons entre établissements (IWGDF, 2023 ; Schaper *et al.*, 2019).

4.4. Classification PEDIS

Le système de classification PEDIS (perfusion, extent/size, depth/tissue loss, infection, sensation) a été élaboré en 2004 par la Société Américaine des Maladies Infectieuses (IDSA) et le Groupe de Travail International sur le Pied Diabétique (IWGDF) (Schaper, 2004).

Ce système repose sur l'évaluation de plusieurs aspects : la taille (surface et profondeur), l'infection, la perfusion (artériopathie) et la sensation (neuropathie), comme indiqué dans le **Tableau 4** (Bravo-Molina *et al.*, 2018 ; Monteiro-Soares *et al.*, 2020 ; Pitocco *et al.*, 2019 ; Schaper, 2004).

Tableau 4: Système de classification PEDIS des IPD (IWGDF, 2023)

Description clinique	Sévérité de l'infection	Grade PEDIS
Aucun symptôme ni signe d'infection, qu'il soit systémique ou local.	Non infecté	1
Présence d'au moins deux manifestations d'inflammation (purulence, érythème, douleur, chaleur ou induration), avec une cellulite ou un érythème s'étendant à 2 cm ou moins autour de l'ulcère, l'infection étant limitée à la peau ou aux tissus sous-cutanés superficiels, sans autres complications locales ni maladie systémique.	Infection légère	2
Infection impliquant des structures plus profondes que la peau et les tissus sous-cutanés chez un patient qui est systématiquement bien, mais qui présente au moins une des caractéristiques suivantes : cellulite s'étendant à plus de 2 cm, stries lymphangitiques, propagation sous le fascia superficiel, abcès tissulaire profond, gangrène, ou atteinte du muscle, du tendon, de l'articulation ou de l'os.	Infection modéré	3

Infection avec syndrome de réponse inflammatoire systémique chez un patient présentant une instabilité métabolique, avec des symptômes tels que fièvre, frissons, tachycardie, hypotension, confusion, vomissements, hyperleucocytose, acidose, hyperglycémie sévère ou azotémie. Infection sévère 4

PEDIS : perfusion, extent/size, depth/tissue loss, infection, sensation.

L'objectif de la classification PEDIS est d'orienter la prise en charge, notamment pour identifier les patients nécessitant une hospitalisation pour antibiothérapie. Ainsi, un score plus élevé est associé à un risque accru d'amputation, à un niveau anatomique d'amputation plus élevé et à un risque d'hospitalisation accru (Nikoloudi *et al.*, 2018).

Contrairement à la plupart des autres systèmes de classification qui évaluent la taille et la profondeur de l'ulcère ainsi que la présence ou l'absence de gangrène, de neuropathie ou d'insuffisance artérielle, le système PEDIS permet d'évaluer spécifiquement la présence et la gravité de l'infection (Lipsky *et al.*, 2016).

Cependant, il ne prend pas en compte les facteurs spécifiques au patient, tels que la néphropathie au stade terminal, et ne précise ni la localisation ni le nombre d'ulcères présents sur le pied (Schaper *et al.*, 2019).

4.5. Classification Wifi

Le système de classification Wifi (Wound, Ischemia, foot Infection) a été proposé par la Société de chirurgie vasculaire en 2014 (Mills *et al.*, 2014). Son objectif est de stratifier le risque d'amputation majeure à un an et de prédire la probabilité qu'une revascularisation soit nécessaire pour préserver le membre (Mills *et al.*, 2014 ; Monteiro-Soares *et al.*, 2020).

Le système Wifi repose sur l'évaluation des UPD en prenant en compte trois facteurs principaux influençant le risque d'amputation et la prise en charge clinique : la profondeur de la plaie (W), le degré d'ischémie (I) (évalué à partir de l'indice de pression systolique à la cheville, de la pression transcutanée en oxygène et de la pression systolique des orteils), et la présence ou l'absence d'infection du pied (fi), chacune sur une échelle de 0 à 3 (**Tableau 5**). De plus,

l'évaluation de l'infection est effectuée selon les critères de l'IDSA/IWGDF (Mills *et al.*, 2014 ; Monteiro-Soares *et al.*, 2020).

Tableau 5: Système de classification Wifi des UPD (IWGDF, 2023 ; Mills *et al.*, 2014)

Plaie			
Grade	UPD	Description clinique	Gangrène
0	Absence d'ulcère	Perte tissulaire mineure pouvant être traitée par une amputation digitale limitée (un ou deux orteils) ou une simple couverture cutanée.	Pas de gangrène
1	Petit ulcère superficiel sur la jambe ou le pied distal ; pas d'os exposé, sauf si limité à la phalange distale.	Perte tissulaire mineure. Sauvable par amputation digitale simple (un ou deux doigts) ou couverture cutanée	Pas de gangrène
2	Ulcère plus profond avec os, articulation ou tendon exposé ; généralement sans implication du talon ; ulcère superficiel du talon sans implication calcanéenne.	Perte tissulaire majeure sauvable par amputations multiples (≥ 3) ou amputation trans métatarsienne (TMA) standard \pm couverture cutanée.	Changements gangréneux limités aux doigts.
3	Ulcère profond et étendu impliquant l'avant-pied et/ou le médio-pied ; ulcère profond et complet du talon \pm implication calcanéenne.	Perte tissulaire étendue sauvable uniquement par une reconstruction complexe du pied ou une TMA non traditionnelle (Chopart ou Lisfranc); couverture par lambeau ou gestion complexe de la plaie nécessaire pour un large défaut de tissus mous.	Gangrène étendue impliquant l'avant-pied et/ou le médio-pied ; nécrose complète du talon avec implication calcanéenne.

Ischémie

Grade	Ischémie	Pression systolique à la cheville, mmHg	Pression des orteils, Pression d'oxygène transcutanée
0	≥ 0.80	> 100	≥ 60
1	0.6-0.79	70-100	40-59
2	0.4-0.59	50-70	30-39
3	≤ 0.39	< 50	< 30

IPD

Grade	Manifestations cliniques
0	<p>Pas de symptômes ou de signes d'infection.</p> <p>Infection présente, définie par la présence d'au moins deux des éléments suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gonflement ou induration localisés • Érythème $> 0,5$ à ≤ 2 cm autour de l'ulcère • Sensibilité ou douleur locale • • Chaleur locale • Écoulement purulent
1	<p>Infection locale n'impliquant que la peau et le tissu sous-cutané (sans atteinte des tissus plus profonds et sans signes systémiques). Exclure d'autres causes de réponse inflammatoire de la peau (par exemple, traumatisme, goutte, neuro-ostéoarthropathie de Charcot aiguë, fracture, thrombose et stase veineuse)</p>
2	<p>Infection locale avec érythème > 2 cm ou impliquant des structures plus profondes que la peau et les tissus sous-cutanés (par exemple, abcès, ostéomyélite, arthrite septique et fasciite) et sans signes de réponse inflammatoire systémique</p>
3	<p>Infection locale avec des signes de réponse inflammatoire systémique, se manifestée par deux ou plusieurs des éléments suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Température > 38 °C ou < 36 °C • Fréquence cardiaque > 90 battements/min

- Fréquence respiratoire >20 respirations/min ou PaCO₂ <32 mmHg
- Numération des globules blancs >12 000 ou <4000 mm³ ou 10 % de formes immatures (bandes)

mmHg millimètre de mercure

Malgré son utilité pour évaluer le risque d'amputation, le système WiFi présente des limites. Il est relativement complexe et nécessite une expertise en mesures de perfusion, ce qui peut limiter son application dans certains contextes cliniques. De plus, il ne prend pas en compte la neuropathie périphérique ni la perte de sensation protectrice, qui sont pourtant des éléments cruciaux dans la gestion des ulcères du pied diabétique (McDermott *et al.*, 2023).

5. Pathogénie et étiologie de l'IPD

5.1. Microbiote cutané

Le microbiote cutané est une communauté microbienne complexe et hautement dynamique, principalement dominée par des microbes commensaux (Uberoi *et al.*, 2020). Ces derniers jouent un rôle crucial dans le maintien de l'équilibre cutané et la protection contre la colonisation par des agents pathogènes (Grice et Segre, 2011 ; Uberoi *et al.*, 2020).

Cependant, le diabète induit des modifications du microbiote cutané, notamment une sécheresse accrue, une altération du pH et la glycosylation des protéines structurelles de la peau. Ces changements peuvent perturber l'équilibre microbien et conduire à un état de dysbiose (Gardiner *et al.*, 2017). Par conséquent, des organismes généralement considérés comme non pathogènes peuvent provoquer des infections (Uberoi *et al.*, 2020). Un exemple représentatif des altérations induites par le diabète sur le microbiote cutané est la concentration élevée de glucose dans les UPD, qui favorise la formation de biofilm en activant l'expression de l'opéron *ica* chez *S. aureus*. Ce processus contribue à l'aggravation des lésions et au ralentissement de la cicatrisation (Luo *et al.*, 2019 ; Pouget *et al.*, 2021).

En outre, la perte d'intégrité de la barrière cutanée dans la zone de l'UPD compromet les mécanismes protecteurs normalement associés à une peau intacte. Cette défaillance crée une porte d'entrée favorable à l'invasion par des micro-organismes, facilitant ainsi la colonisation et l'infection (Grice, 2015).

L'exposition du tissu sous-cutané et le retard de cicatrisation, résultant d'une perte d'intégrité cutanée et d'une immunité affaiblie, créent des conditions propices à la colonisation et à la prolifération des UPD par les micro-organismes autochtones de la peau (Bowler *et al.*, 2001).

5.2. Confirmation de l'infection

La simple présence de micro-organismes dans une plaie ne constitue pas nécessairement une infection clinique (Williams *et al.*, 2004). La présence de micro-organismes non répliatifs dans l'UPD est qualifiée de contamination. Lorsque ces micro-organismes se multiplient rapidement sans provoquer de réaction immunitaire évidente chez l'hôte, il s'agit alors de colonisation (Jneid *et al.*, 2017 ; Williams *et al.*, 2004).

En revanche, l'infection résulte de l'interaction entre l'hôte et des bactéries en multiplication accompagnée des lésions tissulaires, entraînant une réaction immunitaire évidente et une réponse inflammatoire (Pitocco *et al.*, 2019 ; Williams *et al.*, 2004).

Malgré les efforts considérables déployés et les systèmes de classification développés, basés sur des critères cliniques pour reconnaître et classer la gravité des IPD, la distinction entre infection, contamination et colonisation demeure un défi pour les cliniciens (Pitocco *et al.*, 2019 ; Williams *et al.*, 2004).

Les signes cliniques typiques de l'infection sont le gonflement, la rougeur, la douleur, la chaleur, une mauvaise odeur, la perte de fonction, la faible tension en oxygène transcutané, la présence de tissu nécrotique, la dégradation de la plaie ou simplement l'absence de guérison (Bjarnsholt *et al.*, 2008). Cependant, ces signes peuvent être masqués par l'immunité altérée de l'hôte due au diabète, l'artériopathie la neuropathie, ce qui complique le diagnostic. Un retard dans l'identification de l'infection peut entraîner sa progression, passant d'une forme limitée à une forme plus grave (Jneid *et al.*, 2017).

L'évolution d'une plaie, de la contamination à l'infection, et la manière dont cette infection se manifestera dépendent de l'interaction complexe entre les bactéries présentes dans la plaie et la réponse immunitaire de l'hôte (Bjarnsholt *et al.*, 2008 ; Hurlow *et al.*, 2018 ; Kalan et Brennan, 2019). Il existe un spectre, ou continuum, de l'évolution des IPD (**figure 4**).

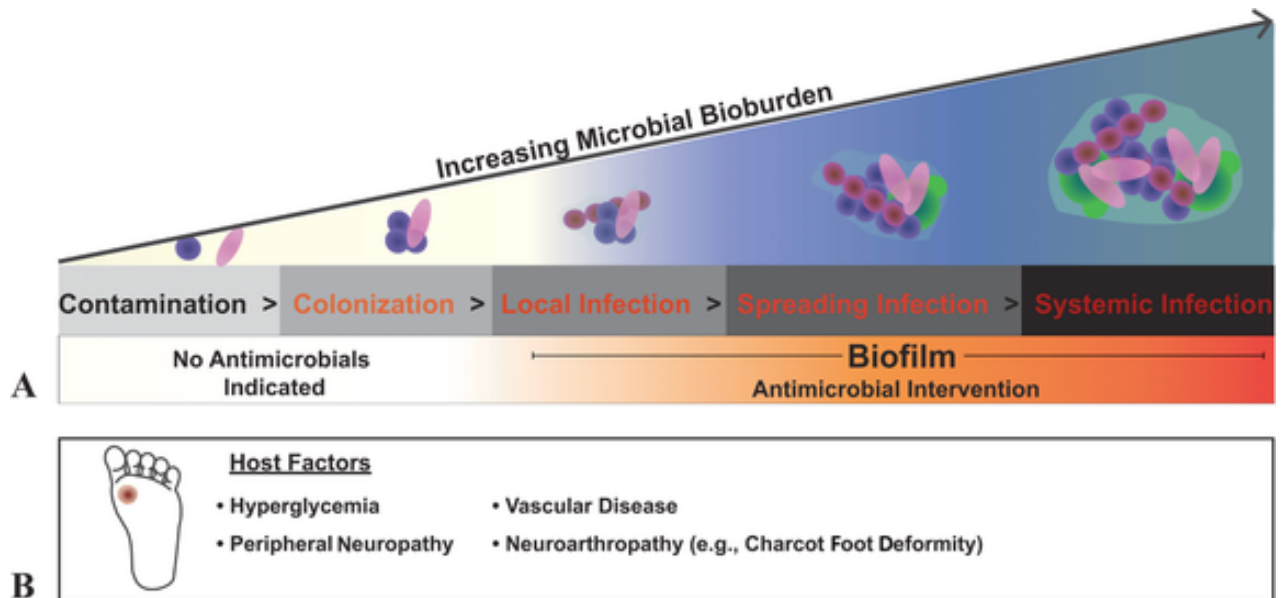


Figure 4: Facteurs influençant la cicatrisation altérée des UPD. (A) Le continuum d'infection des UPD. (B) Facteurs de l'hôte contribuant à une cicatrisation altérée chez les patients diabétiques (Kalan et Brennan, 2019).

D'un autre côté, une charge bactérienne élevée, généralement supérieure à 10^5 UFC de bactéries par gramme de tissu, est considérée comme suffisante pour provoquer une infection de l'UPD (Williams *et al.*, 2004). Cependant, la virulence des bactéries joue un rôle déterminant dans l'apparition et le développement de l'infection, même avec une charge bactérienne plus faible (Dunyach-Remy *et al.*, 2016). Par exemple, les streptocoques β -hémolytiques sécrètent des toxines qui favorisent une propagation rapide à travers les plans tissulaires de l'hôte. D'autre part, les souches toxigènes de *S. aureus* (portant des gènes codant pour les exfoliatines, EDIN, PVL ou TSST) sont souvent associées aux grades sévères d'infection, tandis que les souches non toxigènes de *S. aureus* sont principalement impliquées dans les infections des structures profondes, notamment les ostéomyélites (Dunyach-Remy *et al.*, 2016). Fait intéressant, certaines souches toxigènes présentant un fort potentiel pathogène peuvent être présentes sur des plaies non infectées sans manifester de virulence (Dunyach-Remy *et al.*, 2016).

5.3. Nature polymicrobienne des IPD et biofilm

Les infections légères sont souvent monomicrobiennes, tandis que les infections chroniques, en particulier chez les patients ayant récemment reçu une antibiothérapie, sont généralement polymicrobiennes. Elles incluent un mélange de bactéries à Gram positif et à Gram négatif, aérobies et anaérobies (Dowd *et al.*, 2008; Heravi *et al.*, 2019; Lipsky, Berendt, Deery, *et al.*, 2012; Spichler *et al.*, 2015).

La nature polymicrobienne de ces infections, associée à la production de divers facteurs de virulence tels que les protéases, les collagénases et les hémolysines, contribue à la chronicité de l'infection, rendant ainsi son traitement particulièrement difficile (Heravi *et al.*, 2019).

Cette diversité microbienne permet aux bactéries de s'organiser en biofilms, des structures complexes où elles se fixent de manière irréversible aux tissus de l'hôte (Dowd *et al.*, 2008). Dans ces biofilms, les bactéries se multiplient et prolifèrent, formant des microcolonies intégrées dans une matrice biopolymère extracellulaire, ce qui leur confère une stabilité structurelle et les rend particulièrement résistantes aux traitements (Bjarnsholt *et al.*, 2008 ; Dowd *et al.*, 2008b ; Uberoi *et al.*, 2020).

Les populations microbiennes dans un biofilm sont très diverses et forment des groupes pathogènes fonctionnellement équivalents (FEP). Selon ce concept, certaines espèces bactériennes ne sont pas capables de maintenir une infection chronique lorsqu'elles sont présentes seules. Cependant, lorsqu'elles se co-agglomèrent au sein d'un FEP, leur interaction synergique confère à la communauté des propriétés lui permettant de maintenir des infections chroniques liées au biofilm (Dowd *et al.*, 2008b).

La chronicité des plaies, ainsi que la résistance accrue aux traitements antibiotiques et à l'activité antimicrobienne du système immunitaire inné, sont attribuées à la capacité des bactéries à former des biofilms et à excréter des facteurs de virulence au sein de ces structures protectrices complexes (**Figure 5**) (Hurlow *et al.*, 2018 ; Uberoi *et al.*, 2020).

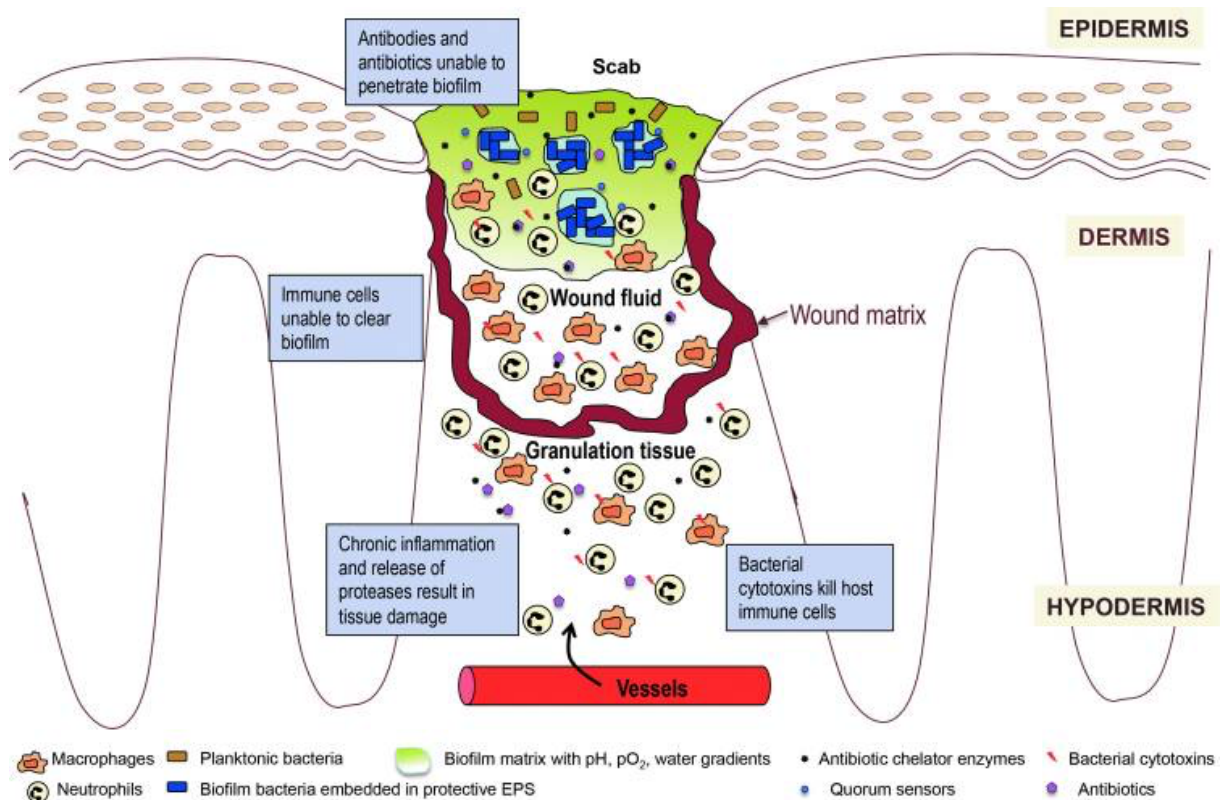


Figure 5: Facteurs influençant le retard de cicatrisation des plaies. La présence de biofilm et l'abondance de leucocytes entourant le biofilm empêchent la cicatrisation des plaies. De plus, l'équilibre des protéases produites par les cellules inflammatoires endo endommage également les tissus normaux et en cours de cicatrisation (Lavigne *et al.*, 2015).

La distribution des micro-organismes au sein d'un biofilm suit une organisation spécifique : les bactéries aérobies, telles que les corynébactéries, se localisent dans les couches superficielles de la plaie, où la concentration en oxygène est relativement élevée. En revanche, les bactéries anaérobies colonisent des niches hypoxiques plus profondes, créées par la consommation d'oxygène par les bactéries aérobies situées en surface (Lavigne *et al.*, 2015).

Un exemple représentatif de la distribution non aléatoire des biofilms multi-espèces est le biofilm composé de *P. aeruginosa* et de *S. aureus*, où *P. aeruginosa* se localise de manière significativement plus profonde dans le lit de la plaie que *S. aureus* (Figure 6) (Fazli *et al.*, 2009).

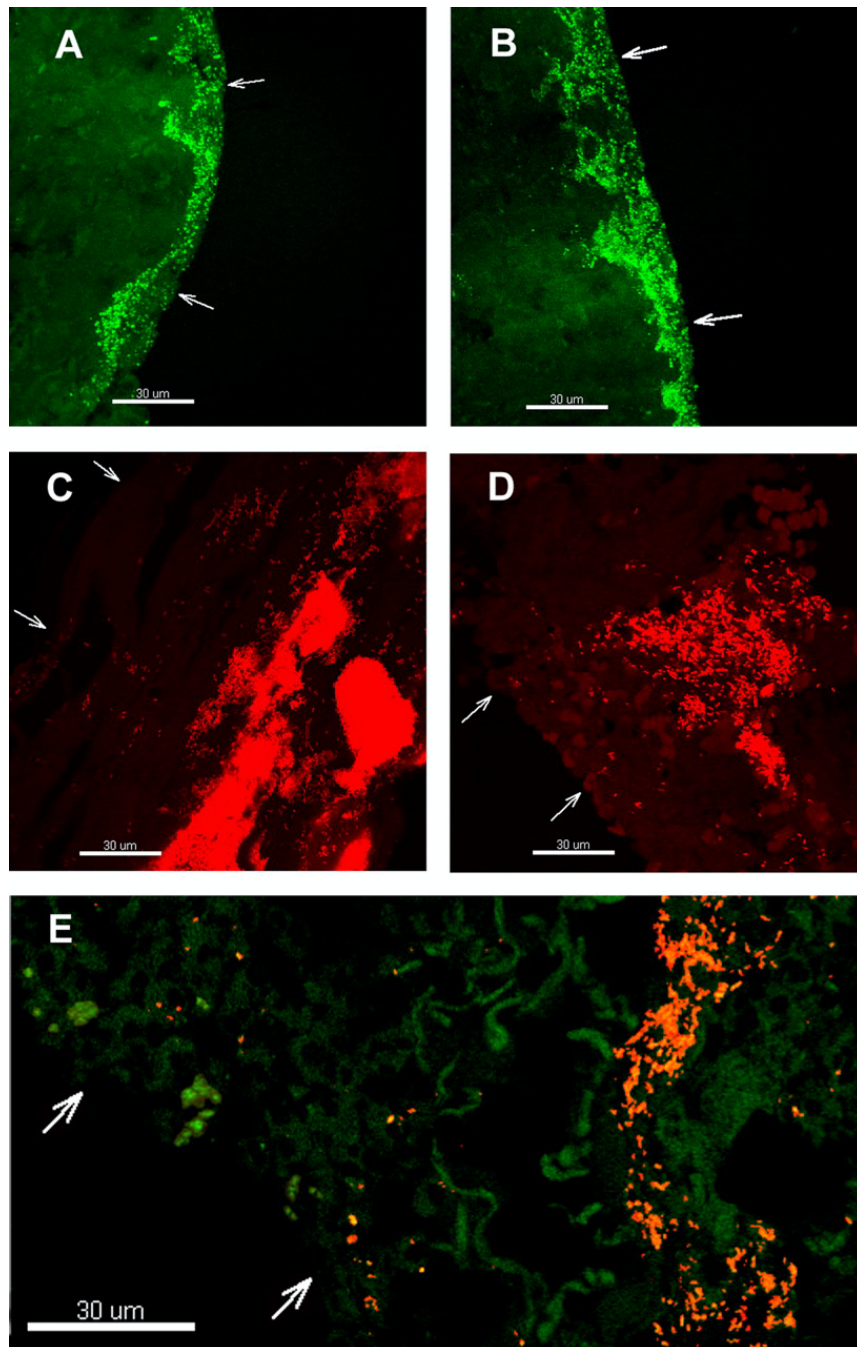


Figure 6: Images représentatives obtenues par microscopie confocale à balayage laser de *S. aureus* (A et B), *P. aeruginosa* (C et D) et des deux espèces combinées (E) dans des plaies chroniques. Les bactéries ont été détectées par la technique FISH avec des sondes spécifiques marquées pour *S. aureus* (vert) et *P. aeruginosa* (rouge) ou un mélange des deux sondes. Les flèches indiquent les surfaces des plaies (Fazli *et al.*, 2009).

Cette distribution pourrait être expliquée par la capacité de *P. aeruginosa* à migrer via les pili de type IV et sa motilité médiée par le flagelle au sein des biofilms. De surcroît, sa production de facteurs de virulence capables d'inhiber l'activité des systèmes de défense de l'hôte favorise la colonisation de ces bactéries dans les régions profondes des plaies chroniques (Fazli *et al.*, 2009).

De plus, *P. aeruginosa* peut s'adapter pour survivre dans l'environnement anaérobie des plaies profondes ou des ostéomyélites grâce à des mutations de certains gènes impliqués dans la résistance au stress anaérobie et membranaire, ainsi que dans certaines voies métaboliques (Morgan *et al.*, 2019).

5.4. Microbiote du pied diabétique

Les IPD peuvent être colonisées par une grande diversité d'organismes, tels que des bactéries aérobies et anaérobies (Ghotaslou *et al.*, 2018). Dans les pays occidentaux développés, les patients présentant des IPD bénignes de courte durée et n'ayant pas récemment reçu de traitement antibiotique semblent avoir un microbiote plus simple. Ces infections sont principalement causées par des cocci à Gram positif aérobies, en particulier *S. aureus* et, dans une moindre mesure, par des β -streptocoques (généralement du groupe B) ou des staphylocoques à coagulase négative (SCoN) (Heravi *et al.*, 2019 ; Lipsky *et al.*, 2012b ; Uçkay *et al.*, 2014).

Les infections modérées et sévères, en particulier chez les patients ayant été traités avec des antibiotiques, sont plus susceptibles d'être polymicrobiennes. Elles incluent des cocci à Gram positif aérobies, tels que *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* et *Enterococcus spp.*, ainsi qu'une grande variété de bacilles à Gram négatif, parmi lesquels figurent les *Enterobacterales* (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* et *Klebsiella spp.*) et des bacilles à Gram négatif non fermentatifs, notamment *Pseudomonas spp.* (Roberts et Simon, 2012 ; Uçkay *et al.*, 2014 ; Zanella *et al.*, 2016).

Dans les pays tropicaux/subtropicaux (principalement en Asie et en Afrique du Nord) moins développés, caractérisés par des climats chauds et humides, les bacilles à Gram négatif aérobies, notamment *P. aeruginosa*, figurent parmi les principales bactéries responsables des IPD (Bansal *et al.*, 2008 ; Ramakant *et al.*, 2011). *P. aeruginosa* est isolé des plaies, soit seul ou en association avec des cocci à Gram positif (Lipsky *et al.*, 2020). La prédominance de *P.*

aeruginosa dans ces régions pourrait être attribuée à plusieurs facteurs, notamment l'exposition fréquente à l'eau, les hospitalisations prolongées, l'utilisation de méthodes microbiologiques classiques favorisant son identification, ainsi qu'à des influences environnementales et hygiéniques, à l'utilisation antérieure d'antibiotiques et à la disponibilité d'antibiotiques sans prescription médicale (Lipsky *et al.*, 2020 ; Spichler *et al.*, 2015 ; Uçkay *et al.*, 2014).

Les plaies profondes chroniques et les gangrènes sont généralement associées à des bactéries anaérobies, notamment *Peptoniphilus* spp., *Anaerococcus* spp., *Finegoldia* spp., *Clostridioides* spp., *Fusobacterium* spp. et *Bacteroides* spp. (Roberts et Simon, 2012). Cependant, les anaérobies sont des pathogènes moins courants dans l'ostéomyélite diabétique, en particulier dans les échantillons osseux obtenus de manière fiable (Lipsky, 1997).

Les anaérobies sont souvent négligés et mal identifiés dans le diagnostic clinique de routine, car ils ne sont pas toujours associés à des signes cliniques spécifiques ou à des manifestations sévères. En revanche, les études sur les microbiotes des infections profondes, basées sur des techniques moléculaires telles que la PCR ciblant l'ADNr 16S et le pyroséquençage, révèlent une forte prévalence de ces bactéries (Ghotaslou *et al.*, 2018 ; Magnan *et al.*, 2022).

La culture des anaérobies reste un défi pour les laboratoires de microbiologie clinique, en raison des exigences spécifiques pour maintenir un environnement strictement anaérobie. De plus, les techniques moléculaires, bien que plus sensibles, présentent un coût élevé et nécessitent des ressources spécialisées (Spichler *et al.*, 2015). La détection efficace des anaérobies dépend fortement de méthodes rigoureuses de prélèvement (écouvillon de surface, aspiration à l'aiguille ou biopsie), ainsi que du transport et de l'analyse des échantillons dans des conditions appropriées (Roberts et Simon, 2012).

L'agent étiologique traditionnel de l'ostéomyélite est *S. aureus*, suivi d'autres cocci aérobies à Gram positif et de bacilles aérobies à Gram négatif, tels que les *Enterobacterales* et *Pseudomonas* spp., car cette infection résulte de la propagation contiguë à partir d'un foyer des tissus mous (Lipsky, 1997). Cependant, le microbiote osseux est plus complexe, et chaque plaie peut présenter un microbiote unique, dépendant de plusieurs facteurs environnementaux ainsi que de facteurs liés à l'hôte, notamment le statut immunitaire du patient, la durée de la plaie et l'influence de l'artériopathie (Magnan *et al.*, 2022). De plus, les défenses de l'hôte altérées ainsi que les tissus mous et osseux nécrosés peuvent permettre à des organismes colonisateurs de

faible virulence, tels que les SCoN ou les espèces de *Corynebacterium*, de devenir pathogènes (Lipsky *et al.*, 2012b)

Plusieurs facteurs sont associés à un risque élevé de portage d'organismes multirésistants, notamment les hospitalisations fréquentes, les traitements antibiotiques inappropriés et la maladie artérielle périphérique, qui limite la pénétration des antibiotiques dans les tissus infectés des membres inférieurs (Hartemann-Heurtier *et al.*, 2004).

Le diagnostic clinique des IPD se concentre principalement sur les bactéries, négligeant souvent les communautés fongiques (le mycobiome), malgré leur possible contribution aux infections (Kalan *et al.*, 2016). Les études sur le mycobiome dans les IPD restent limitées, principalement en raison de la difficulté à distinguer une colonisation fongique d'une infection avérée. Parmi les principaux facteurs de risque figurent l'hyperglycémie, l'utilisation d'antibiotiques à large spectre, la maladie vasculaire périphérique et la neuropathie (Saeed *et al.*, 2020).

Une étude récente utilisant le séquençage à haut débit a révélé que le mycobiome peut former des biofilms mixtes fongiques-bactériens, associés à de mauvais résultats, notamment à la nécrose, des inflammations systémiques et un retard de cicatrisation (Kalan *et al.*, 2016). Parmi les microorganismes fongiques identifiés dans les IPD, les champignons filamenteux de l'embranchement *Ascomycota*, tels que *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum* et *C. flabelliforme*, ainsi que des espèces de *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* et *C. smithsonii*), figurent parmi les plus abondants (Han *et al.*, 2020 ; Kalan *et al.*, 2016).

En revanche, les IPD d'origine virale, parasitaire ou mycobactérienne n'ont pas été rapportées que dans quelques rapports de cas (Uçkay *et al.*, 2014 ; Yang *et al.*, 2022 ; Zanella *et al.*, 2016).

La composition du microbiote des IPD varie en fonction de plusieurs facteurs, notamment la localisation géographique. En Europe et en Amérique du Nord, les cocci aérobies à Gram positif prédominent, tandis qu'en Asie et en Afrique, où les climats sont plus chauds, les bacilles à Gram négatif sont plus fréquemment observés (Bansal *et al.*, 2008 ; Dunyach-Remy *et al.*, 2016).

D'autres facteurs liés aux patients, tels que l'hygiène personnelle, le contrôle glycémique, les traitements antibiotiques et leur durée, la fréquence et la durée des hospitalisations, la gravité

et la durée de l'ulcère, influencent également la composition du microbiote (Jneid *et al.*, 2017 ; Saeed *et al.*, 2020).

5.5. Principales bactéries dominantes dans les IPD

5.5.1. Bactéries à Gram positif

a. *S. aureus*

S. aureus est l'espèce la plus couramment isolée des IPD, en particulier dans les pays occidentaux (Heravi *et al.*, 2019 ; Jneid *et al.*, 2018 ; Saeed *et al.*, 2020). *S. aureus* est à la fois une bactérie commensale des humains et cause un large éventail d'infections, allant de superficielles (infections cutanées et des tissus mous) aux infections graves et potentiellement mortelles (Dunyach-Remy *et al.*, 2016 ; Tong *et al.*, 2015 ; Wertheim *et al.*, 2005).

S. aureus produit un grand nombre de facteurs de virulences qui sont soit localisés sur la surface externes ou secrétés dans le milieu extra-cellulaire.

S. aureus est capable d'exprimer plusieurs protéines de surface appelés composants microbiens de surface reconnaissant les molécules de la matrice adhésive (MSCRAMM : microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules), telles que la protéine staphylococcique A (Spa), la protéine de liaison au collagène (Cna), la protéine de liaison à l'élastine (EbpS), Les protéines de liaison au fibrinogène (également appelées facteurs d'agglutination A et B (ClfA et ClfB) et les protéines de liaison à la fibronectine A (FnBPA et FnBPB) (Bowling *et al.*, 2009 ; Cunningham *et al.*, 1996).

Ces protéines jouent également un rôle central important dans l'établissement des biofilms (Rajab et Hegazy, 2023)., qui contribuent de manière déterminante au maintien et à l'aggravation des infections (Bowling *et al.*, 2009).

De plus, *S. aureus* est capable de produire une grande variété d'enzymes extracellulaires et des toxines qui permettent à la bactérie d'envahir et endommager différents tissus de l'hôte (Vandenesch *et al.*, 2012).

Ces facteurs comprennent des coagulases, staphylokinases, hyaluronidases, protéases, lipases et nucléases, les cytotoxines (les hémolysines et la leucocidine de Panton Valentine), des toxines exfoliatives et des toxines superantigéniques (la toxine du syndrome de choc toxique et

les entérotoxines) (Foster, 2005 ; Vandenesch *et al.*, 2012)(Spaulding *et al.*, 2013 ; Vu *et al.*, 2014).

⇒ *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM)

S. aureus résistant à la méthicilline (SARM) a été décrit pour la première fois en Angleterre en 1961, peu de temps après l'introduction de la méthicilline dans la pratique clinique. La résistance des SARM à la méthicilline est due à l'acquisition d'un gène *mecA*, qui code pour une protéine de liaison à la pénicilline supplémentaire appelée PBP2 (PBP2a). PBP2a présente une faible affinité avec la plupart des pénicillines semi-synthétiques, et confère une résistance à presque tous les β -lactamines antibiotiques, y compris la méthicilline, l'oxacilline et les céphalosporines (Hiramatsu *et al.*, 2001).

Le gène *mecA* est localisé sur un élément génétique mobile, appelé cassette chromosomique staphylococcique (SCC*mec*) (Hiramatsu *et al.*, 2001).

Les SARM se divisent en deux principales catégories: les SARM acquis à l'hôpital (SARM-AH) et les SARM acquis dans la communauté (SARM-AC) (Vestergaard *et al.*, 2019). Les souches de SARM-AH sont généralement multirésistantes et associées à des infections nosocomiales graves. En revanche, les SARM-AC sont principalement responsables des infections de la peau et des tissus mous, ainsi que de pneumonies nécrosantes (Büke, 2010 ; Vestergaard *et al.*, 2019).

Les SARM-AH sont généralement multirésistants et présentent une résistance à un grand nombre d'antibiotiques par rapport aux SARM-AC (Büke, 2010), notamment : les fluoroquinolones, les macrolides, les aminosides, les tétracyclines, la rifampicine, l'acide fusidique, ainsi que la teicoplanine, un glycopeptide. De plus, des sous-populations émergent avec une résistance à la vancomycine ou, au moins, une sensibilité intermédiaire (VISA: vancomycin-intermediate *S. aureus*), après exposition à la vancomycine (Büke, 2010).

b. Les staphylocoques à coagulase négative (SCoN)

Ce groupe se distingue de *S. aureus* par son incapacité à produire de la coagulase (Rogers *et al.*, 2009 ; Vuong et Otto, 2002). Les SCoN sont omniprésents et colonisent la peau humaine des adultes en bonne santé (Rogers *et al.*, 2009).

S. epidermidis est le SCoN le plus fréquemment isolé dans les IPD. Cependant d'autres espèces, telles que *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* et *S. simulans*, sont également impliquées dans ces infections de gravité variable, y compris des ostéomyélites (Edelson *et al.*, 1995 ; Natsis et Cohen, 2018).

c. *Streptococcus pyogenes*

Les streptocoques β -hémolytiques des groupes A, B, C et G sont des agents pathogènes fréquemment isolés des IPD (Ghotaslou *et al.*, 2018 ; Roberts et Simon, 2012 ; Uçkay *et al.*, 2014 ; Zanella *et al.*, 2016).

S. pyogenes (ou streptocoque du groupe A, appelé GAS) est l'espèce la plus fréquemment associée aux IPD, bien que d'autres espèces, telles que *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* et *S. anginosus*, soient également courante (Stappers *et al.*, 2015).

S. pyogenes est responsable d'infections invasives cutanées superficielles ainsi que de formes plus graves, telles que l'érysipèle, la cellulite, la fasciite nécrosante et les infections nécrosantes des tissus mous, pouvant aboutir à des septicémies (Siemens et Lütticken, 2021).

Les GAS expriment un large éventail de facteurs de virulence qui induisent des réponses immunitaires pathologiques, notamment les adhésines, qui confèrent à la bactérie la capacité de coloniser l'hôte humain et d'établir une infection initiale. Ces adhésines incluent l'acide lipoteichoïque, des protéines ancrées à la surface (telles que la protéine M), des protéines de liaison à la fibronectine, la protéine de liaison au collagène Cpa, la protéine de liaison à la vitronectine et les protéines de liaison au plasminogène bactérien (Teraon, 2012).

Les GAS sécrètent également divers facteurs qui facilitent leur dissémination à travers les tissus et leur évasion du système immunitaire de l'hôte. Ces facteurs incluent des toxines cytolytiques formant des pores, des protéases, des DNases, des exotoxines superantigènes, les streptolysines S et O (SLS et SLO), ainsi que diverses exotoxines bactérienne (Roberts et Simon, 2012).

d. *Enterococcus* spp.

Les entérocoques, bactéries commensales du tractus gastro-intestinal, sont impliqués dans diverses infections, notamment les infections des voies urinaires, la bactériémie, l'endocardite et les IPD. Dans le contexte des IPD, ces bactéries sont fréquemment associées à des infections polymicrobiennes, souvent caractérisées par des taux élevés d'amputation et des durées prolongées d'hospitalisation (Perzon *et al.*, 2023 ; Rajha *et al.*, 2024).

E. faecalis et *E. faecium* sont les principales espèces impliquées dans les infections cliniques, souvent associées à une résistance accrue aux antibiotiques (Fisher et Phillips, 2009).

Les entérocoques possèdent une gamme de facteurs de virulence qui contribuent à leur pathogénicité. L'adhésion des entérocoques aux surfaces eucaryotes repose sur plusieurs protéines spécifiques. La protéine de surface extracellulaire (Esp) joue un rôle central dans l'adhésion, la colonisation et l'évasion du système immunitaire de l'hôte (Rajha *et al.*, 2024).

Par ailleurs, l'évasion des défenses immunitaires de l'hôte est assurée par divers mécanismes. L'anticorps (LTA) participe à l'adhérence et module la réponse immunitaire. La capsule d'*E. faecalis* inhibe la phagocytose, tandis que la métalloprotéase GelE clive la protéine C3 du complément, réduisant ainsi l'efficacité des mécanismes phagocytaires. En outre, la substance d'agrégation (Agg) confère à *E. faecalis* une capacité de survie intracellulaire au sein des phagosomes et une résistance au burst oxydatif des macrophages (Fiore *et al.*, 2019).

Outre ces mécanismes d'évasion, les entérocoques provoquent des dommages tissulaires via la sécrétion de toxines et d'enzymes. La cytolysine, par exemple, exerce une activité hémolytique sur les cellules humaines, entraînant leur lyse. Deux protéases majeures, une métalloprotéase au zinc (gélatinase) et une sérine protéase, participent également à la gravité des infections. Par ailleurs, les entérocoques produisent des métabolites oxygénés toxiques, tels que le peroxyde d'hydrogène, qui peuvent causer des dommages cellulaires et organiques (Fiore *et al.*, 2019).

5.5.2. Bactéries à Gram négatif**a. *P. aeruginosa***

P. aeruginosa est une espèce pathogène opportuniste qui envahit facilement les hôtes immunodéprimés. Elle est responsable d'infections nosocomiales fréquentes, telles que la pneumonie, les infections urinaires, la bactériémie et les IPD (Hatipoglu *et al.*, 2014 ; L. Bowling *et al.*, 2012 ; Rajab et Hegazy, 2023).

P. aeruginosa dispose d'un arsenal varié de facteurs de virulence, incluant le lipopolysaccharide, plusieurs enzymes telles que l'exotoxine et l'exoenzyme, ainsi que des exoprotéases, l'élastase, des sidérophores, des polysaccharides associés à la surface, l'alginate et des adhésines associées aux pili responsables de la liaison aux récepteurs spécifiques des cellules épithéliales (Bjarnsholt *et al.*, 2008).

La capacité de *P. aeruginosa* à provoquer l'infection repose principalement sur son aptitude à former des biofilms constitués de substances exopolymériques (polysaccharides, alginate, ADN extracellulaire, protéines et lipides). Dans une plaie chronique, *P. aeruginosa* forme de grandes microcolonies au sein de ce biofilm et sécrète des facteurs de virulence délétères, notamment le rhamnolipide, dont la production est régulée par le quorum sensing (Bjarnsholt *et al.*, 2008).

b. *Enterobacteriaceae* et genres associés

Les entérobactéries constituent une famille hétérogène de bactéries à Gram négatif qui font partie intégrante de la flore gastro-intestinale normale. Parmi les genres principaux impliqués dans les IPD, on retrouve *Escherichia*, *Proteus* (famille des *Morganellaceae*) et *Klebsiella* (L. Bowling *et al.*, 2012).

Ces bactéries partagent plusieurs facteurs de virulence, notamment les lipopolysaccharides, qui participent aux dommages membranaires, les fimbriae jouant un rôle d'adhésines, et les flagelles, qui leur permettent de se déplacer (L. Bowling *et al.*, 2012).

i. *E. coli*

E. coli est une bactérie intestinale opportuniste associée à une variété de maladies en plus des infections intestinales, telles que les infections urinaires, la méningite néonatale, la septicémie, ainsi que les infections de la peau et des tissus mous (Petkovšek *et al.*, 2009 ; Ranjan *et al.*, 2017)

E. coli est l'entérobactérie la plus fréquemment isolée dans les infections cutanées et des tissus mous, y compris les IPD (Jain et Barman, 2017 ; Macdonald *et al.*, 2021 ; Miyan *et al.*, 2017 ; Petkovšek *et al.*, 2009)

Les souches d'*E. coli* se divisent en trois groupes : les souches pathogènes extra-intestinales (ExPEC), les pathogènes intestinaux (IPEC) et les souches commensales normales. Les souches impliquées dans les IPD et les ostéomyélites appartiennent aux ExPEC (Dobrindt, 2005 ; Lienard *et al.*, 2021).

Les souches d'ExPEC diffèrent de manière significative des autres groupes et possèdent un large éventail de facteurs de virulence, tels que des toxines, des sidérophores, des adhésines, des lipopolysaccharides, des capsules polysaccharidiques, des protéases et des invasines. Ces facteurs sont localisés dans des îlots de pathogénicité, responsables des infections (Dobrindt, 2005 ; Petkovšek *et al.*, 2009).

ii. *P. mirabilis*

Proteus est un genre pathogène opportuniste impliqué dans des infections, principalement chez les individus immunodéprimés. Il est majoritairement responsable d'infections urinaires compliquées, d'infections de plaies et d'infections nosocomiales, avec *P. mirabilis* représentant la principale espèce pathogène parmi les infections à *Proteus* (Drzewiecka, 2016).

Parmi les bactéries à Gram négatif associées aux IPD et à l'ostéomyélite, *P. mirabilis* occupe une place importante (Maity *et al.*, 2024 ; Senneville et Robineau, 2021 ; Zou *et al.*, 2020). Ces infections sont souvent liées à un mauvais pronostic, notamment un risque accru d'amputation chez les patients atteints d'ostéomyélite du pied diabétique (Zou *et al.*, 2020).

P. mirabilis exprime de nombreux facteurs de virulence, notamment des protéines d'adhésion, des molécules de quorum sensing, des lipopolysaccharides, des pompes d'efflux et l'enzyme uréase, essentielle à sa pathogénicité (Wasfi *et al.*, 2020)

L'adhésion est facilitée par un large éventail de fimbriae et d'adhésines. Ces structures jouent également un rôle clé dans la formation de biofilms dans les UPD, connus pour leur persistance et leur résistance aux traitements. En outre, *P. mirabilis* produit une variété de toxines, notamment des protéases, une hémolysine et l'uréase, qui contribuent aux lésions tissulaires chez l'hôte (Armbruster *et al.*, 2018 ; L. Bowling *et al.*, 2012).

6. Techniques d'analyse de la composition du microbiote des UPD/IPD

6.1. Prélèvement

Avant le prélèvement, la plaie doit être débridée des tissus nécrotiques et nettoyée à l'aide de substances non antimicrobiennes. Quatre méthodes couramment utilisées pour obtenir des échantillons du pied diabétique sont : l'écouvillonnage, l'aspiration à l'aiguille, le curetage et la biopsie de la plaie.

Les échantillons de tissus profonds prélevés par aspiration à l'aiguille ou par biopsie sont les plus fiables pour l'analyse des ulcères du pied diabétique par rapport aux techniques par écouvillonnage, car elles permettent d'isoler les pathogènes probables tout en limitant la contamination par les microflore commensales de la peau saine (Armstrong et Lipsky, 2004 ; Ghotaslou *et al.*, 2018 ; Heravi *et al.*, 2019 ; Spichler *et al.*, 2015)

Il est également essentiel de garantir des conditions de transport optimales des échantillons, notamment en ce qui concerne le milieu de transport, la température, la stérilité des récipients et la rapidité de l'acheminement (Jneid *et al.*, 2017 ; Spichler *et al.*, 2015).

6.2. Techniques basées sur la culture**6.2.1. Culture conventionnel**

Les techniques de culture conventionnelles reposent sur la capacité de cultiver les microorganismes *in vitro* en utilisant des milieux adaptés en fonction du but recherché, ainsi que des conditions d'incubation appropriées, telles que la température et l'atmosphère (Hashsham, 1981 ; Murray, 2014).

L'identification des microorganismes commence par l'examen de leur morphologie et de leurs caractéristiques microscopiques, telles que la taille, la couleur et la forme des colonies, ainsi que la présence ou l'absence d'une activité hémolytique. De plus, l'observation microscopique après une coloration permet d'identifier des caractéristiques essentielles, telles que la forme des bactéries (coques, bacilles, formes spiralées), le regroupement des cellules (isolées, en amas, en chaînettes) et le type de Gram (Gram positif ou négatif) (Fournier *et al.*, 2013 ; Murray, 2014).

Une fois des colonies pures obtenues, une série de tests biochimiques est réalisée pour identifier l'espèce bactérienne, suivie d'un test de sensibilité aux agents antimicrobiens (Madigan, M., & Martinko, 2007).

Bien que les méthodes microbiologiques standard soient largement employées dans les laboratoires de diagnostic et de recherche, elles présentent plusieurs biais. Ces techniques, caractérisées par une longue durée d'analyse et un manque de sensibilité pour les anaérobies et les microorganismes exigeants, privilégient l'identification des bactéries facilement cultivables dans des conditions de laboratoire (Spichler *et al.*, 2015).

6.2.2. Culturomique

La culturomique repose sur la diversification des conditions de culture pour favoriser la croissance de la majorité des bactéries présentes, y inclut celles exigeantes ou anaérobies stricts auparavant non cultivées.

Après la culture les bactéries sont rapidement identifiées par Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), ou par l’amplification et le séquençage du gène de l’ARN ribosomal 16S (**Figure 7**) (Lagier *et al.*, 2015).

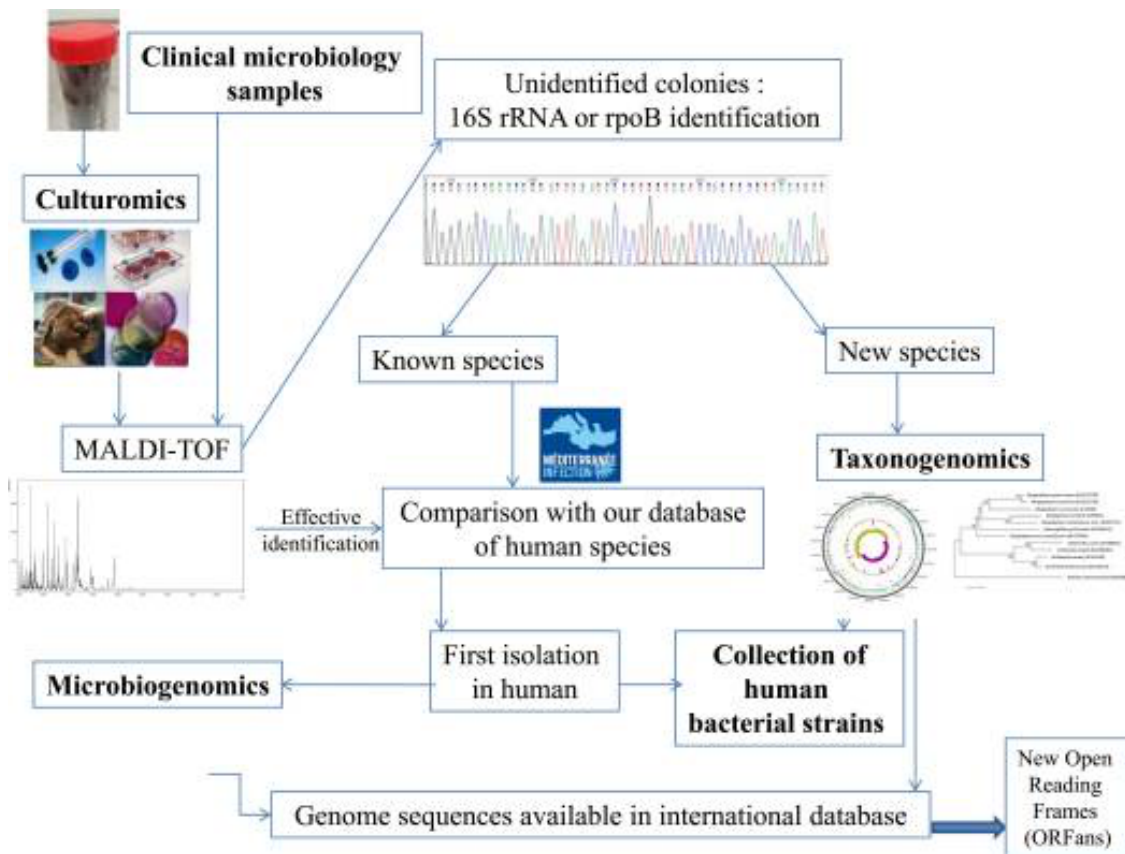


Figure 7:Vue d'ensemble des étapes de la culturomique, de l'échantillon clinique aux applications génomiques (Lagier *et al.*, 2015).

6.3. Techniques moléculaires**6.3.1. Séquençage du gène de l'ARNr 16S**

La séquence du gène de ARNr 16S est hautement conservé chez les bactéries. Cependant, les variations dans les régions hypervariables (V1–V9) peuvent être exploitées pour distinguer les taxons bactériens.

Cette approche repose sur l'utilisation d'amorces universelles complémentaires à des régions hautement conservées de ce gène, permettant ainsi une amplification par PCR d'une ou plusieurs des régions (Lavigne *et al.*, 2015), suivie par séquençage des amplicons. Le séquençage permet ainsi d'évaluer la composition taxonomique et l'abondance des communautés bactériennes (Uberoi *et al.*, 2020), les taxons sont ensuite regroupés en unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) (Ranjan *et al.*, 2016).

6.3.2. Métagénomique

La métagénomique repose sur le séquençage de l'ensemble des génomes des microorganismes présents dans un échantillon. Cette technique permet une caractérisation exhaustive des bactéries, archées, champignons et virus présents, constituant ainsi le microbiome. Les études basées sur cette approche suggèrent que les bactéries cultivables ne représentent qu'une infime fraction (<1 %) de la diversité bactérienne totale (Spichler *et al.*, 2015).

La métagénomique permet également d'analyser les processus biologiques du microbiome, notamment les facteurs de virulence et les mécanismes de résistance aux antibiotiques (Heravi *et al.*, 2019 ; Morsli *et al.*, 2024 ; Uberoi *et al.*, 2020).

L'identification des voies métaboliques repose sur l'annotation fonctionnelle des gènes, qui consiste à relier les séquences génomiques à leurs fonctions biologiques afin de reconstruire des voies et réseaux métaboliques. Cette analyse s'appuie sur des outils bioinformatiques et des bases de données permettant l'alignement des reads et l'attribution des fonctions. Les fonctions identifiées sont ensuite regroupées en sous-systèmes représentant des processus biologiques plus larges (Huson *et al.*, 2007 ; Huson, 2013 ; Mitra *et al.*, 2011 ; Větrovský *et al.*, 2018).

7. Prise en charge du pied diabétique**7.1. Hospitalisation**

L'hospitalisation est recommandée pour les patients présentant des IPD sévères ou compliquées par une ischémie critique. En revanche, les patients atteints d'infections légères ou modérées ne nécessitent généralement pas d'hospitalisation et peuvent être évalués et traités en ambulatoire. Toutefois, l'hospitalisation peut être envisagée par les cliniciens dans le but d'assurer une observation, de réaliser des tests diagnostiques urgents ou de gérer des facteurs compliquant la prise en charge des plaies ou l'observance au traitement antibiotique (Lipsky *et al.*, 2012b).

Un objectif essentiel de l'hospitalisation est la prise en charge de l'état métabolique du patient, notamment la restauration des équilibres hydrique et électrolytique, la correction de l'hyperglycémie, de l'hyperosmolalité, de l'acidose et de l'azotémie, ainsi que le traitement d'autres troubles aggravants (Lipsky *et al.*, 2012b).

7.2. Chirurgie

L'objectif de la chirurgie est d'éradiquer l'infection, de sauver les membres inférieurs et de préserver leur fonction. Ainsi, une intervention chirurgicale d'exploration peut être réalisée pour déterminer l'étendue de l'infection et permettre des cultures profondes des tissus afin d'adapter l'antibiothérapie ciblée (Saeed *et al.*, 2020).

Il est recommandé d'améliorer l'apport vasculaire chez les patients présentant une insuffisance artérielle pouvant entraîner une ischémie critique. Ces patients doivent bénéficier d'une revascularisation, réalisée par des méthodes endovasculaires ou ouvertes (Uçkay *et al.*, 2014).

Les infections compliquées qui s'étendent aux tissus mous profonds ou aux structures osseuses et qui ne répondent pas à l'antibiothérapie nécessitent des interventions chirurgicales. Les infections des tissus mous requièrent un drainage, une incision des tissus infectés et nécrotiques, ainsi qu'un débridement des plaies. Dans les cas d'ostéomyélite, une résection osseuse peut être nécessaire, tout comme une revascularisation tissulaire ou une amputation (Armstrong et Lipsky, 2004 ; Saeed *et al.*, 2020).

Les infections nécessitant une intervention chirurgicale sont généralement associées à des signes d'infection profonde, notamment un retard de cicatrisation, un écoulement purulent, un gonflement, un abcès, une douleur, un sinus profond, une propagation rapide de l'infection, la présence de gaz tissulaire et des signes de toxicité systémique tels que la fièvre et des anomalies métaboliques sévères (Armstrong et Lipsky, 2004 ; Uçkay *et al.*, 2014).

Des interventions chirurgicales d'urgence sont requises dans des situations spécifiques, telles que la gangrène gazeuse, la fasciite nécrosante, le syndrome des loges ou une septicémie systémique, qui menacent non seulement les membres inférieurs, mais aussi la vie du patient. Ces conditions justifient une prise en charge chirurgicale immédiate. Les procédures peuvent varier d'un simple débridement ou drainage à des résections étendues, une revascularisation ou une amputation majeure (Lipsky *et al.*, 2016 ; Saeed *et al.*, 2020).

D'autres interventions chirurgicales plus simples, telles que la correction des déformations du pied, l'arthrodèse, la ténotomie des fléchisseurs ou une combinaison de correction et de débridement pour infection, peuvent contribuer à la prévention des IPD et à l'amélioration de la guérison des ulcères.

Des soins podologiques sont également recommandés pour débrider les callosités et les tissus nécrotiques, soigner les ongles et sélectionner des chaussures appropriées, ce qui peut améliorer la prise en charge globale des patients (Uçkay *et al.*, 2014).

7.3. Antibiothérapie

Un traitement antibiotique n'est généralement pas requis pour les plaies non infectées. Cependant, en cas de signes cliniques d'infection, un traitement antibiotique est nécessaire. Il doit cibler les pathogènes les plus fréquemment identifiés et être instauré rapidement (Armstrong et Lipsky, 2004).

Le traitement initial est généralement empirique et vise à couvrir les pathogènes probables. Cependant, il peut être ajusté en fonction des résultats de culture, de la sensibilité locale aux antibiotiques et de la réponse clinique du patient, tout en prenant en compte d'autres facteurs tels que les allergies médicamenteuses, les hospitalisations récentes, les comorbidités, ainsi que les effets indésirables ou interactions médicamenteuses (Armstrong et Lipsky, 2004 ; Lipsky *et al.*, 2020 ; Pitocco *et al.*, 2019).

Les IPD légères à modérées n'ayant pas reçu d'antibiothérapie préalable sont généralement traitées en ambulatoire par une antibiothérapie orale à spectre plus étroit. En revanche, les infections sévères nécessitent initialement une antibiothérapie parentérale à large spectre, dont l'efficacité clinique contre les IPD a été démontrée, afin d'atteindre des concentrations sériques élevées (Armstrong et Lipsky, 2004).

De plus, l'antibiothérapie devrait inclure un agent actif contre les SARM chez les patients à haut risque (par exemple, ceux ayant des antécédents d'infections à SARM ou des hospitalisations fréquentes). Un passage à une thérapie orale est recommandé dès que le patient présente des signes d'amélioration clinique (Lipsky *et al.*, 2020 ; Pitocco *et al.*, 2019).

Dans les climats tempérés, l'antibiothérapie empirique doit cibler les bactéries pathogènes à Gram positif aérobies (streptocoques β -hémolytiques et *S. aureus*) en cas d'IPD légère chez les patients n'ayant pas récemment reçu d'antibiotiques. En revanche, dans les climats tropicaux ou subtropicaux, ainsi que chez les patients ayant récemment reçu un traitement antibiotique, présentant une IPD associée à une ischémie, ou une infection modérée à sévère, l'antibiothérapie empirique doit couvrir les bactéries à Gram positif, les bactéries à Gram négatif couramment isolés, ainsi que les anaérobies obligatoires.

Pour les IPD modérées à sévères dans ces régions, un traitement empirique ciblant *P. aeruginosa* doit également être envisagé, en utilisant un antibiotique supplémentaire ou à large spectre (Lipsky *et al.*, 2020).

En cas d'ischémie, de présence d'abcès ou d'écoulement malodorant, un traitement empirique ciblant les anaérobies obligatoires est requis (Lipsky *et al.*, 2020).

Les recommandations de l'IWGDF concernant les facteurs à prendre en compte lors de la sélection d'un régime antibiotique empirique pour les IPD sont illustrées dans **le tableau 6**.

Tableau 6: Facteurs à prendre en compte lors de la sélection d'un régime antibiotique empirique pour les IPD (Lipsky *et al.*, 2020)

Gravité de l'infection	Facteurs supplémentaires	Pathogènes habituels	Régimes potentiels
Légère	Aucun facteur	CGP	PSSR ; Céph
	Allergie ou intolérance aux β -lactamines	CGP	Clindamycine; FQ; T/S; macrolide; doxy
	Exposition récente aux antibiotiques	CGP + BGN	β -L-ase-1; FQ; T/S
	Risque élevé de SARM	SARM	Linezolide ; T/S ; doxy ; macrolide
Modérée ou sévère	Aucun facteur	CGP \pm BGN	β -L-ase-1; Céph 2e/3e gén
	Antibiothérapie récente	CGP \pm BGN	β -L-ase-2; Céph 3e gén; Carbapénème de groupe 1
	Ulcère macéré ou climat chaud	BGN, y compris <i>Pseudomonas</i> .	β -L-ase-2; PSSR + ceftazidime ; PSSR+ Cipro; Carbapénème de groupe 2
	Membre ischémique/nécrose/Formation de gaz	CGP \pm BGN \pm Anaérobies	β -L-ase-1 ou β -L-ase-2; Carbapénème de groupe 1 ou 2, Céph 2e/3e gén + clindamycine ou métronidazole
	Facteurs de risque de SARM	SARM	Envisager d'ajouter ou de substituer par des glycopeptides ; linezolide ; daptomycine ; acide fusidique ; T/S (\pm rifampicine) ; doxy
	Facteurs de risque de Bacille à Gram négatif résistants	BLSE	Carbapénèmes ; FQ ; aminosides et colistine

CGP : Cocci à Gram positif ; BGN : Bacilles à Gram négatif ; SARM : *S. aureus* résistant à la méthicilline ; BLSE : Micro-organisme producteur de bêta-lactamases à spectre étendu ; PSSR : Pénicilline semi-synthétique résistante à la pénicillinase ; Céph : Céphalosporine ; FQ : Fluoroquinolone ; T/S : Triméthoprim/Sulfaméthoxazole ; Doxy : Doxycycline ; β -L-ase : β -lactame, inhibiteur de β -lactamase ; β -L-ase 1 : Amoxicilline/clavulanate, ampicilline/sulbactam ; β -L-ase 2 : Ticarcilline/clavulanate, pipéracilline/tazobactam ; 2e, 3e gén : 2ème, 3ème génération ; Cipro : Ciprofloxacine

La sélection du traitement antibiotique définitif et la durée du traitements sont basées sur les résultats des cultures, les tests de sensibilité aux antibiotiques, les examens d'imagerie ou d'autres investigations, ainsi que sur la réponse clinique initiale, tout en tenant compte des effets indésirables liés à l'antibiothérapie (Lipsky *et al.*, 2012b).

Lorsque les résultats révèlent la nature polymicrobienne des IPD, l'antibiothérapie doit cibler les agents pathogènes virulents, tels que *S. aureus* ou les streptocoques β -hémolytiques. Les autres micro-organismes sont généralement considérés comme des contaminants ou des colonisateurs (Lipsky *et al.*, 2020).

La durée de l'antibiothérapie est déterminée en fonction de la gravité de l'infection, de la présence d'ostéomyélite et de l'ampleur de l'intervention chirurgicale (Saeed *et al.*, 2020). Elle doit être limitée pour réduire les effets indésirables liés à l'administration des antibiotiques et préserver le microbiome de l'hôte. Les infections légères des tissus mous sont traitées pendant 1 à 2 semaines, tandis qu'une antibiothérapie de 2 à 3 semaines peut être appropriée pour certaines infections étendues ou lorsque l'ischémie limite la distribution des antibiotiques. En cas d'ostéomyélite, un traitement de 4 à 6 semaines est recommandé (Lipsky *et al.*, 2020 ; Saeed *et al.*, 2020)

L'utilisation d'antibiotiques topiques et d'antiseptiques ayant des effets antibactériens ou antibiofilms, tels que l'éponge collagène-gentamicine et le pexiganan (un peptide antimicrobien), peut être efficace comme traitement complémentaire aux antibiotiques systémiques (Lavigne *et al.*, 2015 ; Lipsky *et al.*, 2020).

7.4. Thérapies adjuvantes

Les thérapies adjuvantes comprennent l'utilisation de billes imprégnées d'antibiotiques et l'application de la thérapie par pression négative, qui favorisent le drainage et réduisent l'œdème. L'oxygénothérapie hyperbare adjuvante a également démontré un effet bénéfique sur la cicatrisation des plaies infectées chez les patients diabétiques (Lavigne *et al.*, 2015 ; Lipsky *et al.*, 2012b).

D'autres approches incluent l'utilisation de facteurs de croissance recombinants, de substituts cutanés, de la thérapie par larves stériles (asticots) et des facteurs de stimulation des colonies de granulocytes, et la thérapie par des phages anti-*Staphylococcus* contre différentes souches, en association avec un traitement antibiotique, pour augmenter l'efficacité du traitement du SARM (Heravi *et al.*, 2019 ; Lavigne *et al.*, 2015 ; Lipsky *et al.*, 2012b ; Pitocco *et al.*, 2019). Ces interventions, bien qu'encourageantes, nécessitent encore des études supplémentaires pour établir des recommandations cliniques précises (Lavigne *et al.*, 2015).

Matériel et méthodes

1. Lieu et période de l'étude

Cette étude transversale, dont l'objectif était l'analyse de la composition du microbiote dans les IPD chez des patients hospitalisés à l'Hôpital Militaire Régional Universitaire de Constantine et au Centre Hospitalier Universitaire Dr Ben Badis de Constantine, a été réalisée durant la période allant d'Octobre 2019 à février 2020.

2. Population d'étude

2.1. Critères d'inclusion

Ont été inclus dans cette étude :

- Les patients hospitalisés, âgés de plus de 18 ans, et souffrant d'une IPD classée de PEDIS 2 à PEDIS 4 au niveau d'un seul pied, ont été inclus dans cette étude.

2.2. Critères d'exclusion

Ont été exclus de l'étude :

- Les patients n'ayant pas donné leur consentement pour participer à l'étude.
- Les patients non diabétiques ou présentant d'autres lésions podologiques.
- Les patients non hospitalisés.
- Les patients présentant une IPD classée PEDIS 1.
- Les patients ayant subi une intervention chirurgicale, y compris une amputation.

3. Classification des IPD

La gravité des infections a été déterminée par des cliniciens à l'aide du système de classification IDSA-IWGDF (Lipsky *et al.*, 2012a), les patients ont été répartis en conséquence (PEDIS 2— infection légère, PEDIS 3—infection modérée et PEDIS—4 infection grave).

4. Prélèvements

Les prélèvements ont été réalisés en double à partir de chaque site, à l'aide de 2 écouvillons stériles et transporté au laboratoire. L'un des écouvillons a été utilisé pour l'isolement des souches bactériennes, tandis que le second a été réservé au séquençage metagénomique shotgun.

4.1. Prélèvements à partir des IPD

Après débridement et nettoyage au sérum physiologique stérile, les prélèvements ont été obtenus par écouvillonnage profond de la plaie.

4.2. Prélèvements à partir de la PSPC

Après un nettoyage au sérum physiologique stérile, les prélèvements de la PSPC ont été obtenus, par écouvillonnage d'une zone mesurant 50 cm².

5. Isolement des souches de *Staphylococcus/Mammaliicoccus* spp.

Les souches de *Staphylococcus/Mammaliicoccus* spp. ont été isolées sur gélose Chapman et incubées à 37°C pendant 24 heures. Ce milieu contient une forte teneur en NaCl (7.5%), ce qui favorise la croissance des espèces appartenant à ces genres.

De plus, 14 souches isolées de 12 patients hospitalisés pour une IPD, dans le cadre des activités de routine du laboratoire de bactériologie, ont été incluses dans notre étude. Parmi ces patients, deux présentaient deux ulcères sur le même pied.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les souches ont été purifiées par des repiquages successifs sur le même milieu de culture, dans le but d'obtenir des souches pures qui seraient conservées et soumises au séquençage du génome entier. Les souches ont été conservées dans le glycérol à -20°C dans des cryotubes.

6. Extraction de l'ADN génomique**6.1. Extraction de l'ADN génomique à partir des souches de *Staphylococcus/Mammaliicoccus* spp.****6.1.1. Prétraitement à l'achromopeptidase**

Avant l'extraction de l'ADN génomique, un prétraitement avec une enzyme lytiques a été effectué. Après Centrifugation rapide à 13000 rpm, le surnageant a été jeté et le culot a été vortexé jusqu'à homogénéisation. 400 µL d'achromopeptidase (1mg/ml) (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) et 400 µL de tampon Tris-EDTA (pH 7,5) ont été ajoutés, vortexés et incubés à 37°C pendant 1h. Ensuite, 50 µL de dodécylsulfate de sodium (10%) ont été ajoutés, et la suspension a été mélangée et incubée à 65°C pendant 1 h jusqu'à ce qu'elle devienne claire.

6.1.2. Lyse cellulaire et purification de l'ADN génomique

La lyse cellulaire a été effectuée dans des tubes ZR Bashing Bead lysis tubes (Zymo Research, Irvine, CA, United States) à l'aide de Geno Grinder pendant 10 min à 1500 rpm, en suivant le protocole du fabricant (adapté par le Centre de Génomique des Pathogènes, NIID, Tokyo-Japon). 3 volumes (60 µL) de tampon ADB (Agarose Dissolving Buffer) ont été ajoutés à 20 µL du lysat de chaque souche, transférés précédemment dans les 96 puits de la plaque de collection et centrifugés à 5000 rpm pendant 5 min.

Le contenu des puits a été transféré dans les puits de la plaque Zymo-Spin™ I-96, placée sur la plaque de collecte, et centrifugé à 5000 rpm pendant 5 min jusqu'à ce que les mélanges d'échantillons soient complètement filtrés. Le filtrat a été jeté dans la plaque de collecte.

300 µl de DNA Wash Buffer ont été ajoutés dans chaque puits de la plaque Zymo-Spin™ I-96 et une centrifuger à 5000 rpm pendant 5 min a été effectuée. Cette étape a été répétée en centrifugeant pendant 15 min. 50 µl de DNA Elution Buffer ont été ajoutés à chaque puits, la plaque Zymo-Spin™ I-96 a été transférée ensuite sur une plaque d'élution et incubée à 65°C pour éluer l'ADN.

L'ADN a été quantifié à l'aide de Qubit Flex Fluorometer (ThermoFisher) dont la concentration doit être comprise entre 20-50 ng/ μ l pour un volume d'ADN pure de 17,5 μ l. Pour les solutions d'ADN génomique à concentration élevée, des dilutions avec l'eau exempte de nucléase ont été faites pour atteindre la concentration de 20-50 ng/ μ l.

17,5 μ l d'ADN pure ont été directement prélevés des solutions d'ADN génomique pour les solutions à concentration faible.

6.2. Extraction de l'ADN génomique à partir des prélèvements des IPD et de la PSPC

La lyse cellulaire a été effectuée dans des tubes ZR Bashing Bead lysis tubes (Zymo Research, Irvine, CA, United States) à l'aide de Geno Grinder pendant 10 min à 1500 rpm. L'ADN génomique a été extrait à l'aide du kit Qiagen DNA purification kit (Qiagen, Germany).

L'application du protocole a été faite selon les instructions du fabricant. 50 μ l du lysat ont été ajoutés à 250 μ l de tampon BP "Binding Buffer", mélangés par Vortex puis transféré dans une colonne QIAquick spin column placée dans un tube collecteur et centrifugé 1 min à 13000 rpm. 750 μ l du tampon de lavage PE (Wash Buffer) ont été ajoutés. Après Centrifugation à 13000 rpm pendant 1 min, la colonne QIAquick contenant l'ADN génomique a été placée dans un nouveau tube collecteur.

Une étape d'élution a été effectuée, 50 μ l de tampon EB "Elution Buffer" (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) ont été ajoutés au centre de la membrane QIAquick. L'ADN a été ensuite quantifié à l'aide de Qubit Flex Fluorometer (ThermoFisher).

Pour les échantillons de la PSPC, la concentration d'ADN était trop faible, pour cela nous avons ajouté 300 μ l du lysat à 1500 μ l de tampon PB. Pour l'étape d'élution 30 μ l de tampon EB ont été ajoutés. Ensuite la concentration d'ADN a été ajustée pour tous les échantillons à 20-50 ng/ μ l pour un volume final de 17.5 μ l.

7. Next Generation Sequencing**7.1. Préparation des bibliothèques de séquençage**

Le Next Generation Sequencing (NGS) nécessite la préparation de fragments d'ADN génomique de taille homogène, auxquels sont fixées à leurs extrémités de courtes séquences appelées adaptateurs indexés, avant les réactions de séquençage.

Pour cela nous avons suivi le même protocole pour la préparation des bibliothèques de séquençage des souches bactériennes et le séquençage métagénomique des prélèvements de des IPD et de la PSPC.

Les bibliothèques de séquençage ont été préparées en utilisant le QIAseq FX DNA Library Kit (Qiagen, Germany) afin d'obtenir des fragments de taille 300-500 pb comme suit :

7.1.1. Fragmentation

Pour chaque échantillon, la réaction de fragmentation FX a été réalisée dans un puits d'une plaque à 96 puits. Un volume de 17.5 µl d'ADN génomique a été transféré dans chaque puits et mélangé par pipetage avec 7.5 µl du master mix (constitué de 2.5 µl de tampon FX x10 concentré et de 5 µl de l'enzyme FX).

La fragmentation a été effectuée à l'aide d'un thermocycleur Takara-Thermal Cycler Dice Touch (Japan) programmé comme suit: étape 1 : 1 min à 4°C, étape 2 : 3 min à 32°C , étape 3 : 30 min à 65°C et étape 4 : 1 min à 4°C.

7.1.2. Ligation des adaptateurs

Un volume de 2.5 µl d'ADN adaptateurs, préalablement répartis dans les puits d'une plaque à 96 puits, a été transféré dans le puits correspondant contenant l'ADN fragmenté obtenu dans l'étape précédente.

Ensuite, un volume de 22.5 μl du master mix, constitué de 7.5 μl d'eau, 10 μl de Tampon 5X et 5 μl d'ADN ligase, a été ajouté à chaque prélèvement, mélangé par vortex puis incubé pendant 15 min à 20°C.

7.1.3. Lavage

L'ADN a été précipité par ajout de 40 μl de solution de billes AMPure XP (Beckman Coulter, et de 400 μl d'éthanol (80%), mixés par vortex et laissé reposer pendant 5 min à température ambiante. Le surnageant a ensuite été éliminé par aspiration.

Deux lavages consécutifs ont été effectués en ajoutant, à chaque fois, 200 μl d'éthanol (80%) dans chaque puits et en éliminant le surnageant par aspiration. L'éthanol résiduel a été éliminé par incubation pendant 5-10 min jusqu'au séchage des billes.

7.1.4. Amplification des bibliothèques de séquençage

L'amplification des fragments d'ADN génomique a été réalisée par PCR, après l'ajout, dans chaque puits, de 25 μl de master mix de PCR composé de 12.5 μl de master mix HiFi (2x concentré), 0.75 μl d'amorces (10 μM de chacune) et 11.75 μl de tampon EB.

L'amplification a été réalisée à partir de 17,5 μL d'ADN génomique, à une concentration comprise entre 20 et 50 ng/ μL .

L'amplification a été effectuée à l'aide d'un thermocycleur de type Takara-Thermal Cycler Dice Touch (Japan), programmé comme suit : une étape de dénaturation initiale à 98°C pendant 2 min ; suivit par 4 cycles de : 20 sec à 98°C (dénaturation), 30 sec à 60°C (hybridation) et 30 sec à 72°C (élongation) et enfin une extension finale de 1 min à 72°C.

7.1.5. Purification des bibliothèques de séquençage

Les amplifiats positionnés sur la même ligne de la plaque de 96 puits ont été collectés dans un seul tube Eppendorf. 5 μl de chaque tube ont été ajoutés à 10 μl de 2X PB et mélangé par vortex. Ensuite, 5 μl de chaque tube ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (p/v) dans du tampon TAE (1X), coloré avec le colorant d'acide nucléique GelRed (Sigma aldrich), sous un voltage constant (100 V) pendant 30 min.

L'ADN est ensuite visualisé à l'aide d'un transilluminateur à UV, et la taille des amplicons est révélée par un marqueur de poids moléculaire à 100 bp (Promega, USA). La partie du gel contenant des amplicons ayant une taille entre 350-500 pb a été excisée à l'aide d'un scalpel et récupérée dans un tube.

L'ADN contenu dans la partie du gel excisée a été purifié en suivant le protocole Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, USA) comme décrit ci-dessous :

- 700 µl de Membrane Binding Solution ont été ajoutés à un volume égal du gel excisé.
- Le mélange a été transféré dans une colonne SV Minicolumn posée sur un tube collecteur, incubée 1 min à température ambiante et centrifugée 1 min à 10000 rpm. Ensuite, le filtrat a été éliminé du tube collecteur.
- La colonne a été lavée par ajout de 700 µl d'une solution de lavage Membrane Wash Solution (éthanol ajouté), suivi d'une centrifugation à 10000 rpm pendant 1 min. Le filtrat a été éliminé du tube collecteur. Cette étape a été répétée avec l'ajout de 500 µl de Membrane Wash Solution et centrifugation à 10000 rpm pendant 5 min.
- Le filtrat a été éliminé du tube collecteur. Une centrifugation pendant 1 min à 10000 rpm a été réalisée en laissant le couvercle ouvert pour permettre l'évaporation de l'éthanol résiduel.
- L'ADN fixé sur la colonne a été élué par ajout de 50 µl d'eau, suivi d'une incubation pendant 1 min à température ambiante, puis d'une centrifugation à 10000 rpm pendant 1 min. L'ADN récupéré dans le tube a ensuite été incubé 5 min à 65 °C.
- L'ADN a ensuite été quantifié à l'aide de Qubit Flex Fluorometer (ThermoFisher) et conservé à -20°C.

7.1.6. Dénaturation, normalisation et pooling des bibliothèques de séquençage

Les bibliothèques de séquençage ont été diluées avec le tampon EB, afin d'obtenir une concentration d'environ 1 ng/µl. Un volume de 10 µl des bibliothèques de séquençage a été dénaturé pendant 5 min en présence de 10 µl de NaOH (0.2 N).

3 dilutions successives de la banque d'ADN dénaturée ont été réalisées dans tampon HT1 (Hyb Buffer 1) comme suit :

- ⇒ Première dilution : 20 µl d'ADN dans 980 µl de tampon HT1 (V final= 1000 µl).
- ⇒ Deuxième dilution : 260 µl de la dilution précédente dans 740 µl de tampon HT1 (V final= 1000 µl).
- ⇒ Troisième dilution : 200 µl de la dilution précédente dans 1400 µl de tampon HT1 (V final= 1600 µl).

Un volume de 2 µl de la banque d'ADN PhiX Control v3 (20pM) a été ajouté, cette banque d'ADN sert comme contrôle de qualité pour le séquençage, l'alignement et pour estimer le taux d'erreur.

7.2. Réactions de séquençage

Le séquençage en paires " paired-end read sequencing" (2 ×150-mer) a été effectué à l'aide d'un séquenceur Illumina NexSeq 500 (300 cycles), en utilisant le kit NextSeq 500/550 Mid Output Reagent Kit v2.5.

Un volume de 1.3 ml de bibliothèques de séquençage a été chargé dans le séquenceur, et le séquençage a été lancé.

8. Analyse bioinformatique

8.1. Analyse bioinformatique des génomes de *Staphylococcus/Mammaliicoccus* spp.

8.1.1. Démultiplexage, contrôle de la qualité et assemblage des séquences

Après le trimming, visant à éliminer les séquences d'adaptateurs, les codes-barres et les bases de mauvaise qualité, Les séquences obtenues ont été assemblées *de novo* à l'aide du pipeline A5-miseq.

8.1.2. Annotation, génotypage et détection des gènes

L'annotation des génomes a été réalisée avec le logiciel Prokka (rapid prokaryotic genome annotation tool)(Seemann, 2014).

Le génotypage *in silico* des souches par MLST (Larsen *et al.*, 2012) et spaTyper (Bartels *et al.*, 2014) a été réalisé sur le site du Center for Genomic Epidemiology (<https://www.genomicepidemiology.org/services/>)

Les gènes de résistance aux antibiotiques et le type SCC*mec* ont été identifiés à l'aide de ResFinder (Zankari *et al.*, 2012) et de SCC*mec*Finder, respectivement.

8.1.3. Analyse du pangénome

L'analyse du pangéome des 78 génomes entiers de *Staphylococcus/Mammaliicoccus* spp. (58 de cette étude et 20 disponible sur NCBI ; voir Annexe) a été réalisée à l'aide de Roary (Page *et al.*, 2015).

La construction des arbres phylogénétiques a été effectuée avec FastTree et visualisée en ligne via Phandango (Hadfield *et al.*, 2018). Cela a été réalisé en utilisant la matrice d'absence et de présence des gènes, ainsi que le fichier d'arbre au format Newick standard généré par Roary.

8.2. Analyse bioinformatique des métagénomés dans les pieds diabétiques et les PSPC

8.2.1. Visualisation et caractérisation taxonomiques des communautés bactériennes

Après élimination des séquences d'ADN adaptateurs et les séquences de faible qualité, le pipeline MePIC (Metagenomic Pathogen Identification for Clinical Specimens) (Takeuchi *et al.*, 2014) a été utilisé dans l'analyse métagénomique pour identifier les communautés bactériennes du pied diabétique et de la PSPC.

MePIC compare les séquences d'ADN avec les séquences similaires d'espèces/souches pathogènes connues, dans la base de données (NCBI nt) en utilisant le programme MEGABLAST.

L'abondance d'un organisme dans l'échantillon et de gènes de virulence peuvent être déduites du nombre de séquences détectées, qui est proportionnelle au nombre de séquences nucléotidiques correspondantes. Les pourcentages des séquences du génome humain ont été seulement estimés mais exclues de l'analyse en aval.

8.2.2. Visualisation des métagénomes

Les données métagénomiques ont été visualisée sous forme de graphes interactifs à l'aide de Krona (Ondov *et al.*, 2011), un outil de visualisation des résultats métagénomiques. Krona permet l'exploitation des abondances relatives au sein d'une hiérarchie complexe de classification métagénomique.

8.2.3. Analyses de la diversité et abondance relative des taxa

a. Analyses de la diversité des taxa

La diversité bactérienne alpha et beta des IPD et de la PSPC a été estimée au niveau du genre bactérien à l'aide du logiciel MEGAN v6.

La diversité alpha a été quantifiée en utilisant l'indice de diversité de Shannon-Weaver H' .

L'analyse de la diversité beta a été réalisée à l'aide de l'Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) et du réseau Neighbor-net, basés respectivement sur les distances de dissimilarité de Bray-Curtis et l'indice de similarité de Goodall (Bryant et Moulton, 2004 ; Mitra *et al.*, 2010).

b. Analyses de l'abondance relative des taxa

Les données métagénomiques ont été analysées en utilisant Megan 6. Basé sur une approche statistique, Megan utilise un algorithme simple pour comparer les séquences aléatoires des génomes avec des séquences connues dans les bases de données en utilisant BLAST, puis Megan 6 utilise la taxonomie NCBI pour organiser et résumer les résultats avant de les présenter

sous forme d'arbres phylogénétique, de graphes statistique ou d'abondance relative ce qui garantit une haute résolution taxonomique au niveau d'espèce et de souche (Huson *et al.*, 2007).

9. Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel Statistical Package for Social Sciences (SPSS ; version 26.0). Une valeur $p < 0,05$ était considérée comme statistiquement significative.

Les tableaux de contingence ont été construits et le test Khi 2 a été utilisé pour calculer les valeurs de p permettant de décrire les associations potentielles entre les espèces/ST et les gènes de virulence/résistance avec les grades PEDIS et la source des isolats. La signification statistique a été évaluée par le test Khi 2.

Le test des rangs signés de Wilcoxon a été appliqué pour estimer les différences de l'indice de diversité H' et des abondances entre les échantillons des IPD et de la PSPC. Le test de Kruskal–Wallis a été appliqué pour évaluer les différences de l'indice de diversité H' et des abondances entre les grades PEDIS.

Les données continues ont été exprimées selon la normalité de la distribution des données, sous forme de médiane avec écart interquartile (EI, 25^e–75^e centiles) (distribution non normale).

Résultats

1. Caractéristiques des patients

Dans le cadre de cette étude, 32 patients atteints d’IPD au niveau d’un seul pied et hospitalisés au niveau de deux centres hospitaliers de la Wilaya de Constantine, le Centre Hospitalier Universitaire Dr Ben Badis et l’Hôpital Militaire Régional Universitaire, ont été inclus dans cette étude.

Les IPDs ont été classées par les cliniciens en se basant sur la classification PEDIS_IWGDF (Lipsky *et al.*, 2020). Deux prélèvements ont été collectés à partir de chaque patient, un du pied diabétique et le deuxième de la peau saine.

De plus, 14 souches précédemment isolées de 12 patients atteints d’IPDs ont été inclus dans cette étude.

Les données démographiques et cliniques des patients inclus dans cette étude sont présentées dans le **tableau 7**.

Tableau 7: Données démographiques et cliniques des patients.

Patient	Sexe	Âge	Type de diabète	Grade PEDIS	Localisation de l’ulcère	Antibiothérapie	Pathologies liées au diabète
P01	M	73	T2	3	Avant-pied	Ciprofloxacine	Maladie artérielle périphérique, Hypertension
P02	F	51	T2	3	Médio pied	Amoxicilline-clavulanate	Maladie artérielle périphérique
P03	M	61	T2	4	Talon	Métronidazole, Céfotaxime	Maladie artérielle périphérique
P04	M	62	T2	3	Avant-pied	Clindamycine, Ciprofloxacine	Maladie artérielle périphérique
P05	F	60	T2	4	Médio pied	Métronidazole, Céfotaxime	Maladie artérielle périphérique
P06	M	71	T2	3	Avant-pied	Ciprofloxacine	Maladie coronarienne, Hypertension
P07	M	61	T2	3	Avant-pied	Clindamycine	Maladie coronarienne,
P08	F	63	T2	3	Talon	Métronidazole, Céfotaxime	Maladie artérielle périphérique, Neuropathie

P09	M	64	T2	4	Avant-pied	Céfotaxime	Hypertension
P10	M	73	T2	2	Talon	Amoxicilline-clavulanate	Hypertension, Neuropathie
P11	M	66	T1	2	Médio pied	Clindamycine	Neuropathie
P12	M	59	T2	2	Médio pied	Céphalexine	Maladie artérielle périphérique
P13	M	54	T1	4	Avant-pied	Bactrim	Hypertension
P14	F	80	T2	2	Avant-pied	Imipénem	Hypertension, Neuropathie
P15	M	74	T1	2	Talon	Amoxicilline-clavulanate	Maladie artérielle périphérique, Hypertension
P16	M	61	T2	3	Avant-pied	Céfazoline	Maladie coronarienne,
P17	M	70	T1	2	Talon	Bactrim	Maladie artérielle périphérique, Neuropathie
P18	M	49	T2	4	Médio pied	Clindamycine, Céfotaxime	Hypertension
P19	M	44	T1	3	Avant-pied	Imipénem	N
P20	M	71	T1	2	Médio pied	Imipénem	Maladie artérielle périphérique
P21	M	62	T1	4	Médio pied	Ciprofloxacine	Maladie artérielle périphérique
P22	M	66	T2	4	Talon	Clindamycine, Ciprofloxacine	Neuropathie
P23	M	57	T2	4	Talon	Imipénem	Maladie artérielle périphérique, Neuropathie
P24	M	63	T2	4	Médio pied	Céfazoline	Hypertension
P25	M	70	T2	3	Avant-pied	Amoxicilline-clavulanate	Maladie artérielle périphérique, Neuropathie
P26	M	85	T1	4	Talon	Clindamycine, Ciprofloxacine	Hypertension
P27	M	82	T2	4	Avant-pied	Métronidazole, Céfotaxime	Maladie coronarienne, Neuropathie
P28	M	72	T2	4	Médio pied	Métronidazole, Céfotaxime	Hypertension, Neuropathie
P29	M	54	T1	3	Talon	Bactrim, Céfotaxime	Maladie coronarienne, Maladie artérielle périphérique
P30	M	59	T2	3	Avant-pied	Ciprofloxacine	Hypertension, Neuropathie
P31	M	64	T2	4	Avant-pied	Clindamycine, Ciprofloxacine	Maladie coronarienne, Maladie artérielle périphérique

P32	M	60	T2	3	Talon	Métronidazole, Céfotaxime	Maladie artérielle périphérique
S16*	F	57	T1	3	Talon	Céfazoline	Neuropathie
S17K*	M	72	T2	2	Talon	Amoxicilline- clavulanate	Maladie coronarienne
S104K*	F	60	T2	2	Médio pied	Imipénem	Maladie coronarienne
S4K*	M	59	T2	2	Avant-pied	Clindamycine, Ciprofloxacine	Maladie artérielle périphérique
S6K*	M	49	T1	3	Médio pied	Bactrim	Hypertension
S7K*	M	58	T2	3	Talon	Ciprofloxacine	Neuropathie
S8K*	M	60	T2	4	Talon	Métronidazole, Céfotaxime	Maladie artérielle périphérique, Neuropathie
S9K*	M	52	T1	3	Médio pied	Céphalexine, Gentamicine	Hypertension
S10K*	M	60	T2	4	Avant-pied	Métronidazole, Céfotaxime	Neuropathie
S11K*	M	67	T2	4	Talon	Clindamycine, Ciprofloxacine	Maladie coronarienne
S12K*	M	85	T2	3	Avant-pied	Ciprofloxacine	Neuropathie
S14K*	F	60	T2	4	Médio pied	Céfazoline	N

* Prélèvement collecté uniquement à partir d'IPD. M : Masculin ; F : Féminin ; T1/T2 : diabète de type 1 ou 2. P1-P32 : patients inclus dans les deux parties de l'étude, N : aucune pathologie liée au diabète identifiée.

Trente-sept patients (84,1%) étaient de sexe masculin et sept (15,1%) de sexe féminin. L'âge des patients variait entre 44 et 85 ans, avec une moyenne d'âge de 63,6±9.3 ans.

Selon la classification PEDIS_IWGDF, 36,4% (n=6) des infections ont été classées comme PEDIS 2_légères, 38,7% (n=17) PEDIS 3_modérées, et 25% (n=11) PEDIS 4_sévères.

Quarante-deux (95.5%) patients ont présenté au moins une pathologie liée au diabète. La maladie artérielle périphérique était la plus fréquente (40,9%, n=18), suivie de la neuropathie (36,4%, n=16), de l'hypertension artérielle (31,8%, n=14) et de la coronaropathie (22,7%, n=10).

2. Isolement de *Staphylococcus* et *Mammaliicoccus* spp.

L'identification des souches a été basée sur les caractères culturels et morphologiques après incubation. Les colonies de *S. aureus* sont de couleur jaune doré, arrondies à bords réguliers. En revanche, les colonies appartenant aux autres espèces de SCoN/*Mammaliicoccus* présentent une apparence variable en fonction de l'espèce et de la souche elles-mêmes.

D'après ces résultats, 58 colonies ont été suspectées appartenir aux genres *Staphylococcus* et *Mammaliicoccus* spp., dont 44 provenaient de 32 patients prélevés de la peau saine et du pied diabétique, et 14 souches supplémentaires isolées pied diabétique des 12 patients.

3. Identification des isolats de *Staphylococcus* et *Mammaliicoccus* spp. par séquençage du génome entier

Les 58 isolats retenus dans l'étape précédente ont été soumis à un séquençage du génome entier. Les résultats ont permis l'identification de 32 (55,2%) *S. aureus*, 10 (17,2%) *S. epidermidis*, 8 (13,8%) *S. haemolyticus*, 3 (5,2%) *S. simulans*, 2 (3,5%) *S. caprae*, ainsi qu'un isolat chacun (1,7 %) de *S. hominis*, *S. saprophyticus* et *M. sciuri*.

Parmi les 32 isolats de *S. aureus*, 23 (71,9 %) provenaient d'IPD, tandis que 9 (28,1 %) de la PSPC.

Vingt-sept des 32 isolats de *S. aureus* (84,4%) portaient le gène *mecA*, qui confère la résistance à la méthicilline ; et par conséquent, ils ont été classés comme des SARM. Parmi ces derniers, 66,7% (18/27) provenaient des IPD et 33,3% (9/27) de la PSPC.

Pour ce qui est des SCoN/ *Mammaliicoccus* spp., *S. epidermidis* est l'espèce la plus abondante, dans la PSPC (6/10, 60%). Les autres espèces ont été exclusivement isolées de la PSPC.

Statistiquement, la variation des espèces était significativement associée à la source d'isolement (valeur $p = 0,004$).

4. Typage moléculaire des isolats de *Staphylococcus/Mammaliicoccus* spp.

4.1. Typage par MLST

La détermination *in silico* des séquences types (STs) a révélé que les isolats de *S. aureus* appartenaient à 6 STs connues, dont ST80 (16/32, 50 %), ST241 (5/32, 15,6 %), ST672 (3/32, 9,4 %), ST1 (2/32, 6,3 %), ST97 et ST291 (1/32 chacun, 3,1 %), ainsi que 4 isolats appartenaient à une ST non identifiée (STNF) (12,5 %) (**Tableau 8**).

Trois STs ont été détectées parmi les isolats de *S. epidermidis*, ST54 (6/10; 60 %), ST35 (2/10; 20 %) et ST640 (1/10; 10 %). Tandis que cinq STs ont été détectées parmi les isolats de *S. haemolyticus*, ST3 (3/8 ; 37,5 %), ST25 (2/8; 25 %) et ST29, ST1 et ST56 (1/8; 12,5 %) (**Tableau 8**).

Table 8: Caractéristiques moléculaires des souches de *Staphylococcus/Mammaliicoccus* spp. isolées des IPD et de la peau saine.

Patient	Nombre d'isolats	Origine	Espèce	SCCmec	ST	Spa
P01	3	IPD	<i>S. aureus</i>	IVd(2B)	ST672	t3841
		PSPC	<i>S. aureus</i>	IVd(2B)	ST672	t3841
P02	2	PSPC	<i>S. epidermidis</i>	SCoNSM	ST54	
		PSPC	<i>S. aureus</i>	IVc(2B)	ST80	t1247
P03	3	PSPC	<i>S. aureus</i>	III(3A)	STNF	t037
		IPD	<i>S. aureus</i>	IVc(2B)	ST80	t044
		PSPC	<i>S. aureus</i>	IVc(2B)	ST80-	t044
P04	2	PSPC	<i>S. haemolyticus</i>	SCoNSM	ST3 [§]	
		IPD	<i>S. epidermidis</i>	SCoNSM	ST54	
		PSPC	<i>S. epidermidis</i>	SCoNSM	ST54	
P05	3	IPD	<i>S. epidermidis</i>	SCoNSM	ST54	
		PSPC	<i>S. haemolyticus</i>	SCoNSM	ST29	
		PSPC	<i>M. sciuri</i>	III(3A)	STNF	
P06	2	IPD	<i>S. epidermidis</i>	SCoNSM	ST54	
		PSPC	<i>S. epidermidis</i>	SCoNSM	ST54	
P07	1	PSPC	<i>S. epidermidis</i>	SCoNSM	STNF	
P08	1	PSPC	<i>S. haemolyticus</i>	SCoNSM	ST25	
P09	3	IPD	<i>S. aureus</i>	IVc(2B)	ST80	t044
		IPD	<i>S. caprae</i>	SCoNSM	STNF	
		PSPC	<i>S. aureus</i>	IVc(2B)	ST80	t044
P10	2	IPD	<i>S. aureus</i>	SASM	ST291	t937
		PSPC	<i>S. hominis</i>	SCoNSM	STNF	
P11	1	IPD	<i>S. aureus</i>	III(3A)	STNF	t037
P13	1	PSPC	<i>S. epidermidis</i>	SCoNSM	ST35	
P14	1	PSPC	<i>S. haemolyticus</i>	SCoNSM	ST3	
P15	3	IPD	<i>S. aureus</i>	III(3A)	ST241	t037
		PSPC	<i>S. aureus</i>	III(3A)	ST241	t037

		PSPC	<i>S. epidermidis</i>	SCoNSM	ST35	
P16	2	IPD	<i>S. aureus</i>	III(3A)	ST241	t037
		PSPC	<i>S. haemolyticus</i>	SCoNSM	ST3	
P17	2	IPD	<i>S. epidermidis</i>	SCoNSM	ST640	
		PSPC	<i>S. simulans</i>	SCoNSM	STNF	
P18	1	PSPC	<i>S. simulans</i>	SCoNSM	STNF	
P19	2	IPD	<i>S. caprae</i>	SCoNSM	STNF	
		PSPC	<i>S. simulans</i>	SCoNSM	STNF	
P20	1	PSPC	<i>S. haemolyticus</i>	SCoNSM	ST1	
P26	1	IPD	<i>S. aureus</i>	III(3A)	STNF	t037
P27	1	PSPC	<i>S. haemolyticus</i>	SCoNSM	ST56	
P28	1	PSPC	<i>S. haemolyticus</i>	SCoNSM	ST25	
P29	1	PSPC	<i>S. aureus</i>	IVc(2B)	ST80	t044
P30	1	PSPC	<i>S. aureus</i>	SASM	ST97	t9432
P31	1	IPD	<i>S. aureus</i>	IVd(2B)	ST672	t3841
P32	2	IPD	<i>S. aureus</i>	III(3A)	ST241	t037
		PSPC	<i>S. aureus</i>	III(3A)	ST241	t037
S16*	1	IPD	<i>S. aureus</i>	SASM	STNF	t037
S17K*	1	IPD	<i>S. aureus</i>	IVc(2B)	ST80	t044
S104K*	1	IPD	<i>S. aureus</i>	IVc(2B)	ST80	t044
S4K*	1	IPD	<i>S. saprophyticus</i>	SCoNSM	STNF	
S6K*	1	IPD	<i>S. aureus</i>	IVc(2B)	ST80	t044
S7K*	1	IPD	<i>S. aureus</i>	IVc(2B)	ST80	t044
S8K*	1	IPD	<i>S. aureus</i>	IVc(2B)	ST80	t044
S9K*	1	IPD	<i>S. aureus</i>	IVc(2B)	ST80	t044
S10K*	1	IPD	<i>S. aureus</i>	IVc(2B)	ST80	t044
S11K*	2	IPD	<i>S. aureus</i>	IVc(2B)	ST80	t044
		IPD	<i>S. aureus</i>	IVc(2B)	ST80	t044
S12K*	2	IPD	<i>S. aureus</i>	IVc(2B)	ST80	t044
		IPD	<i>S. aureus</i>	SASM	ST1	t127
S14K*	1	IPD	<i>S. aureus</i>	SASM	ST1	t127

IPD : infection du pied diabétique, PSPC : peau saine du pied contralatéral; SASM : *Staphylocoque aureus* sensible à la méthicilline ; SCoNSM : *Staphylocoque* à coagulase négative sensible à la méthicilline ; ST : Séquence type; STNF : ST non identifié ; SCCmec : Cassette chromosomique *Staphylococcique mec*.
 *souches supplémentaires. § Nouvel allèle, ST peut indiquer le ST le plus proche. Les valeurs sont des nombres.

4.2. Typage *spa*

Le typage du gène *spa* codant la protéine A spécifique de *S. aureus*, a permis l'identification de 8 types *spa* différents. Le type le plus dominant était le t044 (13/32 ; 40,6 %), suivi de t037 (9/32, 28,1 %), t3841 (3/32, 9,4 %), t1247 et t127 (2/32 chacun, 6,3 %), ainsi que t639, t9432 et t937 (1/32 chacun, 3,1 %).

4.3. Typage SCC*mec*

Deux types de SCC*mec* ont été détectés parmi les souches de SARM, le type IV (19/27 ; 70,4%) et le type III(A) (8/27 ; 29,6%). Les SCC*mec* de type IV ont été classées en sous-types IVc(2B) (16/27 ; 59,3 %) et IVd(2B) (3/27 ; 11,11 %).

Parmi les souches de SCoN/ *Mammaliicoccus* spp., SCC*mec* III(A) a également été détecté chez *M. sciuri* (1/26 ; 3,8 %).

4.4. Caractérisation des clones de *S. aureus* par combinaison des typages ST-SCC*mec*-*spa*

La combinaison des types ST-SCC*mec*-*spa* a révélé la présence de quatre clones de SARM distincts. Le clone prédominant était ST80-t044-IVc(2B) (13/27, 48,1 %) suivi par ST241-t037-III(3 A) (5/27, 18,5 %), ST672-t3841-IVd(2B) (3/27, 11,1 %) et STNF-t037-III(3 A) (3/27, 11,1 %). De plus, deux autres types *spa* ont été détectés parmi les isolats ST80-IVc(2B), t1247 (2/27, 7,4 %) et t639 (1/27, 3,7 %).

Quatre clones ont également été identifiés parmi les isolats de SASM, avec 2 isolats de ST1-t127 (2/5, 40 %), et 1 isolat chacun de ST97-t9432, ST291-t937 et STNF-t037 (1/5 chacun, 20 %).

5. Analyse des gènes de virulence chez les isolats de *S. aureus*.

Nous avons analysé la présence et l'absence des gènes de virulence. Toutes les associations statistiques potentielles entre les STs et les gènes de virulence avec les grades PEDIS et la source des isolats ont été examinées en utilisant le test Khi 2. Cependant, seules les associations statistiques entre la présence/absence des gènes et les clones ont été rapportées.

L'analyse des génomes des isolats de *S. aureus* a révélé la présence d'un large éventail de gènes de virulence. Le **tableau 9** présente les proportions des gènes de virulence dans chaque clone, ainsi que les associations statistiques entre les gènes de virulence et le type de clone.

Tableau 9 :Distribution des gènes de virulence parmi les différents clones de *S. aureus*.

	ST1-t127 (n=2) n(%)	ST241-t037 (n=5) n(%)	ST291-t937 (n=1) n(%)	ST672-t3841 (n=3) n(%)	ST80-t044/t1247/t639 (n=16) n(%)	ST97-t9432 (n=1) n(%)	STNF-t037 (n=4) n(%)	Total (n=32) n(%)	<i>s</i> p-value
	Adhésines								
<i>clfA</i>	2(100)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	1(100)	4(100)	12(37.5)	< 0.001
<i>clfB</i>	2(100)	5(100)	0(0)	3(100)	0(0)	1(100)	2(50)	13(40.6)	< 0.001
<i>ebp</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>fnbA</i>	2(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(6.3)	< 0.001
<i>fnbB</i>	2(100)	0(0)	0(0)	0(0)	1(6.3)	0(0)	0(0)	3(9.4)	0.002
<i>map</i>	0(0)	5(100)	0(0)	3(100)	15(93.8)	1(100)	4(100)	28(87.5)	0.001
<i>capA</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
<i>cap8A</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>cap8B</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>cap8C</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>cap8D</i>	0(0)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	30(93.8)	< 0.001
<i>cap8E</i>	0(0)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	30(93.8)	< 0.001
<i>cap8F</i>	0(0)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	30(93.8)	< 0.001
<i>cap8G</i>	0(0)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	30(93.8)	< 0.001
<i>cap8H</i>	0(0)	5(100)	0(0)	3(100)	16(100)	0(0)	4(100)	28(87.5)	< 0.001
<i>cap8I</i>	2(100)	5(100)	0(0)	3(100)	16(100)	0(0)	4(100)	30(93.8)	< 0.001
<i>cap8J</i>	2(100)	5(100)	0(0)	3(100)	16(100)	0(0)	4(100)	30(93.8)	< 0.001
<i>cap8K</i>	2(100)	5(100)	0(0)	3(100)	16(100)	0(0)	4(100)	30(93.8)	< 0.001
<i>cap8L</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N

<i>cap8M</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>cap8N</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>cap8O</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>cap8P</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>capN</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
<i>srtB</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	15(93.8)	1(100)	4(100)	31(96.9)	0.984
<i>sdrC</i>	2(100)	5(100)	0(0)	1(33.3)	12(75)	1(100)	4(100)	25(78.1)	0.104
<i>sdrD</i>	2(100)	5(100)	0(0)	3(100)	15(93.8)	1(100)	4(100)	30(93.8)	0.014
<i>sdrE</i>	1(50)	3(60)	0(0)	0(0)	15(93.8)	1(100)	3(75)	23(71.9)	0.018
<i>icaA/B/C/D/R</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>isdA</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>isdB</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>isdC</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>isdD</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	15(93.8)	1(100)	4(100)	31(96.9)	0.984
<i>isdE</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>isdF</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>isdG</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>isdI</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
<i>harA</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214

Toxines

Hemolysines									
<i>hly/hla</i>	2(100)	0(0)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	0(0)	23(71.9)	< 0.001
<i>hly/hlb</i>	1(50)	0(0)	1(100)	1(33.3)	5(31.3)	1(100)	0(0)	9(28.1)	0.161
<i>hly/hld</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>hly/hlgA/B/C</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
Enterotoxines et enterotoxines-Like									
<i>sea</i>	2(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	4(100)	6(18.8)	< 0.001
<i>seb</i>	2(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(100)	0(0)	3(9.4)	< 0.001
<i>seh</i>	2(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(6.3)	< 0.001
<i>egc cluster*</i>	0(0)	0(0)	0(0)	3(100)	0(0)	0(0)	0(0)	3(9.4)	< 0.001
<i>sek</i>	2(100)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	4(100)	11(34.4)	< 0.001
<i>seq</i>	2(100)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	4(100)	11(34.4)	< 0.001
<i>selk</i>	2(100)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	4(100)	11(34.4)	< 0.001
<i>selq</i>	2(100)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	4(100)	11(34.4)	< 0.001
Toxines similaires à l'exotoxine staphylococcique									
<i>set16</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	0(0)	0(0)	0(0)	2(6.3)	0.060
<i>set17</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
<i>set18</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
<i>set19</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(33.3)	0(0)	1(100)	0(0)	2(6.3)	0.002
<i>set20</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
<i>set21</i>	1(50)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.1)	0.017
<i>set22</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
<i>set23</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214

<i>set24</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
<i>set25</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
<i>set26</i>	1(50)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.1)	0.017
Autres toxines									
<i>edinB</i>	0(0)	0(0)	1(100)	0(0)	16(100)	0(0)	0(0)	17(53.1)	< 0.001
<i>lukS-PV/lukF-PV</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	16(100)	0(0)	0(0)	16(50)	< 0.001
<i>lukD/E</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
Système de sécrétion de type VII									
<i>esaA</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>esaB</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>esaD</i>	2(100)	0(0)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	0(0)	23(71.9)	< 0.001
<i>esaE</i>	2(100)	0(0)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	0(0)	23(71.9)	< 0.001
<i>esaG</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
<i>esaG1</i>	1(50)	5(100)	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	4(100)	11(34.4)	< 0.001
<i>esaG2</i>	1(50)	0(0)	0(0)	2(66.7)	13(81.3)	0(0)	0(0)	16(50)	0.007
<i>esaG3</i>	1(50)	0(0)	0(0)	2(66.7)	0(0)	0(0)	0(0)	3(9.4)	0.006
<i>esaG4</i>	1(50)	5(100)	0(0)	2(66.7)	0(0)	0(0)	4(100)	12(37.5)	< 0.001
<i>esaG5</i>	1(50)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.1)	0.017
<i>esaG6</i>	0(0)	0(0)	1(100)	2(66.7)	0(0)	0(0)	0(0)	3(9.4)	< 0.001
<i>esaG7</i>	1(50)	0(0)	0(0)	2(66.7)	0(0)	0(0)	0(0)	3(9.4)	0.006
<i>esaG8</i>	1(50)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.1)	0.017
<i>esaG9</i>	1(50)	5(100)	0(0)	2(66.7)	13(81.3)	0(0)	4(100)	25(78.1)	0.091
<i>essa</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>essB</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>essC</i>	2(100)	0(0)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	0(0)	23(71.9)	< 0.001
<i>esxA</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>esxB</i>	2(100)	0(0)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	0(0)	23(71.9)	< 0.001
<i>esxC</i>	2(100)	0(0)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	0(0)	23(71.9)	< 0.001
<i>esxD</i>	2(100)	0(0)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	0(0)	23(71.9)	< 0.001
Enzymes de dégradation									
lipases									
<i>geh</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>lip</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
Protéases									
<i>sspA</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>sspB</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	0(0)	28(87.5)	< 0.001
<i>sspC</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>splA</i>	2(100)	5(100)	1(100)	0(0)	16(100)	1(100)	4(100)	29(90.6)	< 0.001
<i>splB</i>	2(100)	5(100)	0(0)	0(0)	16(100)	1(100)	4(100)	28(87.5)	< 0.001
<i>splE</i>	2(100)	5(100)	1(100)	0(0)	0(0)	1(100)	4(100)	13(40.6)	< 0.001
Hyaluronidases									
<i>hysA</i>	2(100)	5(100)	1(100)	0(0)	16(100)	0(0)	4(100)	28(87.5)	< 0.001
Coagulases									

<i>coa</i>	2(100)	0(0)	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	3(9.4)	< 0.001
<i>vWbp</i>	2(100)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	4(100)	11(34.4)	< 0.001
Autres enzymes									
<i>aur</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
Évasion immunitaire									
<i>adsA</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>chp</i>	0(0)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	5(15.6)	< 0.001
<i>sak</i>	2(100)	5(100)	0(0)	3(100)	14(87.5)	1(100)	4(100)	29(90.6)	0.077
<i>scn</i>	2(100)	5(100)	0(0)	3(100)	14(87.5)	1(100)	4(100)	29(90.6)	0.077
<i>spa</i>	2(100)	0(0)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	0(0)	23(71.9)	< 0.001
<i>sbi</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N

* Le cluster *egc* correspond aux gènes *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* et *seu*. N : valeur de *p* non significative ($p > 0,05$). Les valeurs sont exprimées en nombres et les pourcentages sont entre parenthèses.

5.1. Adhésines

Quarante-deux gènes codant des protéines de surface impliquées dans l'adhérence aux tissus de l'hôte ont été détectés. Cela inclut les gènes *clfA* (12/32 ; 37.5%) et *clfB* (13/32 ; 40.6%) codant pour les protéines de liaison au fibrinogène, *fnbA* (2/32 ; 6.3%) et *fnbB* (3/32 ; 9.4%) codant pour les protéines de liaison à la fibronectine. Parmi ces gènes, 15 étaient statistiquement associés au type de clone.

5.2. Toxines

Trente-cinq gènes codants des toxines ont été détectés aussi bien dans les SARM que dans les SASM.

À l'exception des gènes codant pour les toxines similaires à l'exotoxine staphylococcique, nous avons observé que chaque clone présentait un profil génétique distinct en ce qui concerne les gènes codant pour les toxines.

5.2.1. Hémolysines

Six gènes codant les hémolysines α , β , δ et γ ont été détectées. De manière remarquable, les gènes codant la γ -hémolysine (*hlgA*, *hlgC* et *hlgB*) et la δ -hémolysine (*hld*) ont été détectés dans tous les isolats de *S. aureus*. D'un autre côté, les gènes codant l' α -hémolysine (*hla/hly*) et la β -hémolysine (*hly*) n'ont pas été détectés dans les isolats appartenant aux ST241-t037 et ST97-t9432. Seul *hla/hly* était associé statistiquement au le type de clone ($p < 0.001$).

5.2.2. Entérotoxines et entérotoxines-like

Onze gènes codant les entérotoxines (*se*) (*sea*, *seb*, *seh*, *sek*, *seq*, *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* et *seu*) et 2 gènes codant les entérotoxines-like (*sel*) (*selk* et *selq*) ont été détectés. L'association statistique entre les gènes *se/sel* et le type de clone était très significative ($p = < 0.001$).

Les isolats ST1 portaient le plus grand nombre ($n=7$) de gènes *se/sel*, *sea*, *seb*, *seh*, *sek*, *seq*, *selk* et *selq*. En revanche, aucun des gènes *se/sel* n'a été détecté parmi les isolats ST80.

5.2.3. Toxines similaires à l'exotoxine staphylococcique

Nous avons détecté 11 gènes codant pour des toxines similaires à l'exotoxine staphylococcique, de *set16* à *set26*, avec des proportions de portage faibles allant de 3,1 % à 18,8 %.

5.2.4. Autres toxines

Les gènes codant les leucocidines (*lukD*, *lukE*) ont été détectés dans tous les isolats de *S. aureus* (32/32 ; 100%). En revanche, les gènes *lukF/lukS-PV*, codant la leucocidine de Pantone-Valentine (PVL), n'ont été détectés que dans les isolats appartenant au ST80 (16/32 ; 50%).

De plus, le gène *edinB* codant des inhibiteurs de la différenciation cellulaire épidermique a également été détecté uniquement dans les isolats appartenant à ST80 (16/32 ; 50%) et dans ST291-t937 (1/32 ; 3,1%).

De manière remarquable, aucun des isolats de *Staphylococcus/Mammaliococcus* spp. ne portait de gènes de toxine exfoliante (*eta* ou *etb*) ni de gène de toxine du choc toxique (*tst*).

5.3. Système de sécrétion de type VII

Les gènes du locus *ess* qui codent pour le système de sécrétion Ess/Type VII, essentiel à la virulence, ont été détectés chez les souches de *S. aureus*. Le gène *esxA* a été retrouvé dans tous les isolats (32/32, 100 %), tandis que les gènes *esxB*, *esxC* et *esxD*, codant pour de petites protéines sécrétées, étaient présents dans 71,9 % d'isolats (23/32 chacun). Les gènes *esaD* et *esaE*, identifiés également chez 23 isolats (71,9 % chacun), codent respectivement pour une toxine à activité nucléase et une chaperonne putative.

Les gènes *esaA*, *essA* et *essB*, codant pour des protéines membranaires, ainsi que *esaB*, codant pour une protéine cytoplasmique présumée, ont été retrouvés dans toutes les souches (32/32 chacun, 100 %). Le gène *essC*, codant pour une ATPase hexamérique ancrée à la membrane, a été détecté chez 71,9 % des isolats (23/32). Par ailleurs, les gènes *esaG(1 à 9)*, codant pour des antitoxines homologues, ont également été identifiés, avec des fréquences variables.

5.4. Exoenzymes

5.4.1. Lipases

Les gènes *lip* et *geh* codant pour des lipases capables de détruire les tissus hôtes ont été identifiés dans tous les isolats de *S. aureus* (32/32 chacun; 100%),.

5.4.2. Protéases

Une forte prévalence de gènes codant pour des protéases a été identifiée, tels que *sspA* (32/32 ; 100%), *sspB* (28/32 ; 87,5%) et *sspC* (32/32 ; 100%), codant respectivement pour la sérine protéase, la staphopaine B et la staphostatine B.

5.4.3. Hyaluronidases

Le gène *hysA*, codant pour l'hyaluronate lyase était présent dans (28/32 ; 87.5%) des isolats. Cette enzyme clive l'acide hyaluronique, facilitant ainsi la dissémination des pathogènes à travers les tissus de l'hôte.

5.4.4. Coagulases

Les gènes *coa* et *vWbp*, codant respectivement pour la coagulase et la protéine de liaison au facteur de Willebrand, ont été détectés dans les souches de *S. aureus*, montrant une forte association statistique ($p < 0.001$) avec le type de clones.

5.4.5. Autres exoenzymes

Tous les isolats de *S. aureus* possédaient le gène *aur* (32/32 ; 100%) codant pour l'aureolysine, une métalloprotéinase jouant un rôle dans l'inhibition des lymphocytes.

5.5. Protéines d'échappement au système immunitaire

On a identifié une forte prévalence de gènes codant pour des protéines impliquées dans la réduction, le blocage et l'échappement aux défenses immunitaires de l'hôte, *adsA* (32/32 ; 100%), *chp* (5/32 ; 15,6%), *sak* (29/32 ; 90,6%), *scn* (29/32 ; 90,6%), *spa* (23/32 ; 71,9%) et *sbi* (32/32 ; 100%).

6. Analyse des gènes de résistance aux antibiotiques chez les isolats de *S. aureus*.

Les gènes codant pour la résistance à plusieurs classes d'antibiotiques ont été détectés parmi les isolats de *S. aureus*. Le **tableau 10** récapitule les proportions des gènes de résistance détectés, ainsi que l'association statistique de ces gènes avec les différents clones.

Tableau 10: Gènes de résistance aux antibiotiques détectés dans les isolats de *S. aureus* (n = 32).

	ST1-t127 (n=2) n(%)	ST241-t037 (n=5) n(%)	ST291-t937 (n=1) n(%)	ST672-t3841 (n=3) n(%)	ST80-t044/t1247/t639 (n=16) n(%)	ST97-t9432 (n=1) n(%)	STNF-t037 (n=4) n(%)	Total (n=32) n(%)	* p-value
β-lactamines									
<i>mecA</i>	0(0)	5(100)	0(0)	3(100)	16(100)	0(0)	3(75)	27(84.4)	< 0.001
<i>blaZ</i>	0(0)	5(100)	1(100)	3(100)	2(12.5)	1(100)	4(100)	16(50)	< 0.001
<i>blaI</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(33.3)	0(0)	1(100)	0(0)	2(6.3)	0.002
<i>blaR1</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(33.3)	0(0)	1(100)	0(0)	2(6.3)	0.002
Enzymes modifiant les aminosides									
<i>ant(6)-Ia</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	16(100)	1(100)	0(0)	17(53.1)	< 0.001
<i>ant(9)-Ia</i>	0(0)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	5(15.6)	< 0.001
<i>aac(6')-aph(2'')</i>	0(0)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	3(75)	8(25)	< 0.001
<i>aph(3')-III</i>	0(0)	5(100)	0(0)	2(66.7)	13(81.3)	0(0)	0(0)	20(62.5)	0.005
<i>aph(3')-IIIa</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	5(15.6)	0.207
<i>sat4</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	5(15.6)	0.207
Macrolides									
<i>mph(C)</i>	0(0)	0(0)	0(0)	3(100)	0(0)	0(0)	0(0)	3(9.4)	< 0.001
<i>msr(A)</i>	0(0)	0(0)	0(0)	3(100)	0(0)	0(0)	0(0)	3(9.4)	< 0.001
<i>ermA</i>	0(0)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	5(15.6)	< 0.001
<i>ermC</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(6.3)	1(100)	0(0)	2(6.3)	0.014
Tétracyclines									
<i>tet(K)</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(12.5)	0(0)	0(0)	2(6.3)	0.907
<i>tet(M)</i>	0(0)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	4(100)	9(28.1)	< 0.001
<i>tet(38)</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
Acide fusidique									
<i>fusB</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(12.5)	0(0)	0(0)	2(6.3)	0.907
<i>fusC</i>	2(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(6.3)	< 0.001
Triméthoprime-sulfaméthoxazole									
<i>dfrG</i>	0(0)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	5(15.6)	< 0.001
Fosfomycine									
<i>fosB</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(33.3)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.1)	0.126

$p > 0,05$ est considéré comme statistiquement significatif. Les valeurs sont exprimées en nombres et les pourcentages sont entre parenthèses.

6.1. β -lactamines

Les gènes conférant la résistance aux β -lactamines, *mecA* et *blaZ*, ont été identifiés parmi les isolats de *S. aureus* à des fréquences respectives de 84,4 % (27/32) et 50 % (16/32).

6.2. Enzymes modifiant les aminosides (EMA)

Le gène *aph(3')-III/aph(3')-IIIa* était le plus répandu parmi les isolats de *S. aureus* (25/32 ; 78,1 %). Tous les isolats ST80 (16/32, 50 %) étaient positifs pour les gènes *ant(6)-Ia* et *aph(3')-III/aph(3')-IIIa*, et tous les isolats ST241 (5/32, 15,6 %) étaient positifs pour 3 gènes EMA, *ant(9)-Ia*, *aac(6')-aph(2'')* et *aph(3')-III*. En revanche, les isolats appartenant aux clones ST1-t127 et ST291-t937 ne portaient aucun gène EMA.

6.3. Macrolides

Quatre gènes conférant la résistance aux macrolides, lincosamides et streptogramine B (MLS_B) ont été identifiés dans les isolats de *S. aureus*. Les gènes *msr(A)* et *mph(C)* ont été identifiés dans tous les isolats de ST672 (3/32 ; 9,4 %), tandis que le gène *erm(A)* a été détecté dans tous les isolats de ST241 (5/32 ; 15,6 %).

6.4. Tétracyclines

Trois gènes associés à la résistance à la tétracycline ont été identifiés parmi les isolats de *S. aureus*, *tet(M)* (9/32 ; 28,1 %), *tet(K)* (2/32 ; 6,3 %) et *tet(38)* (6/32 ; 18,8 %).

Il est particulièrement notable que seuls les isolats du type spa t037, porteurs de SCC_{mec}-III (ST241 et STNF), étaient positifs pour le gène *tet(M)*.

6.5. Acide fusidique

Les gènes *fusB* (2/32 ; 6,3 %) et *fusC* (2/32 ; 6,3 %), responsables de la résistance à l'acide fusidique, ont été identifiés dans les clones ST80-t1247 et ST1-t127, respectivement.

6.6. Triméthoprime-sulfaméthoxazole

Le gène *dfrG* codant la résistance au triméthoprime-sulfaméthoxazole a été détecté uniquement dans les isolats appartenant à ST241 (5/32 ; 15,6 %).

6.7. Fosfomycine

Le gène *fosB*, conférant la résistance à la fosfomycine, a été identifié chez un seul isolat (1/32, 3.1%) appartenant au ST672.

7. Analyse des gènes de virulence chez les isolats de SCoN/*Mammaliicoccus* spp.

Le seul élément de virulence identifié parmi les 26 isolats de SCoN/*Mammaliicoccus* spp. était l'élément mobile de catabolisme de l'arginine (*arginine catabolic mobile element, ACME*), présent exclusivement dans les isolats de *S. epidermidis* (9/26; 34,6%) (**Tableau 11**).

Tableau 11: Gènes codant l'élément mobile catabolique de l'arginine dans les isolats de SCoN/*Mammaliicoccus* spp. (n = 26).

	<i>M. sciuri</i> (n=1) n(%)	<i>S. caprae</i> (n=2) n(%)	<i>S. epidermidis</i> (n=10) n(%)	<i>S. haemolyticus</i> (n=8) n(%)	<i>S. hominis</i> (n=1) n(%)	<i>S. saprophyticus</i> (n=1) n(%)	<i>S. simulans</i> (n=3) n(%)	Total (n=26) n(%)	*p-value
ACME	0(0)	0(0)	9(90)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	9(34.6)	0.001

ACME arginine catabolic mobile element, $p > 0,05$ est considéré comme statistiquement significatif. Les valeurs sont exprimées en nombres et les pourcentages sont entre parenthèses.

8. Analyse des gènes de résistance aux antibiotiques et aux biocides chez les isolats de SCoN/*Mammaliicoccus* spp.

Les gènes de résistance aux antibiotiques et aux biocides détectés parmi les isolats de SCoN/*Mammaliicoccus* spp. sont présentés dans le **tableau 12**.

Tableau 12: Gènes de résistance aux antibiotiques et aux biocides détectés dans les isolats de SCoN/*Mammaliicoccus* spp. (n = 26).

	<i>M. sciuri</i> (n=1) n(%)	<i>S. caprae</i> (n=2) n(%)	<i>S. epidermidis</i> (n=10) n(%)	<i>S. haemolyticus</i> (n=8) n(%)	<i>S. hominis</i> (n=1) n(%)	<i>S. saprophyticus</i> (n=1) n(%)	<i>S. simulans</i> (n=3) n(%)	Total (n=26) n(%)	*p-value
β-lactamines									
<i>blaZ</i>	0(0)	2(100)	10(100)	8(100)	1(100)	0(0)	0(0)	21(80.8)	< 0.001
<i>blaI</i>	0(0)	2(100)	1(10)	2(25)	0(0)	0(0)	0(0)	5(19.2)	0.103
<i>blaR1</i>	0(0)	1(50)	1(10)	2(25)	0(0)	0(0)	0(0)	4(15.4)	0.714
<i>mecA</i>	1(100)	0(0)	9(90)	8(100)	1(100)	0(0)	0(0)	19(73.1)	0.002
<i>mecA1</i>	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	< 0.001
<i>mecI</i>	1(100)	0(0)	1(10)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(7.7)	0.038
<i>mecR1</i>	1(100)	0(0)	1(10)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(7.7)	0.038
Enzymes modifiant les aminosides									
<i>aac(6')-aph(2'')</i>	0(0)	0(0)	0(0)	5(62.5)	0(0)	0(0)	0(0)	5(19.2)	0.030
<i>aac(6')-Ie/aph(2'')-Ia</i>	1(100)	0(0)	0(0)	2(25)	0(0)	0(0)	0(0)	3(11.5)	0.079
<i>aph(3')-III</i>	0(0)	0(0)	0(0)	4(50)	0(0)	0(0)	0(0)	4(15.4)	0.100
<i>aph(3')-IIIa</i>	0(0)	0(0)	0(0)	2(25)	0(0)	0(0)	0(0)	2(7.7)	0.560
<i>sat4</i>	0(0)	0(0)	0(0)	2(25)	0(0)	0(0)	0(0)	2(7.7)	0.560
Streptogramine									
<i>vat(B)</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(12.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	0.886
<i>vat(C)</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(12.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	0.886
<i>vgb(B)</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(12.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	0.886
Macrolides									
<i>mph (C)</i>	0(0)	0(0)	2(20)	8(100)	0(0)	0(0)	0(0)	10(38.5)	0.004
<i>msr(A)</i>	0(0)	0(0)	2(20)	8(100)	1(100)	0(0)	0(0)	11(42.3)	0.003
<i>ermC</i>	0(0)	0(0)	1(10)	5(62.5)	0(0)	0(0)	0(0)	6(23.1)	0.110
<i>vga(A)</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(12.5)	0(0)	0(0)	3(100)	4(15.4)	0.004
<i>vga(B)</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(12.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	0.886
<i>vga(A)LC</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(12.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	0.886
<i>sal(A)</i>	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	< 0.001
Tétracycline									
<i>tet(L)</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(12.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	0.886
<i>tet(K)</i>	0(0)	7(70)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	7(26.9)	0.018

Acide fusidique									
<i>fusB</i>	0(0)	1(50)	9(90)	3(37.5)	0(0)	0(0)	0(0)	13(50)	0.045
<i>fusC</i>	0(0)	0(0)	1(10)	1(12.5)	0(0)	0(0)	0(0)	2(7.7)	0.986
Trimethoprim-sulfamethoxazole									
<i>dfrG</i>	0(0)	0(0)	0(0)	5(62.5)	0(0)	0(0)	0(0)	5(19.2)	0.030
<i>dfrS1</i>	0(0)	0(0)	1(10)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	0.948
Fosfomycine									
<i>fosB</i>	0(0)	0(0)	10(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	10(38.5)	< 0.001
Streptomycine									
<i>str</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(12.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	0.886
Kanamycine and néomycine									
<i>aadD</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(12.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	0.886
Composés d'ammonium quaternaire									
<i>qacB</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(12.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	0.886

$p > 0,05$ est considéré comme statistiquement significatif. Les valeurs sont exprimées en nombres et les pourcentages sont entre parenthèses.

8.1. β -lactamines

Une fréquence élevée de gènes associés à la résistance aux β -lactamines, *blaZ* (21/26 ; 80,8%) et *mecA/mecAI* (20/26; 76,9%), a été observée parmi les isolats de SCoN/*M. sciuri*.

De manière remarquable, le seul isolat de *M. sciuri* portait simultanément les gènes *mecA* et *mecAI* (1/1 ; 100%).

8.2. EMA

À l'exception de *M. sciuri*, qui est positif pour *aac(6')-Ie/aph(2'')-Ia* (1/26 ; 3,8%), les gènes conférant la résistance aux EMA ont été détectés exclusivement dans les isolats appartenant à *S. haemolyticus*.

8.3. Macrolides

Sept gènes conférant la résistance aux macrolides ont été détectés, avec *mrs(A)* (11/26 ; 42,3%), *mph(C)* (10/26 ; 38,5%) et *ermC* (6/26 ; 23,1%) présentant les prévalences les plus élevées. Tous les isolats de *S. haemolyticus* étaient positifs pour *msr(A)* et *mph(C)*.

8.4. Tétracyclines

Deux gènes conférant la résistance à la tétracycline, *tet(L)* (1/26 ; 3,8%) et *tet(K)* (7/26 ; 26,9%), ont été détectés dans *S. haemolyticus* et *S. caprae*, respectivement.

8.5. Acide fusidique

Deux gènes conférant la résistance à l'acide fusidique ont été détectés, *fusB* (13/26 ; 50%) et *fusC* (12/26; 7,7%), dont 9 isolat appartenant à *S. epidermidis* portaient le gène *fusB*.

8.6. Autres gènes de résistance aux antibiotiques et aux biocides

Les gènes conférant la résistance à la streptogramine (*vat(B)*, *vat(C)* et *vgb(B)*), à la kanamycine/néomycine (*aadD*), à la streptomycine (*str*), ainsi qu'aux composés d'ammonium quaternaire (*qacB*), ont été détectés exclusivement dans les isolats de *S. haemolyticus*, avec une fréquence d'un gène par isolat (1/8 ; 12,5%).

9. Analyse du pangéome

L'analyse du pangéome permet de classifier l'ensemble des gènes (pangéome) des souches appartenant à la même espèce en gènes de base (*core genes*), la combinaison de gènes de base et de gènes de base souples, et en gènes accessoires (*accessory genes*), la combinaison de gènes de coquille et de gènes de nuage.

Un grand nombre de gènes accessoires a été observé, en particulier chez *S. epidermidis* (n=4383, 72,3%), *S. aureus* (n=3997, 67,1%), *S. haemolyticus* (n=3874, 65,9%) et *M. sciuri* (n=3813, 65,7%) (**Figure 8**).

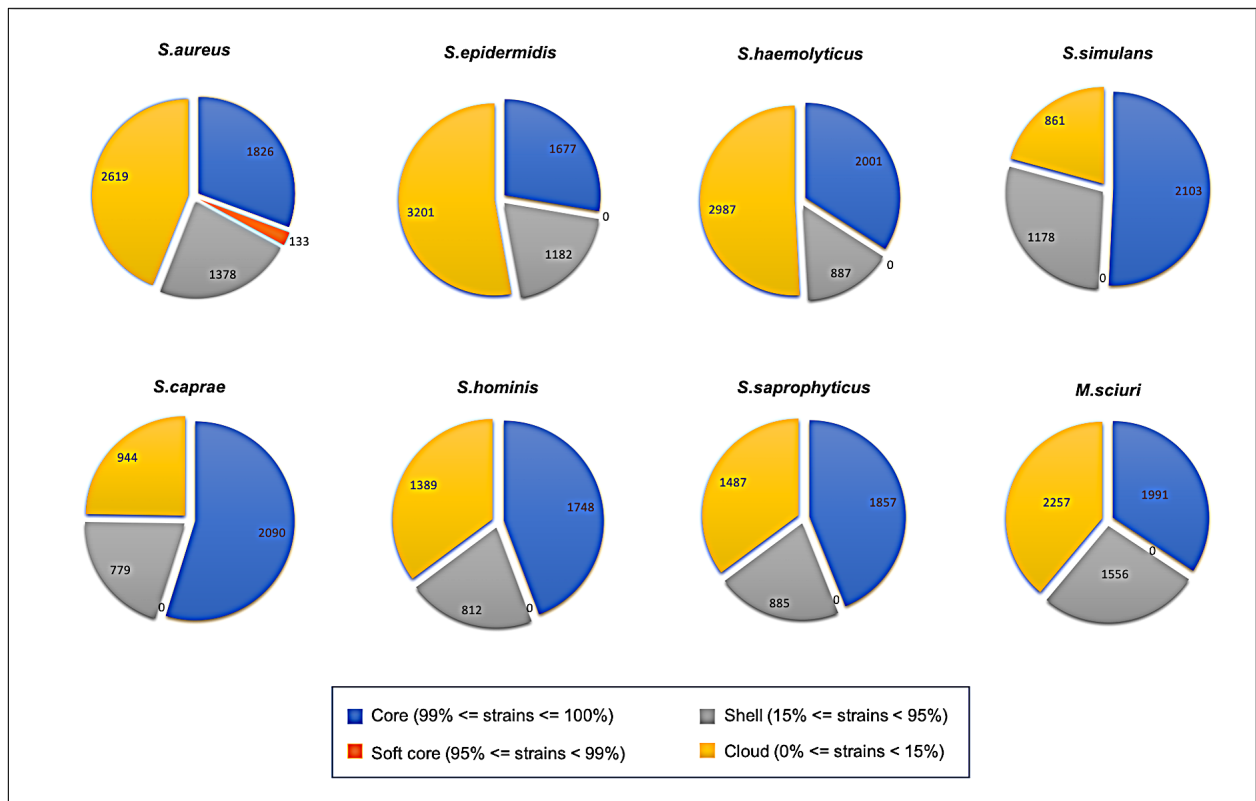


Figure 8: Représentation du pangéome de *Staphylococcus/Mammaliicoccus* spp. Les diagrammes circulaires du pangéome montrent le contenu génique de *Staphylococcus/Mammaliicoccus* spp., déterminé par le logiciel Roary.

9.1. Analyse phylogénétique basée sur le pangéome

L'analyse phylogénétique basée sur le pangéome à l'aide de Roary a permis la construction des arbres phylogénétiques (**Figures 9-11**) regroupant les isolats de *S. aureus* et SCoN/*Mammaliicoccus* spp.

9.1.1. Analyse phylogénétique basée sur le pangéome des *S. aureus*

Les isolats de *S. aureus* ST80 se regroupent en trois sous-groupes distincts (**Figure 9**). Le premier sous-groupe est constitué de dix isolats portant le spa type t044, étroitement liés entre eux. Le deuxième sous-groupe est composé de deux isolats de spa t1247 et un isolat de type t639, qui présentent des liens étroits. Enfin, le troisième sous-groupe comprend trois isolats de type t044, lesquels étaient notablement plus éloignés des souches ST80 provenant d'autres pays.

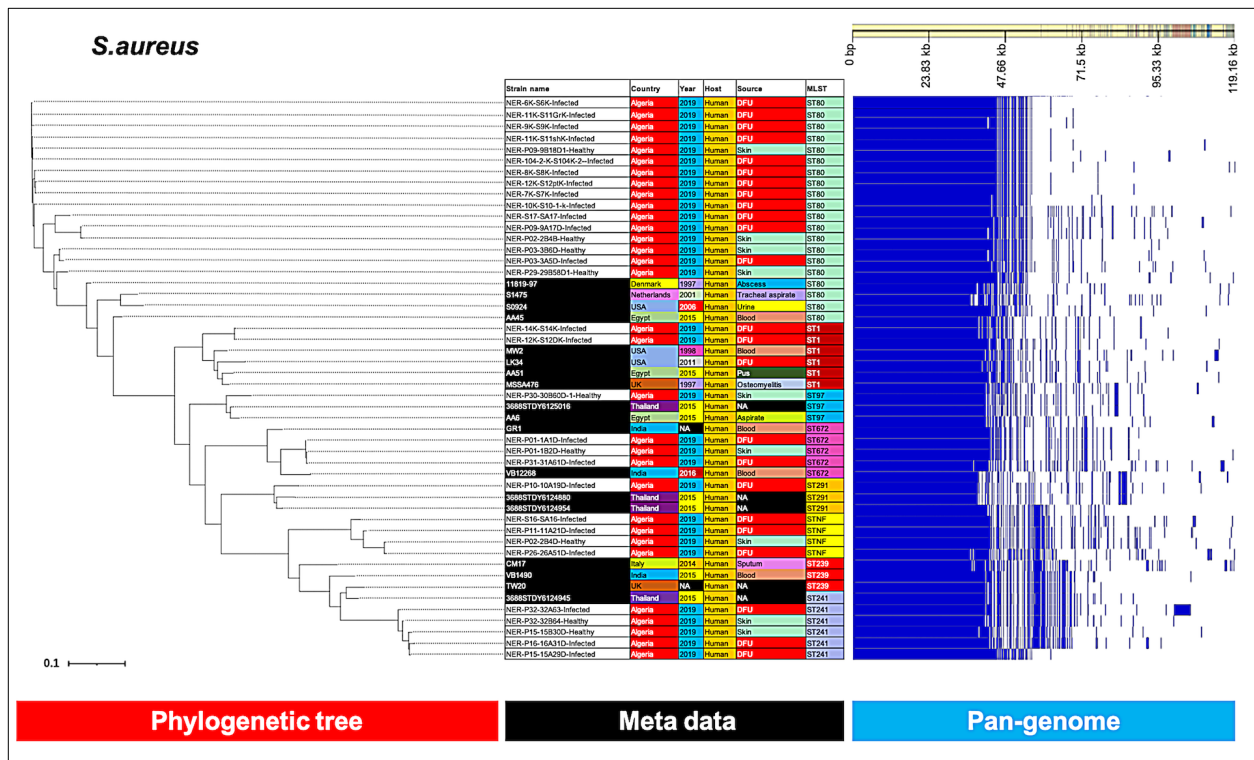


Figure 9: Analyse phylogénétique de *S. aureus* basée sur les pangénomes avec Roary. La heatmap, présentée à droite, illustre la présence et l'absence des gènes de base et accessoires. Les souches de référence sont surlignées en noir dans le nom de la souche.

De manière intéressante, les souches de *S. aureus* appartenant à ST80, ST1, ST672, ST241 et STNF se sont révélées étroitement liées les unes aux autres et plus éloignées des souches de référence.

9.1.2. Analyse phylogénétique basée sur le pangénome des SCoN/*Mammaliicoccus* spp.

L'arbre phylogénétique de *S. epidermidis* a révélé deux clusters principaux (**Figure 10A**). Le premier inclut les isolats de notre étude appartenant à ST54, qui sont distincts des autres souches de référence, tandis que le deuxième regroupe les souches de référence de ST54. De même, les isolats de ST35 de notre étude forment un groupe distinct, tout en étant séparés des souches de ST35 provenant d'autres pays.

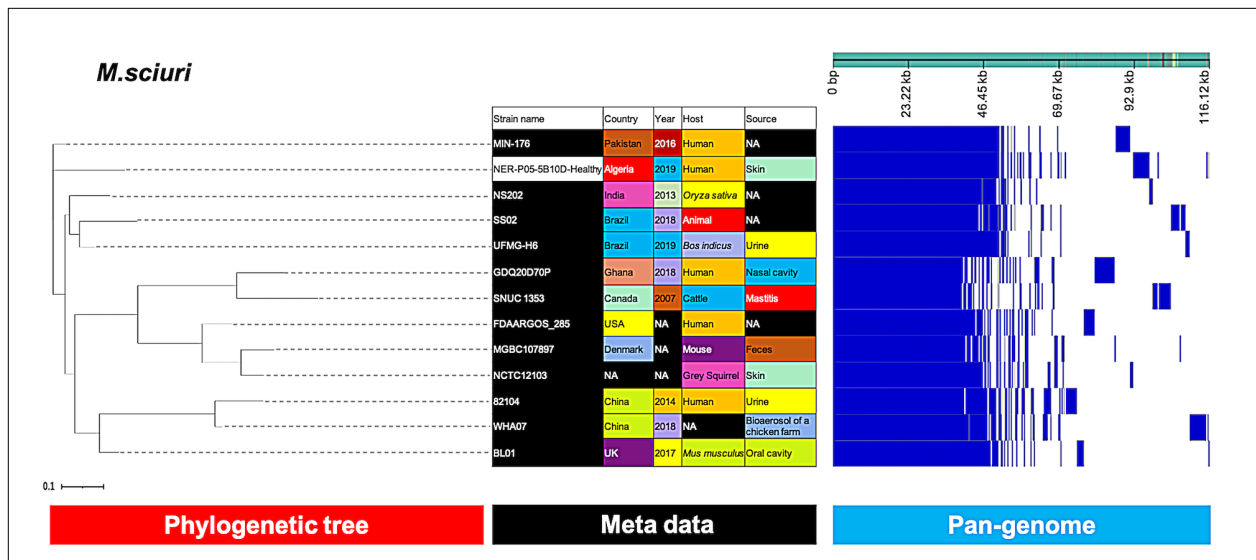


Figure 11: Analyse phylogénétique de *M. sciuri* basée sur les pangénomes avec Roary. La heatmap, présentée à droite, illustre la présence et l'absence des gènes de base et accessoires. Les souches de référence sont surlignées en noir dans le nom de la souche.

Les isolats de *S. saprophyticus* et *S. hominis* sont regroupés avec les isolats cliniques d'Inde et des Pays-Bas, respectivement (**Figures 10E et F**). Cependant, notre unique isolat de *M. sciuri* forme un groupe externe distinct du reste des souches de référence (**Figure 11**).

10. Caractérisation du microbiote des IPD et de la PSPC par séquençage métagénomique shotgun

L'objectif de cette partie de notre étude était de caractériser la composition du microbiote présent dans les IPD et sur la PSPC.

Trente-deux patients diabétiques ont été inclus dans cette étude. Les échantillons ont été prélevés des IPD et de la PSPC du même patient. Le microbiote a été profilé par séquençage métagénomique « shotgun ».

Un total de 327 606 662 de lectures de séquences brutes (*raw sequence reads*) (médiane : 2 239 643 % ; EI : 233 530 % – 7 600 495,5 %) a été obtenu à partir de 64 échantillons (32 provenant des IPD et 32 de la PSPC). Le nombre de lectures de séquences brutes était plus élevé dans les échantillons des IPD (médiane : 7 589 587 % ; EI : 5 041 074,5 % – 15 062 956 %) que dans ceux des PSPC (médiane : 237 874 % ; EI : 108 856,5 % – 556 493,5 %) (**Figure 12A et C**).

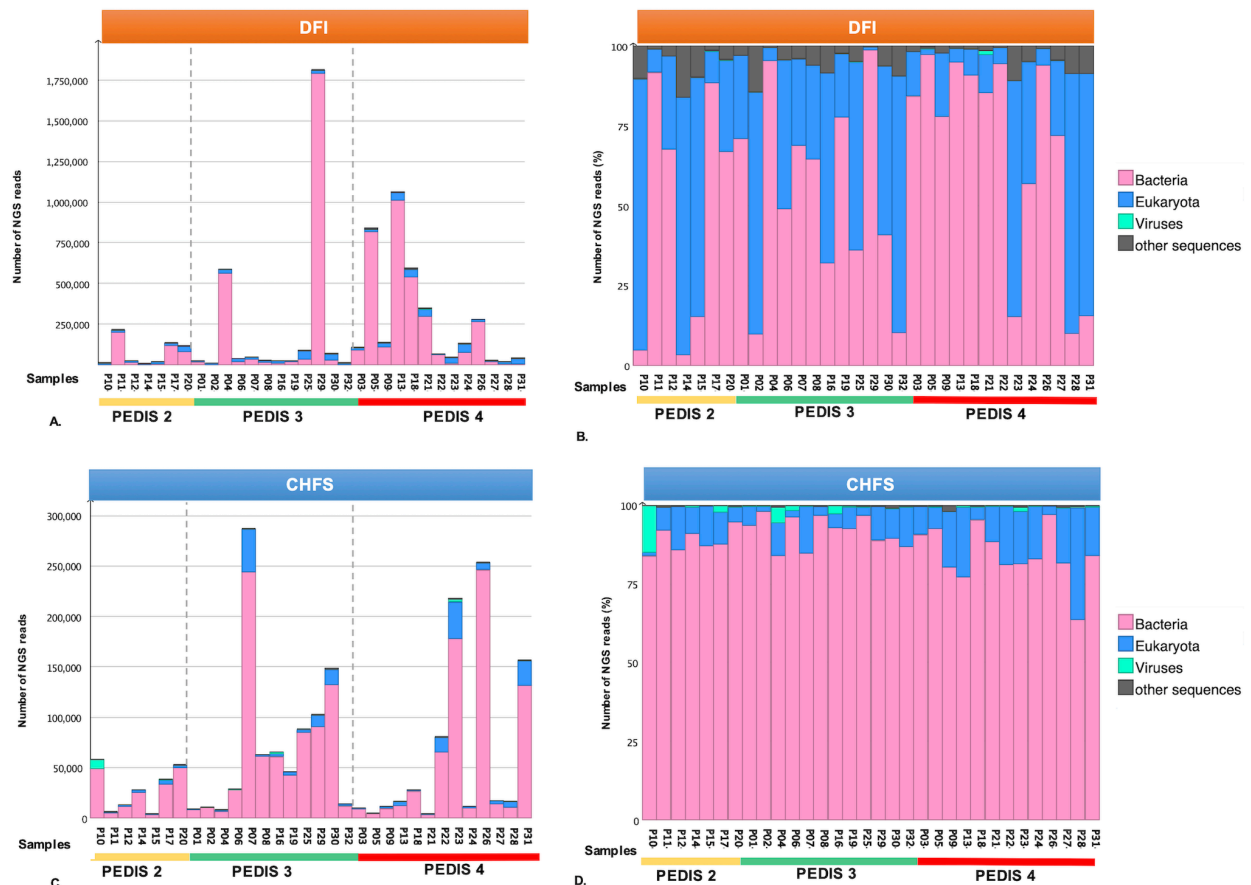


Figure 12: Analyse des lectures de séquences (NGS reads) issus du séquençage métagénomique shotgun. **A et C** : Nombre total de lectures de séquences attribuées aux Bactéries, les Eucaryotes et Virus dans les IPD (DFI) et la PSPC (CHFS). **B et D** : Abondance relative des lectures de séquences dans ces deux groupes.

La comparaison de l'abondance relative entre les deux groupes a révélé que l'ADN eucaryotique avait une abondance relative plus élevée dans les échantillons des IPD par rapport à ceux de la PSPC. De manière notable, la distribution de l'ADN bactérien était élevée et homogène dans tous les échantillons de la PSPC, tandis qu'elle était plus hétérogène dans les échantillons des IPD (**Figure 12B et D**).

10.1. Analyse de la diversité bactérienne des IPD en comparaison avec la PSPC

10.1.1. Diversité alpha

Afin d'évaluer la diversité alpha des échantillons, l'indice de diversité Shannon-Weaver H' a été calculé au niveau du genre bactérien. Une diminution significative de la diversité bactérienne a été observée dans les échantillons des IPD par rapport à ceux de la PSPC. Les valeurs de l'indice Shannon-Weaver H' pour la PSPC (médiane : 5,05 % ; EI : 4,87 %-5,25 %) étaient significativement plus élevées que celles des IPD (médiane : 4,20 % ; EI : 3,80 %-4,67 %) (valeur $p < 0,001$; **Figure 13**).

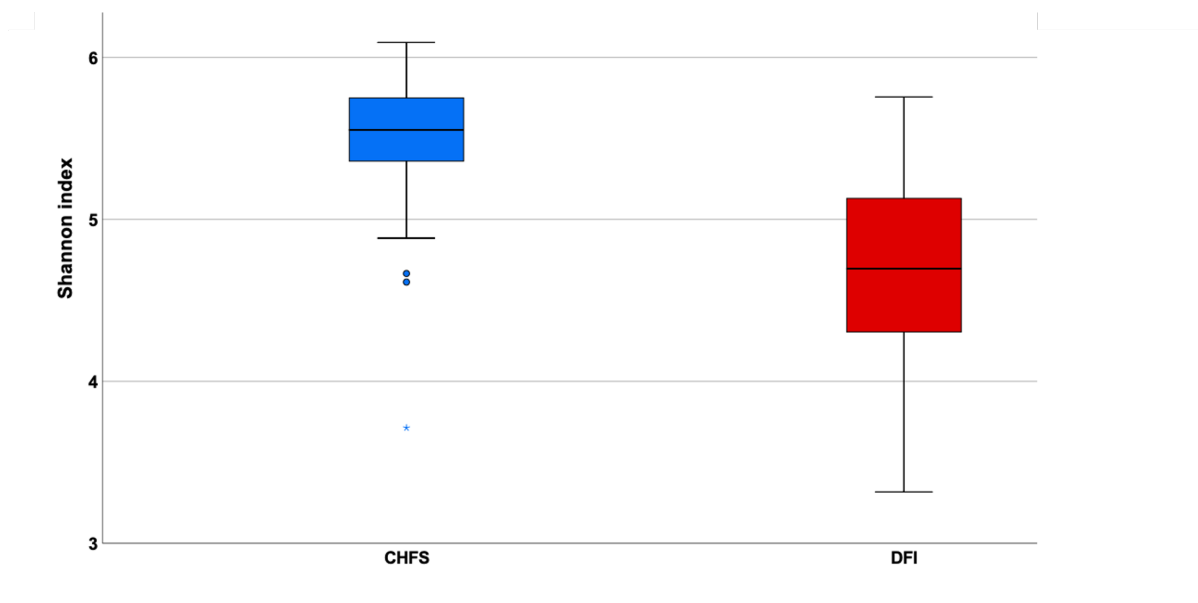


Figure 13: Analyse de la diversité alpha utilisant l'indice de diversité de Shannon-Weaver H' des échantillons de la PSPC et d'IPD au niveau du genre bactérien. La barre au centre des boîtes représente la médiane, tandis que les bords supérieur et inférieur de la boîte correspondent respectivement au premier et au troisième quartiles.

La comparaison entre les IPD et la PSpC pour chaque grade PEDIS (**Figure 14**) a révélé que les valeurs de l'indice de diversité H' de la PSpC (médiane : 5,06 % ; EI : 4,79 %-5,23 %) étaient significativement plus élevées que celles des IPD (médiane : 4,20 % ; EI : 3,98 %-4,66 %) dans le grade PEDIS 3 (valeur $p = 0,006$).

De même, pour le grade PEDIS 4, la PSpC présentait des valeurs de H' significativement supérieures (médiane : 5,01 % ; EI : 4,92 %-5,31 %) comparées à celles des IPD (médiane : 4,08 % ; EI : 3,73 %-4,69 %) (valeur $p = 0,001$).

En revanche, aucune différence significative n'a été observée entre les échantillons de PSpC (médiane : 5,12 % ; EI : 4,38 %-5,44 %) et ceux des IPD (médiane : 4,39 % ; EI : 3,80 %-4,70 %) pour le grade PEDIS 2 (valeur $p = 0,237$).

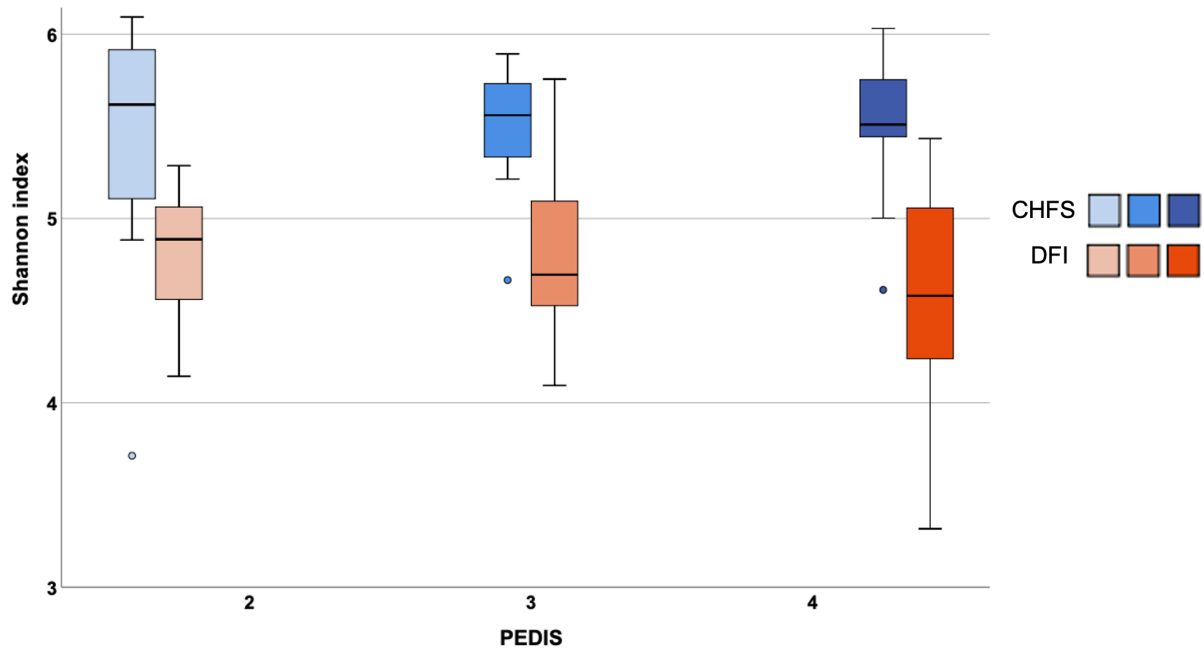


Figure 14: Analyse de la diversité alpha utilisant l'indice de diversité de Shannon-Weaver H' des échantillons de la PSpC et d'IPD selon la classification PEDIS. La barre au centre des boîtes représente la médiane, tandis que les bords supérieur et inférieur de la boîte correspondent respectivement au premier et au troisième quartiles.

10.1.2. Diversité beta

La diversité beta des PSPC et des IPD a été évaluée à l'aide des analyses PCoA et Neighbor-Net, basées respectivement sur la distance de Bray-Curtis et l'indice de Goodall.

a. Analyse PCoA

L'analyse PCoA a révélé que les groupes PSPC et IPD étaient distincts (Figure 15). Les échantillons de PSPC se sont regroupés de manière homogène, indiquant une grande similarité entre eux.

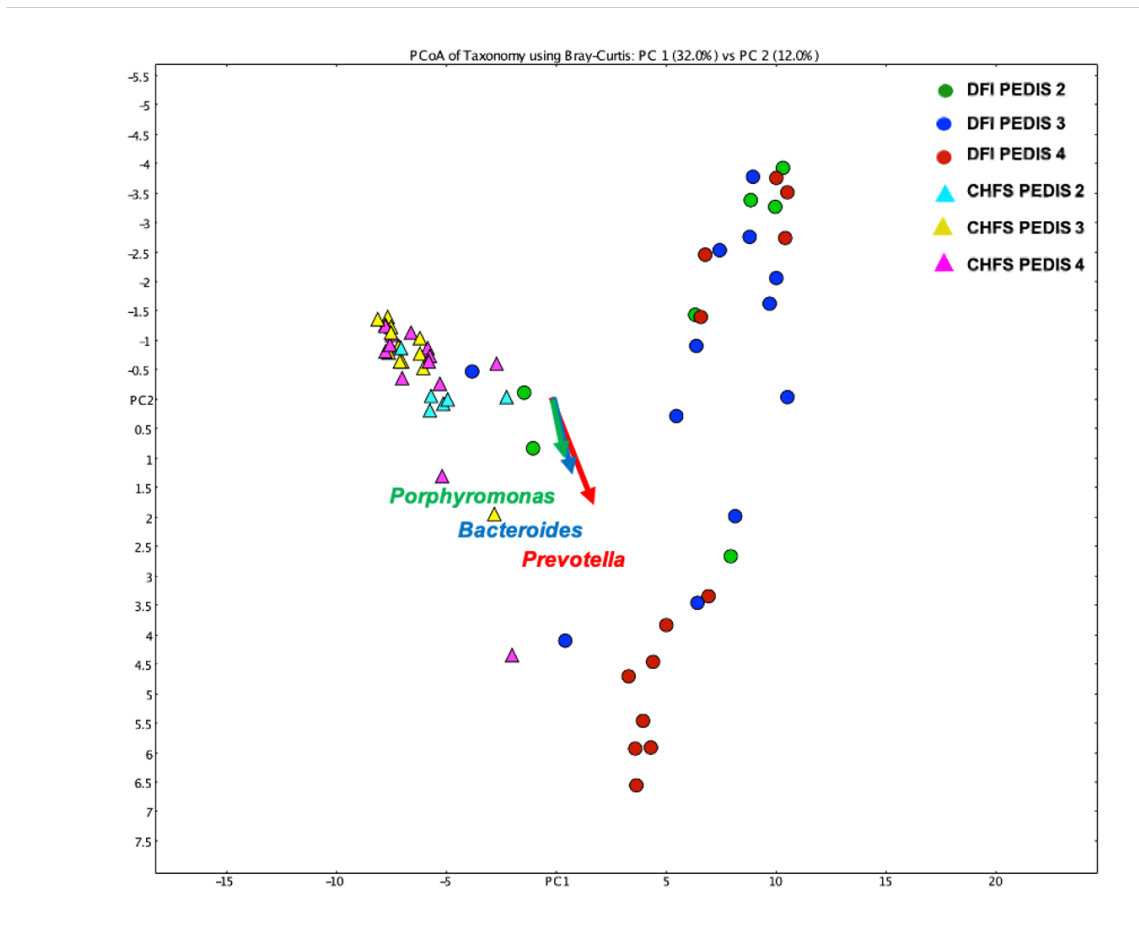


Figure 15: Analyse de la diversité beta des IPD (DFI) et de la PSPC (CHFS) par PCoA, basée sur les distances de dissimilarité de Bray–Curtis, montrant *Prevotella*, *Bacteroides* et *Porphyromonas* comme principaux contributeurs au regroupement.

En revanche, les échantillons IPD étaient plus diversifiés et se répartissaient en deux groupes distincts, avec les genres *Porphyromonas*, *Bacteroides* et *Prevotella* identifiés comme des contributeurs majeurs à cette séparation. Les vecteurs correspondant à ces genres principaux indiquent la direction d'un gradient croissant de leur abondance dans les échantillons IPD.

b. Analyse Neighbor-Net

L'analyse Neighbor-Net des IPD et de la PSCP a révélé une distinction marquée entre les deux groupes. De plus, les échantillons IPD se regroupent plus étroitement, tandis que les échantillons de la PSCP sont nettement plus dispersés (**Figure 16**).

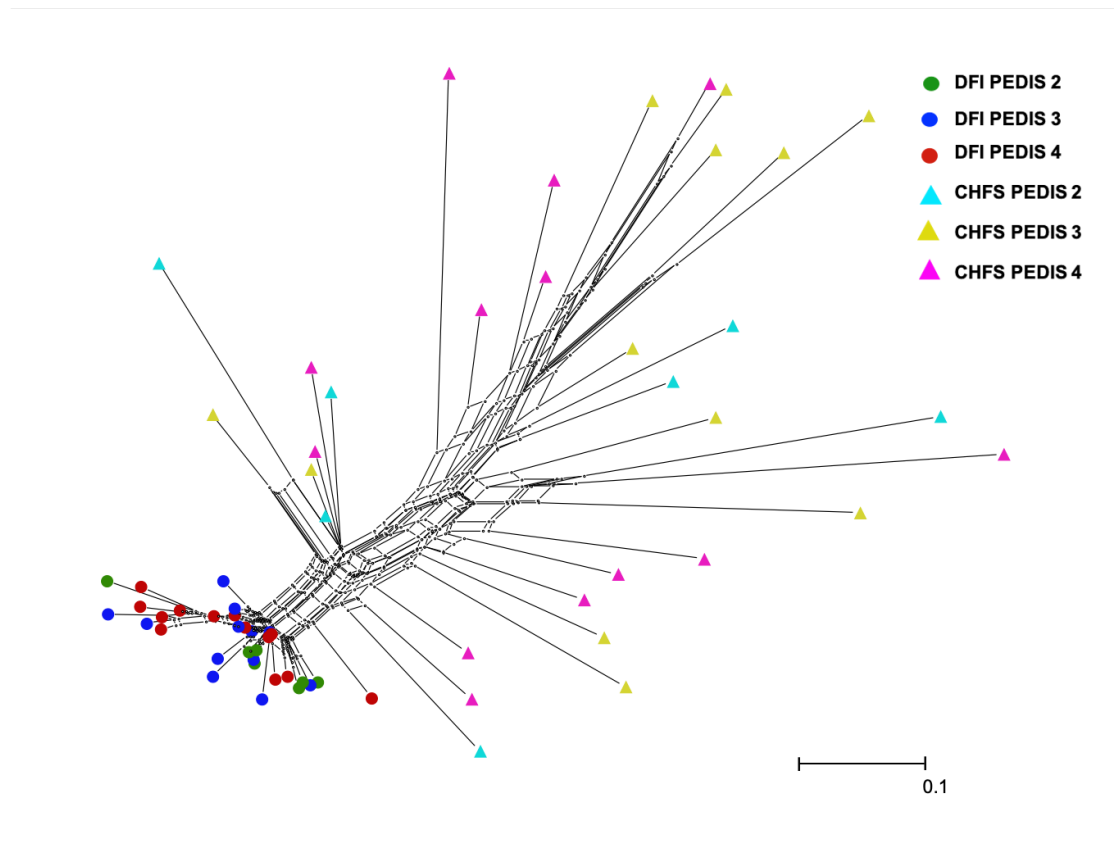


Figure 16: Analyse de la diversité beta des IPD (DFI) et de la PSCP (CHFS) par Neighbor Net, basée sur l'indice de similarité de Goodall.

10.2. Comparaison de la composition des microbiotes des IPD et de la PSPC

La composition des communautés bactériennes les plus abondantes dans les groupes PSPC et IPD a été comparée en se basant sur les abondances relatives au niveau du phylum et du genre.

10.2.1. Comparaison de la composition des microbiotes au niveau du phylum

Les phyla bactériens les plus abondants dans le groupe PSPC étaient *Actinobacteria* (médiane, 42,5 % ; EI, 30,25 %–51 %), suivis de *Proteobacteria* (médiane, 33 % ; EI, 22,5 %–41,75 %), *Firmicutes* (médiane, 15,5 % ; EI, 10,5 %–25 %) et *Bacteroidetes* (médiane, 2 % ; EI, 0,93 %–4,75 %).

Cependant, seul le phylum *Actinobacteria* était significativement plus abondant dans le groupe PSPC que dans le groupe IPD (p -value < 0,001) (**Figures 17A et C**).

En revanche, le groupe IPD était dominé par *Proteobacteria* (médiane, 21 % ; EI, 8,25 %–69,5 %), *Bacteroidetes* (médiane, 14 % ; EI, 0,60 %–68 %), *Firmicutes* (médiane, 9,5 % ; EI, 6,25 %–25,25 %) et *Actinobacteria* (médiane, 6,5 % ; EI, 0,78 %–17,75 %), parmi lesquels, seul *Bacteroidetes* était significativement plus abondant dans le groupe IPD que dans le groupe PSPC (p -value < 0,001) (**Figure 17B et C**).

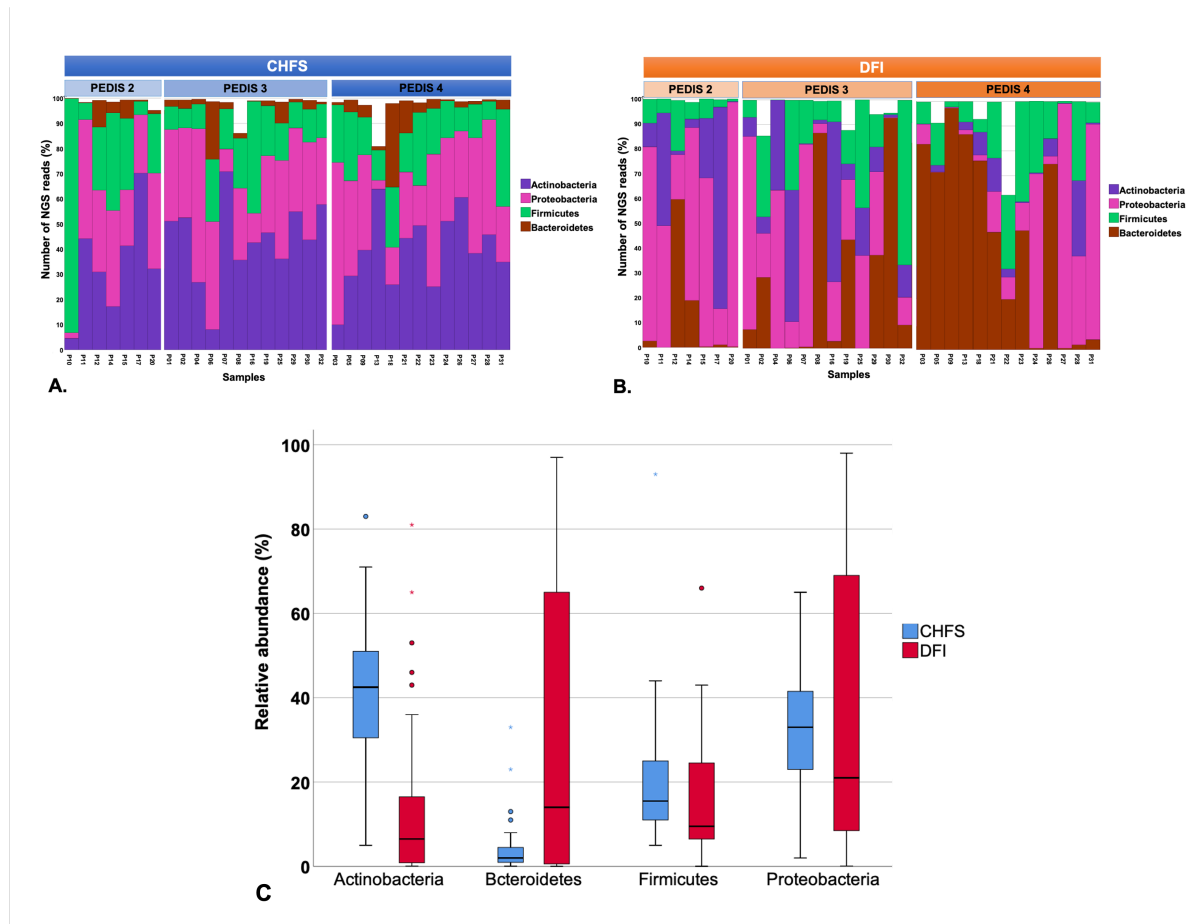


Figure 17: Représentation de l’abondance relative des phyla bactériens les plus abondants dans les groupes PSPC (A et C) et IPD (B et C), basée sur le nombre de lectures de séquences. La barre au centre des boîtes représente la médiane, tandis que les bords supérieur et inférieur de la boîte correspondent respectivement au premier et au troisième quartiles.

10.2.2. Comparaison de la composition des microbiotes au niveau du genre

Au niveau du genre, *Corynebacterium* était le plus abondant (médiane, 17,49 % ; EI, 7,63 %–31,88 %) dans le groupe PSPC, suivi de *Staphylococcus* (médiane, 9,11 % ; EI, 5,71 %–12,5 %), *Pseudomonas* (médiane, 4,81 % ; EI, 2,31 %–10,97 %), *Cutibacterium* (médiane, 4,27 % ; EI, 1,48 %–9,61 %), *Acinetobacter* (médiane, 3,62 % ; EI, 1,95 %–7,22 %) et *Streptococcus* (médiane, 1,37 % ; EI, 0,74 %–3,05 %) (Figures 18A et C).

À l'exception de *Streptococcus*, les abondances des genres mentionnés étaient significativement plus élevées dans le groupe IPD (p -value < 0,001).

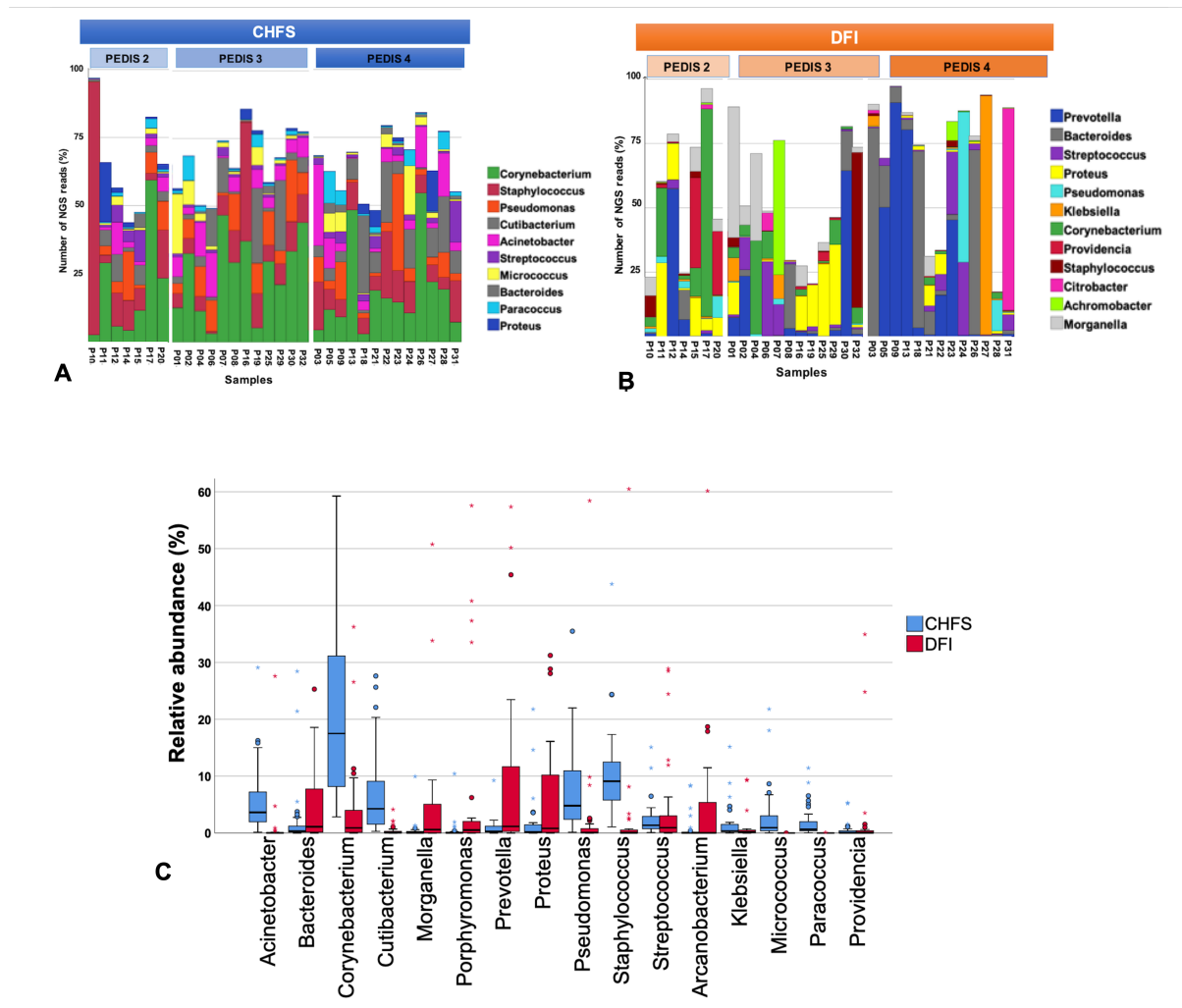


Figure 18: Représentation de l'abondance relative des genres bactériens les plus abondants dans les groupes PSPC (A et C) et IPD (B et C), basée sur le nombre de lectures de séquences. La barre au centre des boîtes représente la médiane, tandis que les bords supérieur et inférieur de la boîte correspondent respectivement au premier et au troisième quartiles.

Concernant le groupe IPD, il était dominé par *Prevotella* (médiane, 1,16 % ; EI, 0,22 %–13,86 %), *Bacteroides* (médiane, 1,11 % ; EI, 0,12 %–8,50 %), *Streptococcus* (médiane, 0,93 % ; EI, 0,1 %–3,04 %), *Corynebacterium* (médiane, 0,9 % ; EI, 0,11 %–4,04 %), *Proteus* (médiane, 0,82 % ; EI, 0,10 %–11,38 %), *Morganella* (médiane, 0,59 % ; EI, 0,01 %–5,26 %) et *Porphyromonas* (médiane, 0,53 % ; EI, 0,04 %–2,08 %) (**Figures B et C**), avec des différences significatives observées pour *Prevotella*, *Morganella* et *Porphyromonas* (p -value < 0,001 pour chacun), *Bacteroides* (p -value = 0,01) et *Proteus* (p -value = 0,013).

10.3. Comparaison de la composition des microbiotes des IPD et de la PSPC selon les grades PEDIS

10.3.1. Comparaison de la composition des microbiotes des IPD et de la PSPC selon les grades PEDIS au niveau du phylum

Dans le groupe IPD, le phylum Proteobacteria était le plus abondant dans les grades PEDIS 2 (médiane : 68 % ; EI : 18 %-78 %) et PEDIS 3 (médiane : 24 % ; EI : 11 %-56,5 %). En revanche, le grade PEDIS 4 était dominé par Bacteroidetes (médiane : 48 % ; EI : 3 %-79,5 %) (Figures 19).

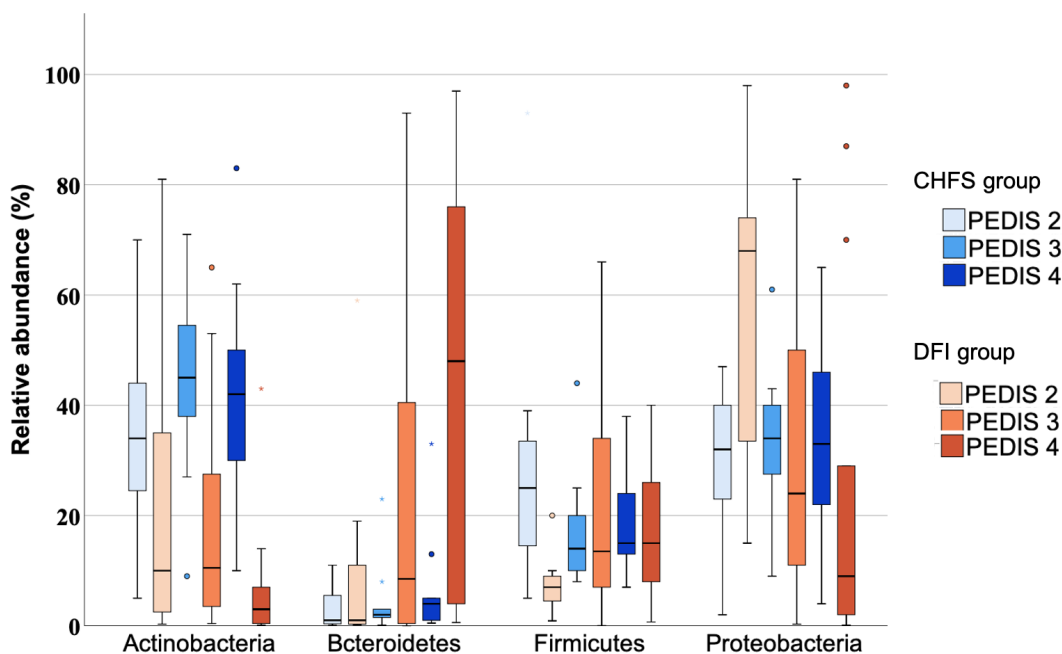


Figure 19: Représentation de l’abondance relative des phylums bactériens les plus abondants selon les grades de sévérité PEDIS dans les groupes PSPC et IPD. La barre centrale des boîtes indique la médiane, tandis que les limites supérieure et inférieure de la la boîte correspondent respectivement au troisième et au premier quartiles.

De manière notable, une augmentation progressive de l'abondance relative des Bacteroidetes a été observée avec la sévérité de l'infection dans le groupe IPD : PEDIS 2 (médiane : 1 % ; EI : 0 %–19 %), PEDIS 3 (médiane : 8,5 % ; EI : 0 %–42,25 %) et PEDIS 4 (médiane : 48 % ; EI : 3 %–79,5 %). Une tendance similaire a été constatée pour les Firmicutes : PEDIS 2 (médiane : 7 % ; EI : 3 %–10 %), PEDIS 3 (médiane : 13,5 % ; EI : 7 %–35 %) et PEDIS 4 (médiane : 15 % ; EI : 6,5 %–27,5 %).

Une tendance inverse a été observée pour Proteobacteria, dont l'abondance relative a diminué avec la progression des grades PEDIS dans le groupe IPD : PEDIS 2 (médiane : 68 % ; EI : 18 %–78 %), PEDIS 3 (médiane : 24 % ; EI : 11 %–56,5 %) et PEDIS 4 (médiane : 9 % ; EI : 2 %–49,5 %). Une diminution similaire a été constatée pour Actinobacteria : PEDIS 2 (médiane : 10 % ; EI : 2 %–46 %), PEDIS 3 (médiane : 10,5 % ; EI : 2,25 %–31,75 %) et PEDIS 4 (médiane : 3 % ; EI : 0 %–8 %).

Cependant, bien que ces variations d'abondance relative des phyla aient été observées entre les différents grades PEDIS dans le groupe IPD, elles ne présentaient pas de différence statistiquement significative (p -value > 0,05).

Dans le groupe PSPC, les trois grades PEDIS étaient dominés par les phylums Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes et Bacteroidetes (**Figures 26**), sans différence statistiquement significative entre les grades (p -value > 0,05).

10.3.2. Comparaison de la composition des microbiotes des IPD et de la PSPC selon les grades PEDIS au niveau du genre

Dans le groupe IPD, le grade PEDIS 2 était dominé par *Proteus* (médiane : 7,14 % ; EI : 0 %–14,77 %), *Morganella* (médiane : 4,67 % ; EI : 0 %–7,19 %) et *Corynebacterium* (médiane : 3,67 % ; EI : 0 %–26,55 %). Dans PEDIS 3, *Morganella* (médiane : 7,27 % ; EI : 0 %–33,83 %), *Corynebacterium* (médiane : 3,88 % ; EI : 0 %–10,49 %) et *Prevotella* (médiane : 1,75 % ; EI : 0 %–7,28 %) étaient les genres les plus abondants. Pour le grade PEDIS 4, l'abondance la plus élevée était observée pour *Prevotella* (médiane : 16,05 % ; EI : 0 %–80,41 %), *Bacteroides* (médiane : 9,26 % ; EI : 3,89 %–68,9 %) et *Porphyromonas* (médiane : 2,1 % ; EI : 0 %–2,63 %).

Une tendance décroissante a été notée pour l'abondance relative de *Corynebacterium*, *Proteus* et *Morganella* avec l'augmentation des grades PEDIS. Par ailleurs, les genres tels que *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Cutibacterium*, *Acinetobacter*, *Streptococcus* et *Micrococcus* devenaient pratiquement absents dans les grades PEDIS 3 et 4 (Figure 20).

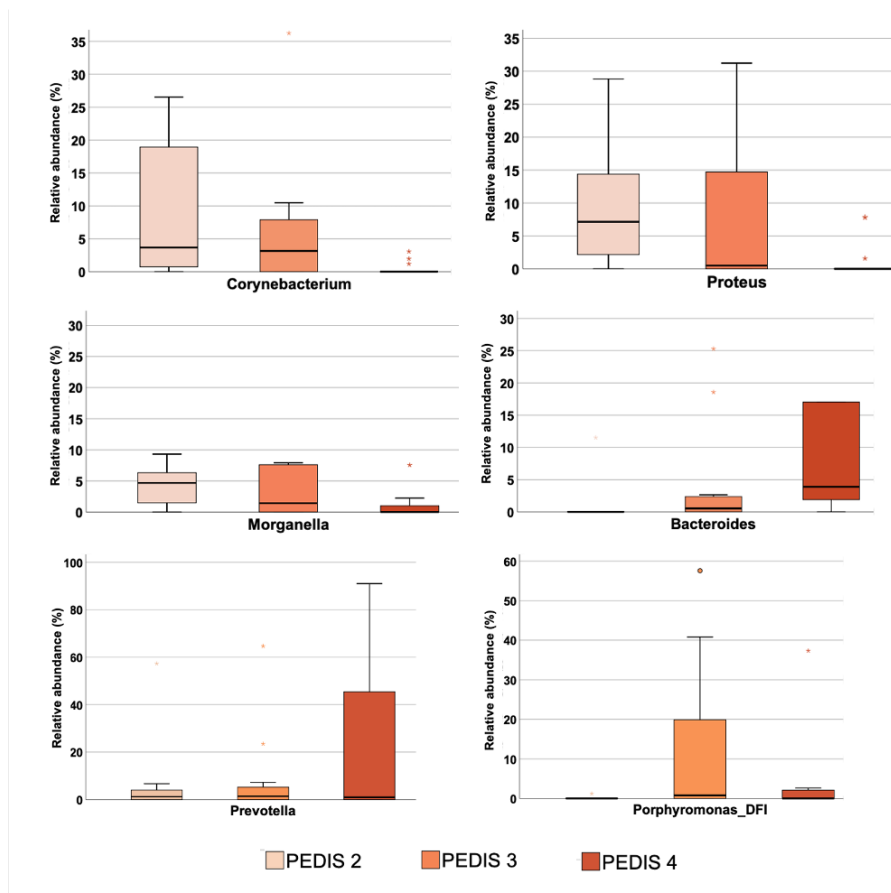


Figure 20: Représentation de l'abondance relative des genres bactériens les plus abondants selon les grades de sévérité PEDIS dans les groupes PSPC et IPD. La barre centrale des boîtes indique la médiane, tandis que les limites supérieure et inférieure de la boîte correspondent respectivement au troisième et au premier quartiles.

À l'inverse, l'abondance relative de *Prevotella* et *Bacteroides* augmentait en parallèle avec la sévérité des grades PEDIS, avec une augmentation significative observée uniquement pour *Bacteroides* (p -value = 0,018) entre les trois grades dans le groupe IPD.

Cependant, dans le groupe IPD, seuls *Corynebacterium* (p -value = 0,015), *Bacteroides* (p -value = 0,018) et *Providencia* (p -value = 0,037) présentaient des variations statistiquement significatives entre les trois grades PEDIS au sein du groupe IPD.

Dans le groupe PSpC, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Cutibacterium* et *Acinetobacter* sont les genres dominants dans les trois grades PEDIS, sans différence statistiquement significative entre ces grades (p -value > 0,05).

10.3.3. Comparaison de la composition des microbiotes des IPD et de la PSpC au sein de chaque grade PEDIS

Les comparaisons entre les groupes IPD et PSpC pour chaque grade PEDIS ont révélé des différences significatives au niveau des phyla, notamment pour les Actinobacteria dans PEDIS 3 et 4 (p -values : PEDIS 3 = 0,041, PEDIS 4 = 0,001), les Firmicutes dans PEDIS 2 (p -value = 0,018) et les Bacteroidetes en PEDIS 4 (p -value = 0,004, **Figure 19 et 20**).

Au niveau des genres, des différences significatives ont été observées pour *Staphylococcus* dans les trois grades PEDIS (p -values : PEDIS 2 = 0,018, PEDIS 3 = 0,034, PEDIS 4 = 0,001), *Proteus* dans PEDIS 2 et 3 (p -values : PEDIS 2 = 0,046, PEDIS 3 = 0,028), *Acinetobacter* dans PEDIS 2 et 4 (p -values : PEDIS 2 = 0,028, PEDIS 4 = 0,002), *Paracoccus* dans PEDIS 3 et 4 (p -values : PEDIS 3 = 0,043, PEDIS 4 = 0,028) et *Morganella* dans PEDIS 2 (p -value = 0,043).

Par ailleurs, les différences significatives étaient plus marquées dans PEDIS 3 et 4, en particulier pour les genres *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Cutibacterium* et *Acinetobacter* (p -value < 0,05). Toutefois, une différence significative a été observée uniquement dans PEDIS 4 pour *Bacteroides* (p -value = 0,008).

Discussion

Ce projet de thèse est divisé en deux parties. La première partie porte sur l'isolement et le séquençage des génomes complets des *Staphylococcus* et *Mammaliicoccus* spp. isolés à partir des IPD et de la PSPC, afin d'établir la clonalité des isolats et de caractériser leurs répertoires en termes de facteurs de virulence et de résistance aux antibiotiques. La deuxième partie vise à déterminer la composition bactérienne du microbiote dans les IPD, en comparaison avec la PSPC par séquençage métagénomique shotgun.

1. Séquençage des génomes entiers des isolats de *Staphylococcus/Mammaliicoccus* spp.

Dans cette partie de l'étude, nous avons séquencé les génomes complets de 58 isolats de *Staphylococcus* et *Mammaliicoccus* spp. isolés à partir des IPD et de la PSPC, dont 32 (55,2 %) *S. aureus*, 10 (17,2 %) *S. epidermidis*, 8 (13,8 %) *S. haemolyticus*, 3 (5,2 %) *S. simulans*, 2 (3,5 %) *S. caprae* et 1 (1,7 %) chacun de *S. hominis*, *S. saprophyticus* et *M. sciuri*.

Comme dans plusieurs autres études, nous avons également constaté que *S. aureus* était le pathogène prédominant dans les IPD (Dang *et al.*, 2003 ; Dunyach-Remy *et al.*, 2016 ; Macdonald *et al.*, 2021 ; Makeri *et al.*, 2023 ; Mutonga *et al.*, 2019 ; Tentolouris *et al.*, 2006). Cela est cohérent avec la capacité marquée de *S. aureus* à infecter les tissus mous et à provoquer l'ostéomyélite, une complication fréquente des IPD (Urish et Cassat, 2020).

Par contre, les espèces appartenant aux SCoN ont été principalement isolées de la PSPC. En effet, en tant que composants naturels de la flore cutanée humaine, les SCoN jouent un rôle important dans le maintien de l'équilibre de la peau et la prévention de certaines maladies (Becker *et al.*, 2014 ; Mutonga *et al.*, 2019).

Cependant, certaines espèces de SCoN ont été retrouvées en association avec *S. aureus* dans les IPD, tandis que d'autres, telles que *S. caprae* et *S. saprophyticus*, ont été isolées exclusivement des IPD, suggérant que les SCoN pourraient également contribuer à l'étiologie de ces infections (Eltwisy *et al.*, 2020 ; Natsis et Cohen, 2018 ; Nguyen *et al.*, 2020).

Parmi les *S. aureus* isolés dans cette étude, la majorité (27/32 ; 84,4 %) étaient des SARM, dont la plupart provenaient des IPD (18/27 ; 66,7 %), confirmant les résultats d'études antérieures ayant rapporté une prévalence élevée de SARM dans les IPD (Alizargar *et al.*, 2013 ; Jouhar *et al.*, 2020 ; Stacey *et al.*, 2019 ; Zhou *et al.*, 2024).

Cependant, nos résultats contrastent avec ceux d'une étude menée aux États-Unis, qui a rapporté une faible prévalence de SARM (6 %) dans les IPD (Kim *et al.*, 2020). De même, une étude rétrospective réalisée en Écosse (Royaume-Uni) auprès de 73 patients a signalé l'absence de SARM dans les IPD (Macdonald *et al.*, 2020).

Selon plusieurs études, la présence des SARM dans les IPD est associée à un retard de cicatrisation, à la persistance de l'ulcère ainsi qu'à un risque élevé d'amputation (Cervantes-García *et al.*, 2015 ; Kananizadeh *et al.*, 2019 ; Silva *et al.*, 2020). En revanche, d'autres travaux ont rapporté que l'IPD dues aux SARM n'affecterait pas significativement le développement de la chronicité des UPD (Nather *et al.*, 2008 ; Richard *et al.*, 2008).

Les isolats de *S. aureus* détectés dans les IPD et la PSPC de cinq patients (P1, P3, P9, P15 et P32) appartenaient aux mêmes clones de SARM et présentaient un génotype similaire. De même, les isolats de *S. epidermidis* appartenant au même clone ont été isolés des deux sites de prélèvement chez deux patients (P4 et P6). Ces résultats confirment ceux d'une étude menée par McManus *et al.* (2020), qui ont constaté que des isolats de *S. aureus* et de *S. epidermidis* récupérés à partir de quatre sites anatomiques distincts (cavité oro-nasale, poches parodontales, peau et ulcère) chez des patients atteints de diabète de type 2 étaient fortement apparentés chez un même individu.

De plus, nos observations sont cohérentes avec plusieurs autres études ayant démontré que la majorité des infections à *S. aureus* sont d'origine endogène, c'est-à-dire que la souche colonisante et la souche infectante partagent le même génotype (Bode *et al.*, 2010 ; Dunyach-Remy *et al.*, 2017 ; Haleem *et al.*, 2014 ; Taki *et al.*, 2023 ; van Belkum *et al.*, 2009 ; von Eiff *et al.*, 2001 ; Wertheim *et al.*, 2004). Sur la base de ces résultats, il est donc plausible que la contamination des IPD soit due à des souches endogènes de *Staphylococcus spp.*

Toutefois, des isolats de *S. aureus* appartenant à deux clones distincts de SARM ont été détectés dans la PSCP du patient P2. Cette observation suggère une diversité au sein des populations de *Staphylococcus* spp. présentes sur la peau.

Plusieurs facteurs de risque peuvent augmenter le taux de colonisation ou d'infection par les SARM chez les patients diabétiques. Dans une étude prospective l'insulinothérapie a été associée statistiquement à la colonisation par les SARM. Cette association pourrait s'expliquer par le recours aux injections, pouvant constituer une porte d'entrée pour les bactéries. D'autres facteurs de risque ont également été identifiés dans cette étude, notamment la présence de maladies du tissu conjonctif (Kutlu *et al.*, 2012).

D'autres études ont également suggéré que le portage nasal de SARM constitue un facteur de risque d'IPD causées par ces bactéries (Lin *et al.*, 2020 ; Taha, 2013 ; Taki *et al.*, 2023). Par ailleurs, Teixeira *et al.* (2021) ont rapporté que les ulcères des membres inférieurs et le sexe masculin étaient respectivement des facteurs de risque de colonisation par *S. aureus* et par les SARM.

Les SARM isolés dans la présente étude portaient soit le *SCCmec* de type IV (19/27 ; 70,4 %), soit le type III (8/27 ; 29,6 %), associés respectivement aux infections communautaires et nosocomiales (Alioua *et al.*, 2014 ; Vandenesch *et al.*, 2003). La prédominance du *SCCmec* IV parmi les SARM est conforme aux résultats d'une étude brésilienne portant sur la prévalence du portage nasal et oropharyngé chez des individus diabétiques (Teixeira *et al.*, 2021).

Cette étude a révélé que le clone de SARM dominant était ST80-IVc(2B) (16/27 ; 59,3%) dont 13/27 (48,1%) isolats présentaient les caractéristiques du clone européen (ST80-t044-IVc(2B) (Rolo *et al.*, 2012). Il était suivi du clone brésilien (ST241-t037- III(3A) (5/27 ; 18,5%) (Oliveira *et al.*, 2001), ainsi que des clones ST672- t3841- IVd(2B) et STNF- t037- III(3A) (pour chaque clone 3/27 ; 11,1%).

La prédominance du clone ST80-IVc(2B) positif au *PVL* est cohérente avec les conclusions d'autres études menées dans les établissements de santé en Algérie et dans d'autres pays (Al-Bakri *et al.*, 2021 ; Antri *et al.*, 2011 ; Bekkhoucha *et al.*, 2009 ; Ben Nejma *et al.*, 2013 ; Udo *et al.*, 2008 ; Udo et Sarkhoo, 2010).

À l'inverse, plusieurs études antérieures ont signalé une faible prévalence du gène *PVL* parmi les isolats de *S. aureus* dans les IPD (Stappers *et al.*, 2015 ; Viquez-Molina *et al.*, 2018), contredisant ainsi nos résultats. Le succès évolutif des SARM dans les infections cutanées et des tissus mous a principalement été attribué à la présence du gène *PVL* (Monecke *et al.*, 2011).

Tous les isolats appartenant au ST80- IVc(2B) étaient porteurs de *PVL* et *edinB*, qui constituent des marqueurs génétiques stables pour l'identification des CA-SARM (David et Daum, 2010 ; Paul *et al.*, 2014 ; Vandenesch *et al.*, 2003). Cela suggère fortement l'origine communautaire de ce clone.

De plus, les gènes *edin* étaient signalé comme des marqueurs moléculaires associés aux mauvais résultats de cicatrisation chez les patients atteints d'IPD, capables de différencier la colonisation de l'infection (Messad *et al.*, 2013 ; Shettigar et Murali, 2020), cependant dans notre étude le portage des gènes de virulence n'était pas associé à la gravité des infections ni à la source de prélèvement. La distribution de la majorité des gènes de virulence était homogène au sein de chaque clone, chacun présentant un profil génétique distinct. Ces résultats nous amènent à suggérer que la prévalence des facteurs de virulence peut être spécifique à la région (Shahrokh *et al.*, 2024).

Le deuxième clone le plus abondant détecté présentait les caractéristiques du clone brésilien (ST241-t037-III(3 A)) (5/27 ; 18,5%) (Oliveira *et al.*, 2001), associé aux infections nosocomiales (Monecke *et al.*, 2011). Cependant, ce taux est inférieur à ce qui a été rapporté dans une étude menée en Algérie, où 82,2 % des SARM responsables d'IPD appartenaient au clone brésilien (Djahmi *et al.*, 2013). Nos résultats sont encore plus faibles que ceux rapportés dans la province de Constantine, avec une prévalence élevée (72,5 %) d'un clone brésilien émergent multirésistant et préoccupant (ST239/241 PVL-négatif SCC*mec*-III mercury) (Aouati *et al.*, 2021). De plus, Alioua *et al.* (2014).ont identifié le clone brésilien comme le principal clone de SARM-AH dans les hôpitaux de la province d'Annaba.

Nous avons détecté pour la première fois en Algérie un nouveau clone de SARM, ST672-t3841- IVd(2B) (3/27 ; 11,1%), originaire d'Inde (Shambat *et al.*, 2012). Ce clone a été isolé à la fois de la PSPC et des IPD. Le ST672 est un clone émergent signalé en Inde, en Australie et aux États-Unis (Khedkar *et al.*, 2012 ; Shambat *et al.*, 2012), souvent associé aux SARM-AC et isolé des IPD (Shettigar *et al.*, 2016).

Un autre clone, présentant les caractéristiques des SARM-AH, STNF-t037-III(3A) (3/27 ; 11,1%), a également été détecté dans les prélèvements de la PSPC et des IPD.

Malgré le faible taux de *S. aureus* sensible à la méthicilline (SASM) (5/32 ; 15,6%) dans notre étude, nous avons identifié quatre clones distincts : ST1-t127 (2/5, 40%), ST97-t9432, ST291-t937 et STNF-t037 (1/5 chacun, 20%). Le ST1 a été précédemment signalé en Europe parmi les SASM (Vandenesch *et al.*, 2003), ce qui confirme nos résultats. De plus, Holden *et al.* ont décrit l'isolement de ST1-SASM-AC (souche Sanger SASM 476), une souche invasive récupérée chez un enfant immunocompétent atteint d'ostéomyélite (Holden *et al.*, 2004). Cependant, une étude américaine a rapporté l'association de souches ST1-t127 (LK34) appartenant à la lignée USA400 de *S. aureus* avec les IPD (Kalan *et al.*, 2019). En effet, le ST1-t127 isolé dans notre étude a montré une forte similitude avec LK34 en termes de déterminants de virulence (*sak*, *lukD/lukE*, *scn*, *seh*, *sea*, *hlgA*, *hlgB*, *hlgC*, *hld*, *fnbA*, *fnbB*, *clfA*).

ST97-t9432 a également été trouvé parmi les isolats de SASM. Ce clone a été associé au bétail (Boswihi *et al.*, 2016) et est généralement responsable des infections bovines (Chatterjee et Otto, 2013). Cependant, dans cette étude, ST97-t9432 portait le cluster d'évasion immunitaire innée humaine (*IEC*), hébergeant les gènes *sak* et *scn*, contribuant à l'évasion immunitaire de manière spécifique à l'hôte humain (Spoor *et al.*, 2013), ce qui pourrait suggérer une origine humaine de ce clone. Une analyse phylogénétique a suggéré que la cassette *SCCmec* est acquise après le passage de l'hôte des bovins aux humains en raison de la pression de sélection exercée par les antibiotiques. Ainsi, ST97-t9432 semble être le précurseur de ST97-SARM.

En effet, plusieurs grands clones de SARM ont émergé suite au transfert horizontal des déterminants génétiques à partir de souches épidémiques de SASM (Enright *et al.*, 2002). À la suite de multiples événements mutationnels consécutifs à l'acquisition de l'élément *SCCmec*, des souches de SARM résistantes à des antibiotiques autres que les β -lactamines, y compris la vancomycine, sont apparues (Hiramatsu *et al.*, 2001).

ST291-t937 est un autre clone SASM associé au bétail (Rolo *et al.*, 2012), détecté parmi nos isolats. Cependant, il ne possédait pas le cluster *IEC*, ce qui confirme son origine animale. Ce clone a déjà été identifié chez des patients atteints d'IPD en Inde (Shettigar *et al.*, 2016).

Afin d'étudier tous les gènes présents dans les isolats d'une même espèce, ainsi que les relations phylogénétiques entre ces isolats et des souches de référence provenant d'autres pays, nous avons réalisé une analyse phylogénétique du pangéome.

Nos résultats révèlent que le pangéome des isolats de *Staphylococcus/Mammaliococcus* spp. présente un grand nombre de gènes accessoires, qui sont caractéristiques des éléments génétiques mobiles (EGM) (Holden *et al.*, 2004), tels que les séquences associées aux phages et aux plasmides. Les EGM peuvent être facilement perdus ou acquis. Cette plasticité génétique peut favoriser l'adaptation aux conditions locales, telles que les variations de pression de sélection antibiotique (Fluit *et al.*, 2015). Cette observation reflète la grande diversité génétique au sein de chaque espèce et les adaptations potentielles aux différences locales de pression de sélection antibiotique, leur permettant ainsi de coloniser différents environnements et exprimant divers degrés de pathogénicité (Holden *et al.*, 2004).

L'arbre phylogénétique de *S. aureus* a révélé une forte clonalité parmi les isolats appartenant au même ST, avec une légère variation du contenu génétique par rapport aux souches de référence, ce qui est particulièrement intéressant. De plus, la mise en évidence de la clonalité des SARM et SASM appartenant au STNF confirme notre hypothèse selon laquelle les SARM-STNF auraient émergé à la suite de l'acquisition du SCC*mec*-III(3A) (Vandenesch *et al.*, 2003).

De même, les arbres phylogénétiques des isolats de SCoN/*Mammaliococcus* spp. montrent une forte clonalité de nos isolats par rapport aux souches de référence. Cela nous conduit à suggérer que les souches algériennes de SCoN/*Mammaliococcus* spp. présentent des caractéristiques génétiques uniques en tant que clone, même si ces souches appartenant à différents ST, se regroupent ensemble. C'est notamment le cas des souches de *S. haemolyticus* appartenant à différents ST, ce qui pourrait refléter l'émergence de nouveaux ST ou une recombinaison au niveau des gènes MLST (Smith *et al.*, 2020).

La répartition des gènes dans notre étude variait selon les clones de *S. aureus* et les espèces de SCoN, où chaque clone ou espèce portait un ensemble spécifique de gènes de virulence et de résistance. Cette spécificité génétique semble jouer un rôle plus efficace dans la provocation de maladies invasives (Rasmussen *et al.*, 2013).

En effet, nous avons évalué statistiquement les associations potentielles entre la présence ou l'absence de déterminants génétiques de *Staphylococcus/Mammaliicoccus* spp., la source d'isolement et les grades PEDIS. Cependant, aucune association statistiquement significative n'a été observée.

Nos résultats contrastent avec ceux d'autres études. *S. aureus* a été identifié comme le principal contributeur de facteurs de virulence dans les infections de grade PEDIS 2 et 3, notamment le gène *clfB*, tandis que des IPD sévères étaient associées à des facteurs de virulence produits par plusieurs espèces (Radzieta *et al.*, 2021).

Une autre étude menée par Sotto *et al.* (2008) a suggéré l'association de marqueurs spécifiques des IPD (*sea*, *sei*, *lukE* et *hlgγ*) avec des souches provenant des IPD de grades 2 à 4, tandis que *cap8* était associé aux souches provenant des ulcères de grade 1 et aux souches SASM. De plus, la profondeur des plaies et la faible concentration en oxygène ont été corrélées à des voies génétiques liées à la virulence dans l'IPD, notamment la production capsulaire et polysaccharidique extracellulaire, la biosynthèse des saccharides et la production d'énergie non glycolytique (Kalan *et al.*, 2019).

La présente étude a mis en évidence une prévalence très élevée (32/32 ; 100%) des gènes codant la γ -hémolysine (*hlgA*, *hlgC* et *hlgB*), ainsi que les leucocidines (*lukD* et *lukE*), parmi les isolats de *S. aureus*. Il est essentiel de souligner que cette prévalence est nettement plus élevée que celle rapportée dans une étude menée en Iran (Taki *et al.*, 2023). En revanche, elle est conforme aux observations d'Al-Bakri *et al.* (2021), qui ont rapporté une fréquence élevée de ces gènes, en particulier ceux du cluster γ -hémolysine, dans les isolats de SARM isolés d'IPD et narines de patients atteints d'IPD (Al-Bakri *et al.*, 2021).

La détection d'un nombre élevé de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'adhésion, avec une prévalence élevée parmi les isolats de *S. aureus*, tels que les gènes *ica* et les gènes du locus *sdr*, reflète le pouvoir pathogène et la capacité de ces isolats à produire un biofilm, contribuant ainsi à la persistance et à la chronicité des IPD (Shettigar *et al.*, 2016). Les biofilms jouent un rôle central dans la chronicité de ces infections, et le développement de la résistance aux antibiotiques entrave la cicatrisation des plaies, rendant ainsi les IPD difficiles à traiter (Pouget *et al.*, 2020).

Un grand nombre de gènes *se/sel* codants pour les entérotoxines/entérotoxines-like, qui sont des exotoxines superantigènes (SAGs), ont été détectés parmi les isolats de *S. aureus*. La distribution des gènes *se/sel* était uniforme au sein de chaque clone, avec une forte association statistique (p -value <0.0001). Nos résultats montrent que les isolats *S. aureus* appartenant à ST672 et ST1 ont la capacité de produire un grand nombre de SAGs.

Cependant les isolats appartenant à ST80 ne portaient aucun gène *se/sel*. Les SAGs représentent un facteur de virulence critique dans les IPD (Vu *et al.*, 2014). Les souches de *S. aureus* productrices d'une large variété de SAGs activent plusieurs types de lymphocytes T pour sécréter des cytokines (Diegelmann et Evans, 2004), ce qui provoque des inflammations chroniques dans le site de l'infection, ralentissant ainsi la guérison (Vu *et al.*, 2014).

Étant donné que les isolats appartenant à ST80 ne portaient aucun gène *se/sel*, cela concorde avec d'autres études antérieures (Ben Nejma *et al.*, 2013 ; Tristan *et al.*, 2007). Cependant, il est important de souligner que des isolats de ST80 CA-SARM portant les gènes *se* (*sed*, *sei*, *seg*, *seb*, *seh* et *sea*) ont été signalés au Koweït (Udo et Sarkhoo, 2010). Les gènes *se/sel* sont souvent portés par des EGM et peuvent être acquis ou perdus sous certaines conditions, ce qui peut contribuer à la variabilité de la virulence.

L'*ACME* est le seul gène codant un facteur de pathogénicité détecté parmi les SCoN. Cependant, d'autres études ont démontré que les souches de SCoN isolées de diverses infections, y compris les IPD, présentent une vaste variété de gènes codant des facteurs de pathogénicité (Eltwisy *et al.*, 2020 ; Yao *et al.*, 2005). L'*ACME* joue un rôle important dans la résistance et la survie de *S. aureus* en tant que pathogène dans les environnements acides et inflammatoires du site de l'infection. Un bon exemple de la contribution de l'*ACME* dans la pathogénicité est observé dans la souche épidémique USA300 (ST8-SARM-IVa), attribuée à la présence de l'*ACME*, supposée provenir de *S. epidermidis* (Chatterjee et Otto, 2013 ; O'Connor *et al.*, 2018).

Dans cette étude, les isolats de *Staphylococcus/Mammaliicoccus* spp. portaient les gènes associés à la résistance à plusieurs classes d'antibiotiques. La distribution de ces gènes est généralement homogène au sein de chaque clone. Les isolats de *S. aureus* appartenant au clone européen portaient principalement des gènes conférant la résistance aux EMA, *ant(6)-Ia* et *aph(3')-III/aph(3')-IIIa*, en plus de trois isolats positifs pour le gène *sat4* responsable de la résistance à la streptothricine. Cependant, une très faible prévalence des gènes conférant la

résistance aux macrolides-lincosamides-streptogramines B, aux tétracyclines et à l'acide fusidique a été enregistrée. Nos résultats contrastent avec ceux de plusieurs études menées en Algérie qui ont rapporté la résistance du clone européen à plusieurs classes d'antibiotiques (Djoudi *et al.*, 2013 ; Ouchenane *et al.*, 2011 ; Ramdani-Bougoussa *et al.*, 2006).

En plus des trois gènes conférant la résistance aux EMA, les isolats du clone brésilien portaient un seul gène conférant la résistance aux macrolides, *ermA*. Ce constat est conforme à une récente étude menée dans la province de Constantine, qui a signalé l'association du gène *erm(A)* avec la résistance aux macrolides dans le clone brésilien (Aouati *et al.*, 2021).

Nous avons observé une forte prévalence de gènes conférant la résistance aux EMA, aux macrolides, au triméthopri-me-sulfaméthoxazole et à la fosfomycine parmi les isolats de *S. epidermidis* et *S. haemolyticus*. La multirésistance observée parmi les isolats de *S. aureus* et de SCoN dans cette étude souligne la nécessité d'un traitement combiné utilisant plusieurs antibiotiques pour cibler efficacement ces souches résistantes pour le traitement des IPD.

La propagation des gènes de résistance aux antimicrobiens parmi les souches isolées de la PSpC et des IPD peut être en partie attribuée à la colonisation des patients par des souches nosocomiales pendant l'hospitalisation et à l'utilisation antérieure d'antibiotiques pour traiter les IPD (Ahmadishooli *et al.*, 2020 ; Ferreira *et al.*, 2021 ; Hassan *et al.*, 2019 ; Kandemir *et al.*, 2007).

2. Séquençage métagénomique shotgun

Dans cette section, nous avons caractérisé la diversité et la composition des communautés bactériennes des IPD en comparaison avec celle de la PSPC, à l'aide du séquençage métagénomique shotgun.

Nos analyses ont révélé un déséquilibre du microbiome des IPD, marqué par une diminution significative de la diversité bactérienne et une augmentation de l'abondance relative de certains taxons, notamment dans les grades PEDIS 3 et PEDIS 4. En revanche, les échantillons de la PSPC présentaient des niveaux de diversité nettement plus élevés

La comparaison de la diversité bactérienne entre les IPD et la PSPC a été peu explorée dans la littérature. Cependant, nos résultats concordent avec ceux rapportés par Gontcharova *et al.* (2010), qui ont montré que la diversité bactérienne de la PSPC était significativement plus élevée que celle des IPD aux niveaux d'espèces et du genres.

L'analyse de la bêta-diversité a indiqué que le microbiote des IPD diffère significativement de celui de la PSPC. Dans le graphique PCoA, les échantillons de la PSPC apparaissent regroupés, ce qui suggère une homogénéité et une distribution commune des communautés bactériennes. En revanche, les échantillons des IPD étaient plus dispersés, reflétant une plus grande hétérogénéité du microbiote.

Dans l'analyse Neighbor-Net, la distribution diffère de celle observée dans le PCoA. Les échantillons des IPD étaient regroupés de manière serrée sur des branches courtes, indiquant une communauté microbienne dominante moins diversifiée et plus homogène. À l'inverse, les échantillons de la PSPC, dispersés le long de branches plus longues, suggèrent une plus grande diversité de composition microbienne. Ces observations sont renforcées par le concept de biosphère microbienne rare, qui postule que les communautés microbiennes contiennent un grand nombre de taxons rares à faible abondance. L'indice de Goodall, qui accorde une importance accrue aux différences entre taxons rares, pourrait expliquer la dispersion observée des échantillons de la PSPC (Legendre et Legendre, 2014 ; Mitra *et al.*, 2010).

Cette variation dans la diversité bactérienne pourrait s'expliquer par les perturbations des communautés microbiennes suite à l'inflammation de la zone infectée, provoquée par certains agents pathogènes (Park *et al.*, 2019). En effet, la peau intacte abrite des communautés microbiennes qui jouent un rôle crucial dans la santé cutanée en préservant l'équilibre écologique du microbiote cutané (Hannigan et Grice, 2013 ; Tomic-Canic *et al.*, 2014).

La flore bactérienne de la PSPC était principalement dominée par les genres *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Cutibacterium* et *Acinetobacter* représentés à travers les trois grades de sévérité PEDIS. Ces genres constituent des composantes majeures et stables de la flore cutanée, malgré les variations interindividuelles et les facteurs pouvant influencer ce microbiome (Hannigan et Grice, 2013 ; Tomic-Canic *et al.*, 2014). Ces observations concordent avec les résultats d'études précédentes (Grice, 2015 ; Hannigan et Grice, 2013 ; Park *et al.*, 2019 ; Redel *et al.*, 2013).

Par ailleurs, les IPD étaient principalement dominées par des bactéries anaérobies strictes, telles que *Prevotella*, *Bacteroides* et *Porphyromonas*. Cependant, la majorité des études basées sur la culture ont rapporté une abondance élevée de cocci à Gram positif (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*) et de bactéries de l'ordre des Enterobacterales, notamment *E. coli* et *P. mirabilis* (Dowd *et al.*, 2008b ; Jneid *et al.*, 2018 ; Kalan et Brennan, 2019 ; Smith *et al.*, 2016).

De plus, le séquençage métagénomique *shotgun* des communautés bactériennes des IPD a révélé une abondance relative élevée de *S. aureus*, *Streptococcus* spp., suivis de *Corynebacterium* spp. et de *Clostridioides* spp. (anciennement *Clostridium*) (Radzieta *et al.*, 2021). Des résultats similaires ont été rapportés par d'autres auteurs (Gardiner *et al.*, 2017 ; Malone *et al.*, 2017).

En revanche, nos résultats sont en accord avec trois études moléculaires basées sur le séquençage de l'ADNr 16S. Par exemple, Zou *et al.* (2020) ont démontré une abondance élevée de *Prevotella* spp. dans l'ostéomyélite du pied diabétique, avec une corrélation positive entre *Prevotella* spp. et la durée de l'IPD. De plus, deux autres études ont également rapporté des taux élevés de bactéries anaérobies strictes, notamment *Anaerococcus*, *Fingoldia* et *Peptoniphilus* (Gontcharova *et al.*, 2010 ; Smith *et al.*, 2016).

Nos résultats ont révélé une élévation des anaérobies stricts, en particulier *Prevotella* et *Bacteroides*, dans les grades PEDIS 3 et 4, en accord avec une étude récente. Park *et al.* (2019) ont rapporté des niveaux similaires d'anaérobies stricts, notamment des genres *Bacteroidetes*, *Prevotella* et *Porphyromonas*, dans les infections des pieds diabétiques des grades les plus sévères. En revanche, Jnana *et al.* (2020) ont observé une prédominance croissante des anaérobies facultatifs avec l'aggravation de la sévérité des plaies.

La similarité observée entre les microbiomes des IPDs et de la peau saine dans le grade PEDIS 2 pourrait s'expliquer par le fait que les premiers microorganismes colonisateurs des plaies proviennent fréquemment du microbiote cutané autochtone, en raison de leur proximité avec les lésions tissulaires (Oates *et al.*, 2012).

La proportion élevée d'anaérobies dans le grade PEDIS 4, contrairement aux aérobies plus présents dans les grades moins sévères, peut être attribuée à la consommation d'oxygène par les microorganismes aérobies, qui se trouvent dans les parties superficielles de la plaie où la teneur en oxygène est plus élevée. Cela crée un environnement anoxique dans les zones profondes de la plaie, favorisant la localisation des anaérobies obligatoires dans les niches hypoxiques (Lavigne *et al.*, 2015).

Conclusion générale

Conclusion générale

La première partie de notre étude a démontré que les isolats algériens de *Staphylococcus/Mammaliococcus* spp. présentaient de nouvelles caractéristiques génétiques, avec propagation de gènes de virulence et de résistance, rendant ainsi la prise en charge des IPD difficile.

La caractérisation des souches de *Staphylococcus/Mammaliococcus* spp. isolées des IPD et de la peau saine peut permettre d'établir un lien entre la colonisation cutanée et l'infection, en mettant en évidence la présence éventuelle des mêmes clones. La détection du même clone dans les IPD et sur la PSPC suggère que les staphylocoques autochtones de la peau peuvent servir de réservoir pour les IPD. Ces résultats suggèrent également un transfert bidirectionnel possible de *S. aureus/SCoN* entre la PSPC et les UPD.

Nous avons détecté une grande variété de gènes de résistance et de virulence dans parmi les isolats de *S. aureus/SCoN*. Ces éléments jouent un rôle crucial dans les infections causées par ces bactéries. Ainsi, la caractérisation moléculaire de ces déterminants est essentielle pour améliorer la prise en charge des patients atteints d'IPD.

À notre connaissance, cette étude représente la première enquête en Algérie qui examine l'épidémiologie des *Staphylococcus/Mammaliococcus* spp. dans les IPD, en utilisant le séquençage du génome entier et l'analyse du pangéome. La capacité de ces bactéries à provoquer une infection et à entraver le processus de guérison peut être attribuée au portage de différents gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques.

L'introduction du séquençage du génome entier comme outil de diagnostic de routine en laboratoire revêt une importance primordiale, car l'identification des bactéries uniquement sur la base de caractéristiques culturelles, sans détection des déterminants de virulence et de résistance, peut conduire à des prescriptions antibiotiques inappropriées, contribuant ainsi à la propagation de la résistance (Sotto *et al.*, 2007). Nos résultats soulignent l'importance d'un diagnostic multidisciplinaire des IPD utilisant de nouvelles approches pour parvenir à un diagnostic précis et établir un plan de traitement approprié.

Conclusion générale

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons caractérisé, pour la première fois, le microbiome des IPD en le comparant à celui de la PSPC. Nous avons constaté une diminution significative de la diversité bactérienne des IPD, indiquant un état de dysbiose de ce microbiome. La diversité microbienne joue un rôle essentiel dans le maintien de l'équilibre du microbiote cutané, et toute altération de cet équilibre, qu'elle soit provoquée par une infection, une inflammation ou d'autres facteurs, peut compromettre la santé et la guérison.

L'analyse métagénomique nous a permis d'identifier *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* comme les genres les plus abondants, suggérant ainsi que les bactéries anaérobies jouent un rôle important en tant qu'agents étiologiques dans l'infection et la chronicité des UPD.

Cette étude souligne également l'importance du choix d'antibiotiques en tenant compte de la population anaérobie négligée lors des analyses microbiologiques de routine, ce qui constitue la principale cause de la propagation des gènes de résistance.

Malgré son coût élevé, l'application clinique des approches métagénomiques offre des avantages considérables, notamment une résolution taxonomique élevée permettant une identification précise jusqu'au niveau de l'espèce. Cela peut améliorer la prise en charge des IPD et les perspectives de guérison des patients atteints d'IPD.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abbas, Z. G. et Boulton, A. J. M. (2022). Diabetic foot ulcer disease in African continent: 'From clinical care to implementation' – Review of diabetic foot in last 60 years – 1960 to 2020. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 183, 109155. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109155>
- Ahmadishooli, A., Davoodian, P., Shoja, S., Ahmadishooli, B., Dadvand, H., Hamadiyan, H. et Shahriarirad, R. (2020). Frequency and Antimicrobial Susceptibility Patterns of Diabetic Foot Infection of Patients from Bandar Abbas District, Southern Iran. *Journal of Pathogens*, 2020, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2020/1057167>
- Al-Bakri, A. G., Bulatova, N. R., Younes, N. A., Othman, G., Jaber, D., Schleimer, N., Kriegeskorte, A. et Becker, K. (2021). Characterization of staphylococci sampled from diabetic foot ulcer of Jordanian patients. *Journal of Applied Microbiology*, 131(5), 2552-2566. <https://doi.org/10.1111/jam.15096>
- Alioua, M. A., Labid, A., Amoura, K., Bertine, M., Gacemi-Kirane, D. et Dekhil, M. (2014). Emergence of the European ST80 clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of healthcare-associated infections in Eastern Algeria. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 44(4), 180-183. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.01.006>
- Alizargar, J., Sharif, M. et Sharif, A. (2013). Risk Factors of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization in Diabetic Outpatients, A Prospective Cohort Study. *International Journal of Microbiological Research*, 4(2), 147-151. <https://doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2013.4.2.74134>
- Antri, K., Rouzic, N., Dauwalder, O., Boubekri, I., Bes, M., Lina, G., Vandenesch, F., Tazir, M., Ramdani-Bouguessa, N. et Etienne, J. (2011). High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST80-IV in hospital and community settings in Algiers. *Clinical Infectious Diseases*, 17(4), 526-532. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03273.x>
- Aouati, H., Hadjadj, L., Aouati, F., Agabou, A., Khedher, M. Ben, Bousseboua, H., Bentchouala, C., Rolain, J. M. et Diene, S. M. (2021). Emergence of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* ST239/241 SCCmec-III mercury in Eastern Algeria. *Pathogens*, 10(11), 1503. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111503>
- Armbruster, C. E., Mobley, H. L. T. et Pearson, M. M. (2018). Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. *EcoSal Plus*, 8(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0009-2017>
- Armstrong, D. G. et Lipsky, B. A. (2004). Diabetic foot infections: Stepwise medical and surgical management. *International Wound Journal*, 1(2), 123-132. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4801.2004.00035.x>
- Atreja, A., Kalra, S. et Rodriguez-Saldana, J. (2023). Diabetes and Infection. Dans J. Rodriguez-Saldana (dir.), *The Diabetes Textbook: Clinical Principles, Patient Management and Public Health* (p. 755-785). Springer International Publishing.
- Bansal, E., Garg, A., Bhatia, S., Attri, A. et Chander, J. (2008). Spectrum of microbial flora in diabetic foot ulcers. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 51(2), 204-208. <https://doi.org/10.4103/0377-4929.41685>
- Bartels, M. D., Petersen, A., Worning, P., Nielsen, J. B., Larner-Svensson, H., Johansen, H. K., Andersen, L. P., Jarløv, J. O., Boye, K., Larsen, A. R. et Westh, H. (2014). Comparing whole-genome sequencing with sanger sequencing for spa typing of methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(12), 4305-4308. <https://doi.org/10.1128/JCM.01979-14>
- Becker, K., Heilmann, C. et Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 870-926. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>
- Bekkhoucha, S. N., Cady, A., Gautier, P., Itim, F. et Donnio, P. Y. (2009). A portrait of

Références bibliographiques

- staphylococcus aureus from the other side of the Mediterranean Sea: Molecular characteristics of isolates from western Algeria. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 28(5), 553-555. <https://doi.org/10.1007/s10096-008-0660-x>
- Ben Nejma, M., Mastouri, M., Bel Hadj Jrad, B. et Nour, M. (2013). Characterization of ST80 Panton-Valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus clone in Tunisia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 77(1), 20-24. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.02.010>
- Bjarnsholt, T., Kirketerp-Møller, K., Jensen, P. Ø., Madsen, K. G., Phipps, R., Krogh, K., Høiby, N. et Givskov, M. (2008). Why chronic wounds will not heal: A novel hypothesis. *Wound Repair and Regeneration*, 16(1), 2-10. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00283.x>
- Bode, L. G. M., Kluytmans, J. A. J. W., Wertheim, H. F. L., Bogaers, D., Vandembroucke-Grauls, C. M. J. E., Roosendaal, R., Troelstra, A., Box, A. T. A., Voss, A., van der Tweel, I., van Belkum, A., Verbrugh, H. A. et Vos, M. C. (2010). Preventing Surgical-Site Infections in Nasal Carriers of Staphylococcus aureus. *New England Journal of Medicine*, 362(1), 9-17. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808939>
- Bonamigo, R. R., Costa Beber, A. A., Ritter, C. G. et Heck, R. (2023). *Dermatology in Public Health Environments: A Comprehensive Textbook, Second Edition. Dermatology in Public Health Environments: A Comprehensive Textbook, Second Edition.* <https://doi.org/10.1007/978-3-031-13505-7>
- Boswihi, S. S., Udo, E. E. et Al-Sweih, N. (2016). Shifts in the clonal distribution of methicillin-resistant staphylococcus aureus in Kuwait hospitals: 1992-2010. *PLoS ONE*, 11(9), e0162744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162744>
- Bowler, P. G., Duerden, B. I. et Armstrong, D. G. (2001). Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2), 244-269. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.244-269.2001>
- Bowling, F. L., Jude, E. B. et Boulton, A. J. M. (2009). MRSA and diabetic foot wounds: Contaminating or infecting organisms? *Current Diabetes Reports*, 9(6), 440-444. <https://doi.org/10.1007/s11892-009-0072-z>
- Bravo-Molina, A., Linares-Palomino, J. P., Vera-Arroyo, B., Salmerón-Febres, L. M. et Ros-Díe, E. (2018). Inter-observer agreement of the Wagner, University of Texas and PEDIS classification systems for the diabetic foot syndrome. *Foot and Ankle Surgery*, 24(1), 60-64. <https://doi.org/10.1016/j.fas.2016.10.009>
- Bruun, C., Siersma, V., Guassora, A. D., Holstein, P. et de Fine Olivarius, N. (2013). Amputations and foot ulcers in patients newly diagnosed with type 2 diabetes mellitus and observed for 19 years. The role of age, gender and co-morbidity. *Diabetic Medicine*, 30(8), 964-972. <https://doi.org/10.1111/dme.12196>
- Bryant, D. et Moulton, V. (2004). Neighbor-Net: An Agglomerative Method for the Construction of Phylogenetic Networks. *Molecular Biology and Evolution*, 21(2), 255-265. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh018>
- Buchanan, T. a et Xiang, A. H. (2005). Science in medicine Gestational diabetes mellitus. *Diabetes*, 115(3), 485-491. <https://doi.org/10.1172/JCI200524531>
- Büke, Ç. (2010). Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *Klinik Dergisi*, 23(2), 34. <https://doi.org/10.5152/kd.2010.11>
- Cervantes-García, E., García-González, R., Reséndiz-Albor, A. et Salazar-Schettino, P. M. (2015). Infections of diabetic foot ulcers with methicillin-resistant staphylococcus aureus. *International Journal of Lower Extremity Wounds*, 14(1), 44-49. <https://doi.org/10.1177/1534734614564053>
- Chamberlain, R. C., Fleetwood, K., Wild, S. H., Colhoun, H. M., Lindsay, R. S., Petrie, J. R.,

Références bibliographiques

- McCrimmon, R. J., Gibb, F., Philip, S., Sattar, N., Kennon, B. et Leese, G. P. (2022). Foot Ulcer and Risk of LowerLimb Amputation or Death in People With Diabetes: A National Population-Based Retrospective Cohort Study. *Diabetes Care*, 45(1), 83-91. <https://doi.org/10.2337/dc21-1596>
- Chatterjee, S. S. et Otto, M. (2013). Improved understanding of factors driving methicillin-resistant Staphylococcus aureus epidemic waves. *Clinical Epidemiology*, 5(1), 205-217. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S37071>
- Chen, L., Sun, S., Gao, Y. et Ran, X. (2023). Global mortality of diabetic foot ulcer: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 25(1), 36-45. <https://doi.org/10.1111/dom.14840>
- Cho, N. H., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J. D., Ohlrogge, A. W. et Malanda, B. (2018). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 138, 271-281. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023>
- Citron, D. M., Goldstein, E. J. C., Merriam, C. V., Lipsky, B. A. et Abramson, M. A. (2007). Bacteriology of moderate-to-severe diabetic foot infections and in vitro activity of antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2819-2828. <https://doi.org/10.1128/JCM.00551-07>
- Cunningham, R., Cockayne, A. et Humphreys, H. (1996). Clinical and molecular aspects of the pathogenesis of Staphylococcus aureus bone and joint infections. *Journal of Medical Microbiology*, 44(3), 157-164. <https://doi.org/10.1099/00222615-44-3-157>
- Dang, C. N., Prasad, Y. D. M., Boulton, A. J. M. et Jude, E. B. (2003). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the diabetic foot clinic: A worsening problem. *Diabetic Medicine*, 20(2), 159-161. <https://doi.org/10.1046/j.1464-5491.2003.00860.x>
- David, M. Z. et Daum, R. S. (2010). Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(3), 616-687. <https://doi.org/10.1128/CMR.00081-09>
- Diabetes, D. O. F. (2013). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 36(SUPPL.1), 67-74. <https://doi.org/10.2337/dc13-S067>
- Diegelmann, R. F. et Evans, M. C. (2004). Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*, 9(December), 283-289. <https://doi.org/10.2741/1184>
- Dietrich, I., Braga, G. A., de Melo, F. G. et da Costa Silva Silva, A. C. C. (2017). The Diabetic Foot as a Proxy for Cardiovascular Events and Mortality Review. *Current Atherosclerosis Reports*, 19(11). <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0680-z>
- Djahmi, N., Messad, N., Nedjai, S., Moussaoui, A., Mazouz, D., Richard, J. L., Sotto, A. et Lavigne, J. P. (2013). Molecular epidemiology of staphylococcus aureus strains isolated from inpatients with infected diabetic foot ulcers in an Algerian University Hospital. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(9), E398-E404. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12199>
- Djoudi, F., Bonura, C., Benallaoua, S., Touati, A., Touati, D., Aleo, A., Cala, C., Fasciana, T. et Mammina, C. (2013). Panton-Valentine leukocidin positive sequence type 80 methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying a staphylococcal cassette chromosome mec type IVc is dominant in neonates and children in an Algiers hospital. *New Microbiologica*, 36(1), 49-56.
- Dobrindt, U. (2005). (Patho-)Genomics of Escherichia coli. *International Journal of Medical Microbiology*, 295(6-7), 357-371. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.07.009>
- Dowd, S. E., Sun, Y., Secor, P. R., Rhoads, D. D., Wolcott, B. M., James, G. A. et Wolcott, R. D. (2008a). Survey of bacterial diversity in chronic wounds using Pyrosequencing,

Références bibliographiques

- DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiology*, 8, 43. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-43>
- Dowd, S. E., Wolcott, R. D., Sun, Y., McKeehan, T., Smith, E. et Rhoads, D. (2008b). Polymicrobial Nature of Chronic Diabetic Foot Ulcer Biofilm Infections Determined Using Bacterial Tag Encoded FLX Amplicon Pyrosequencing (bTEFAP). *PLoS ONE*, 3(10), e3326. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003326>
- Drzewiecka, D. (2016). Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments. *Microbial Ecology*, 72(4), 741-758. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0720-6>
- Dubský, M., Jirkovská, A., Bem, R., Fejfarová, V., Skibová, J., Schaper, N. C. et Lipsky, B. A. (2013). Risk factors for recurrence of diabetic foot ulcers: Prospective follow-up analysis in the Eurodiale subgroup. *International Wound Journal*, 10(5), 555-561. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2012.01022.x>
- Dunyach-Remy, C., Courtais-Coulon, C., DeMattei, C., Jourdan, N., Schuldiner, S., Sultan, A., Carrière, C., Alonso, S., Sotto, A. et Lavigne, J. P. (2017). Link between nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and infected diabetic foot ulcers. *Diabetes and Metabolism*, 43(2), 167-171. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2016.09.003>
- Dunyach-Remy, C., Essebe, C. N., Sotto, A. et Lavigne, J. P. (2016). *Staphylococcus aureus* toxins and diabetic foot ulcers: Role in pathogenesis and interest in diagnosis. *Toxins (Basel)*, 8(7), 209. <https://doi.org/10.3390/toxins8070209>
- Dutta, D., Singla, R., Sharma, M., Sharma, A. et Kalra, S. (2023). Musculoskeletal Complications of Diabetes Mellitus. Dans J. Rodriguez-Saldana (dir.), *The Diabetes Textbook: Clinical Principles, Patient Management and Public Health* (p. 993-1001). Springer International Publishing.
- Edelson, G. W., Lanthier, J., Lelievre, P. et Edelson, G. W. (1995). Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococcal osteomyelitis and its relationship to broad-spectrum oral antibiotics in a predominantly diabetic population. *Journal of Foot and Ankle Surgery*, 34(6), 563-566. [https://doi.org/10.1016/S1067-2516\(09\)80079-3](https://doi.org/10.1016/S1067-2516(09)80079-3)
- Eltwisy, H. O., Abdel-Fattah, M., Elsisy, A. M., Omar, M. M., Abdelmoteleb, A. A. et El-Mokhtar, M. A. (2020). Pathogenesis of *Staphylococcus haemolyticus* on primary human skin fibroblast cells. *Virulence*, 11(1), 1142-1157. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1809962>
- Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H. et Spratt, B. G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7687-7692. <https://doi.org/10.1073/pnas.122108599>
- Fazli, M., Bjarnsholt, T., Kirketerp-Møller, K., Jørgensen, B., Andersen, A. S., Krogfelt, K. A., Givskov, M. et Tolker-Nielsen, T. (2009). Nonrandom distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in chronic wounds. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(12), 4084-4089. <https://doi.org/10.1128/JCM.01395-09>
- Ferreira, C., Costa, S. S., Serrano, M., Oliveira, K., Trigueiro, G., Pomba, C. et Couto, I. (2021). Clonal lineages, antimicrobial resistance, and *pvl* carriage of *staphylococcus aureus* associated to skin and soft-tissue infections from ambulatory patients in Portugal. *Antibiotics*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040345>
- Fiore, E., van Tyne, D. et Gilmore, M. S. (2019). Pathogenicity of enterococci. *Gram-Positive Pathogens*, 2007(8), 378-397. <https://doi.org/10.1128/9781683670131.ch24>
- Fisher, K. et Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155(6), 1749-1757. <https://doi.org/10.1099/mic.0.026385-0>
- Fluit, A. C., Carpaij, N., Majoor, E. A. M., Weinstein, R. A., Aroutcheva, A., Rice, T. W., Bonten, M. J. M. et Willems, R. J. L. (2015). Comparison of an ST80 MRSA strain from

Références bibliographiques

- the USA with European ST80 strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(3), 664-669. <https://doi.org/10.1093/jac/dku459>
- Foster, T. J. (2005). Immune evasion by staphylococci. *Nature Reviews Microbiology*, 3(12), 948-958. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1289>
- Fournier, P. E., Drancourt, M., Colson, P., Rolain, J. M., Scola, B. La et Raoult, D. (2013). Modern clinical microbiology: New challenges and solutions. *Nature Reviews Microbiology*, 11(8), 574-585. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3068>
- Gardiner, M., Vicaretti, M., Sparks, J., Bansal, S., Bush, S., Liu, M., Darling, A., Harry, E. et Burke, C. M. (2017). A longitudinal study of the diabetic skin and wound microbiome. *PeerJ*, 5, e3543. <https://doi.org/10.7717/peerj.3543>
- Ghotaslou, R., Memar, M. Y. et Alizadeh, N. (2018). Classification, microbiology and treatment of diabetic foot infections. *Journal of Wound Care*, 27(7), 434-441. <https://doi.org/10.12968/jowc.2018.27.7.434>
- Gontcharova, V., Youn, E., Sun, Y., Wolcott, R. D. et Dowd, S. E. (2010). A Comparison of Bacterial Composition in Diabetic Ulcers and Contralateral Intact Skin. *The Open Microbiology Journal*, 4, 8-19. <https://doi.org/10.2174/1874285801004010008>
- Grice, E. A. (2015). The intersection of microbiome and host at the skin interface: Genomic- and metagenomic-based insights. *Genome Research*, 25(10), 1514-1520. <https://doi.org/10.1101/gr.191320.115>
- Grice, E. A. et Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4), 244-253. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2537>
- Hadfield, J., Croucher, N. J., Goater, R. J., Abudahab, K., Aanensen, D. M. et Harris, S. R. (2018). Phandango: An interactive viewer for bacterial population genomics. *Bioinformatics*, 34(2), 292-293. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx610>
- Haleem, A., Schultz, J. S., Heilmann, K. P., Dohrn, C. L., Diekema, D. J. et Gardner, S. E. (2014). Concordance of nasal and diabetic foot ulcer staphylococcal colonization. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 79(1), 85-89. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.014>
- Han, S. H., Lee, J. S., Song, K. H., Choe, Y. B., Ahn, K. J. et Lee, Y. W. (2020). Differences in foot skin microbiomes between patients with type 2 diabetes and healthy individuals. *Mycoses*, 63(3), 314-322. <https://doi.org/10.1111/myc.13046>
- Hannigan, G. D. et Grice, E. A. (2013). Microbial ecology of the skin in the era of metagenomics and molecular microbiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(12), a015362. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015362>
- Hartemann-Heurtier, A., Robert, J., Jacqueminet, S., Ha Van, G., Golmard, J. L., Jarlier, V. et Grimaldi, A. (2004). Diabetic foot ulcer and multidrug-resistant organisms: Risk factors and impact. *Diabetic Medicine*, 21(7), 710-715. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2004.01237.x>
- Hartemann-Heurtier, A. et Senneville, E. (2008). Diabetic foot osteomyelitis. *Diabetes and Metabolism*, 34(2), 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2007.09.005>
- Hashsham, S. A. (1981). Culture Techniques. *Culture Techniques*, 270-285. <https://doi.org/10.1515/9783110858242>
- Hassan, M. A., Tamer, T. M., Rageh, A. A., Abou-Zeid, A. M., Abd El-Zaher, E. H. F. et Kenawy, E. R. (2019). Insight into multidrug-resistant microorganisms from microbial infected diabetic foot ulcers. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 13(2), 1261-1270. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.01.044>
- Hatipoglu, M., Mutluoglu, M., Uzun, G., Karabacak, E., Turhan, V. et Lipsky, B. A. (2014). The microbiologic profile of diabetic foot infections in Turkey: A 20-year systematic review: Diabetic foot infections in Turkey. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(6), 871-878. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2047-5>

Références bibliographiques

- Heravi, F. S., Zakrzewski, M., Vickery, K., Armstrong, D. G. et Hu, H. (2019). Bacterial Diversity of Diabetic Foot Ulcers: Current Status and Future Prospectives. *Journal of clinical medicine*, 8(11), 1935. <https://doi.org/10.3390/jcm8111935>
- Hicks, C. W., Canner, J. K., Mathioudakis, N., Lippincott, C., Sherman, R. L. et Abularrage, C. J. (2020). Incidence and Risk Factors Associated With Ulcer Recurrence Among Patients With Diabetic Foot Ulcers Treated in a Multidisciplinary Setting. *Journal of Surgical Research*, 246(410), 243-250. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2019.09.025>
- Hicks, C. W. et Selvin, E. (2019). Epidemiology of Peripheral Neuropathy and Lower Extremity Disease in Diabetes. *Current Diabetes Reports*, 19(10), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1212-8>
- Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M. et Ito, T. (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 9(10), 486-493. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02175-8](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02175-8)
- Hobizal, K. B. et Wukich, D. K. (2012). Diabetic foot infections: Current concept review. *Diabetic Foot and Ankle*, 3, 1-8. <https://doi.org/10.3402/dfa.v3i0.18409>
- Holden, M. T. G., Feil, E. J., Lindsay, J. A., Peacock, S. J., Day, N. P. J., Enright, M. C., Foster, T. J., Moore, C. E., Hurst, L., Atkin, R., Barron, A., Bason, N., Bentley, S. D., Chillingworth, C., Chillingworth, T., Churcher, C., Clark, L., Corton, C., Cronin, A., ... Parkhill, J. (2004). Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: Evidence for the evolution of virulence and drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(26), 9786-9791. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402521101>
- Hurlow, J. J., Humphreys, G. J., Bowling, F. L. et McBain, A. J. (2018). Diabetic foot infection: A critical complication. *International Wound Journal*, 15(5), 814-821. <https://doi.org/10.1111/iwj.12932>
- Huson, D. H. (2013). *User Manual for MEGAN V5.0.80-beta*, 1-58.
- Huson, D. H., Auch, A. F., Qi, J. et Schuster, S. C. (2007). MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Research*, 17(3), 377-386. <https://doi.org/10.1101/gr.5969107>
- Imam, K. (2013). *Gestational Diabetes Mellitus*. In: Ahmad, S.I. (eds) *Diabetes. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 771, 24-34. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5441-0_4
- IWGDF. (2023). *Guidelines on the classification of foot ulcers in people with diabetes*. www.iwgdfguidelines.org
- Jain, S. et Barman, R. (2017). Bacteriological profile of diabetic foot ulcer with special reference to drug-resistant strains in a tertiary care center in North-East India. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 21(5), 688-694. https://doi.org/10.4103/ijem.IJEM_546_16
- Jeffcoate, W. J. et Harding, K. G. (2003). Diabetic foot ulcers. *Lancet*, 361(9368), 1545-1551. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13169-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13169-8)
- Jiang, Y., Wang, X., Xia, L., Fu, X., Xu, Z., Ran, X., Yan, L., Li, Q., Mo, Z., Yan, Z., Ji, Q. et Li, Q. (2015). A cohort study of diabetic patients and diabetic foot ulceration patients in China. *Wound Repair and Regeneration*, 23(2), 222-230. <https://doi.org/10.1111/wrr.12263>
- Jnana, A., Muthuraman, V., Varghese, V. K., Chakrabarty, S., Murali, T. S., Ramachandra, L., Shenoy, K. R., Rodrigues, G. S., Prasad, S. S., Dendukuri, D., Morschhauser, A., Nestler, J., Peter, H., Bier, F. F. et Satyamoorthy, K. (2020). Microbial Community Distribution and Core Microbiome in Successive Wound Grades of Individuals with Diabetic Foot Ulcers. *Appl Environ Microbiol*, 86(6), e02608-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02608-19>
- Jneid, J., Cassir, N., Schuldiner, S., Jourdan, N., Sotto, A., Lavigne, J. P. et La Scola, B.

Références bibliographiques

- (2018). Exploring the microbiota of diabetic foot infections with culturomics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 282.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00282>
- Jneid, J., Lavigne, J. P., La Scola, B. et Cassir, N. (2017). The diabetic foot microbiota: A review. *Human Microbiome Journal*, 5-6, 1-6.
<https://doi.org/10.1016/j.humic.2017.09.002>
- Jouhar, L., Jaafar, R. F., Nasreddine, R., Itani, O., Haddad, F., Rizk, N. et Hoballah, J. J. (2020). Microbiological profile and antimicrobial resistance among diabetic foot infections in Lebanon. *International Wound Journal*, 17(6), 1764-1773.
<https://doi.org/10.1111/iwj.13465>
- Kalan, L., Loesche, M., Hodgkinson, B. P., Heilmann, K., Ruthel, G., Gardner, S. E. et Grice, E. A. (2016). Redefining the chronic-wound microbiome: Fungal communities are prevalent, dynamic, and associated with delayed healing. *mBio*, 7(5).
<https://doi.org/10.1128/mBio.01058-16>
- Kalan, L. R. et Brennan, M. B. (2019). The role of the microbiome in nonhealing diabetic wounds. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1435(1), 79-92.
<https://doi.org/10.1111/nyas.13926>
- Kalan, L. R., Meisel, J. S., Loesche, M. A., Horwinski, J., Soaita, I., Chen, X., Uberoi, A., Gardner, S. E. et Grice, E. A. (2019). Strain- and Species-Level Variation in the Microbiome of Diabetic Wounds Is Associated with Clinical Outcomes and Therapeutic Efficacy. *Cell Host and Microbe*, 25(5), 641-655.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.03.006>
- Kananzadeh, P., Moghadam, S. O., Sadeghi, Y., Foroushani, A. R., Adibi, H. et Pourmand, M. R. (2019). Molecular characteristics of methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) isolated from diabetic foot infection. *Iranian Journal of Pathology*, 14(4), 329-337. <https://doi.org/10.30699/IJP.2019.101092.2035>
- Kandemir, Ö., Akbay, E., Şahin, E., Milcan, A. et Gen, R. (2007). Risk factors for infection of the diabetic foot with multi-antibiotic resistant microorganisms. *Journal of Infection*, 54(5), 439-445. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.08.013>
- Karthikesalingam, A., Holt, P. J. E., Moxey, P., Jones, K. G., Thompson, M. M. et Hinchliffe, R. J. (2010). A systematic review of scoring systems for diabetic foot ulcers. *Diabetic Medicine*, 27(5), 544-549. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2010.02989.x>
- Kaul, K., Tarr, J. M., Ahmad, S., Kohner, E. M. et Chibber, R. (2012). Introduction To Diabetes Mellitus. Dans *Ahmad, S.I. (eds) Diabetes* (vol. 771, chap. Introducti, p. 1-11). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5441-0_1
- Khedkar, S., Prabhakara, S., Loganathan, R. M., Chandana, S., Gowda, M., Arakere, G. et Seshasayee, A. S. N. (2012). Draft genome sequence of staphylococcus aureus ST672, an emerging disease clone from India. *Journal of Bacteriology*, 194(24), 6946-6947. <https://doi.org/10.1128/JB.01868-12>
- Kim, J. J., Lydecker, A., Davé, R., Bork, J. T. et Roghmann, M. C. (2020). Diabetic foot infections: Local prevalence of and case-control study of risk factors for methicillin-resistant staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa. *Open Forum Infectious Diseases*, 7(10), 1-4. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa412>
- Kutlu, S. S., Cevahir, N., Akalin, S., Akin, F., Dirgen Caylak, S., Bastemir, M. et Tekin, K. (2012). Prevalence and risk factors for methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization in a diabetic outpatient population: A prospective cohort study. *American Journal of Infection Control*, 40(4), 365-368. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2011.05.009>
- L. Bowling, F., U. Dissanayake, S. et B. Jude, E. (2012). Opportunistic Pathogens in Diabetic Foot Lesions. *Current Diabetes Reviews*, 8(3), 195-199.
<https://doi.org/10.2174/157339912800563990>

Références bibliographiques

- Lagier, J. C., Hugon, P., Khelaifia, S., Fournier, P. E., La Scola, B. et Raoult, D. (2015). The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 237-264. <https://doi.org/10.1128/CMR.00014-14>
- Lahoti, A. et Kamat, D. (2018). *Pediatric endocrinology. Pediatric Annals* (vol. 47). <https://doi.org/10.3928/19382359-20171214-05>
- Larsen, M. V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R. L., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontén, T., Ussery, D. W., Aarestrup, F. M. et Lund, O. (2012). Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1355-1361. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>
- Lavery, L. A., Armstrong, D. G. et Harkless, L. B. (1996). Classification of diabetic foot wounds. *Journal of Foot and Ankle Surgery*, 35(6), 528-531. [https://doi.org/10.1016/S1067-2516\(96\)80125-6](https://doi.org/10.1016/S1067-2516(96)80125-6)
- Lavery, L. A., Armstrong, D. G., Wunderlich, R. P., Mohler, M. J., Wendel, C. S. et Lipsky, B. A. (2006). Risk factors for foot infections in individuals with diabetes. *Diabetes Care*, 29(6), 1288-1293. <https://doi.org/10.2337/dc05-2425>
- Lavery, L. A., Suludere, M. A., Ryan, E., Crisolago, P. A., Tarricone, A., Malone, M. et Oz, O. K. (2024). The infected diabetic foot: Analysis of diabetic and non-diabetic foot infections. *Wound Repair and Regeneration*, 32(4), 360-365. <https://doi.org/10.1111/wrr.13162>
- Lavigne, J.-P., Sotto, A., Dunyach-Remy, C. et Lipsky, B. A. (2015). New Molecular Techniques to Study the Skin Microbiota of Diabetic Foot Ulcers. *Advances in Wound Care*, 4(1), 38-49. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0532>
- Lecube, A., Pachón, G., Petriz, J., Hernández, C. et Simó, R. (2011). Phagocytic activity is impaired in type 2 diabetes mellitus and increases after metabolic improvement. *PLoS ONE*, 6(8), 6-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023366>
- Legendre, P. et Legendre, L. (2014). Summary for Policymakers. Dans *Climate Change 2013 – The Physical Science Basis* (vol. 20, p. 1-30). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Lienard, A., Hosny, M., Jneid, J., Schuldiner, S., Cellier, N., Sotto, A., Scola, B. La, Lavigne, J. P. et Pantel, A. (2021). *Escherichia coli* isolated from diabetic foot osteomyelitis: Clonal diversity, resistance profile, virulence potential, and genome adaptation. *Microorganisms*, 9(2), 1-17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020380>
- Lin, S. Y., Lin, N. Y., Huang, Y. Y., Hsieh, C. C. et Huang, Y. C. (2020). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection among patients with diabetic foot ulcer. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 53(2), 292-299. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2018.03.005>
- Lipsky, B. A. (1997). Osteomyelitis of the foot in diabetic patients. *Clinical Infectious Diseases*, 25(6), 1318-1326. <https://doi.org/10.1086/516148>
- Lipsky, B. A., Aragón-Sánchez, J., Diggle, M., Embil, J., Kono, S., Lavery, L., Senneville, É., Urbančič-Rovan, V., Van Asten, S. et Peters, E. J. G. (2016). IWGDF guidance on the diagnosis and management of foot infections in persons with diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 32(S1), 45–74. <https://doi.org/10.1002/dmrr>
- Lipsky, B. A., Berendt, A. R., Cornia, P. B., Pile, J. C., Peters, E. J. G., Armstrong, D. G., Deery, H. G., Embil, J. M., Joseph, W. S., Karchmer, A. W., Pinzur, M. S., Senneville, E. et America., I. D. S. of. (2012a). 2012 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Diabetic Foot Infections. *Clin Infect Dis*, 54(12), e132-e173. <https://doi.org/10.1093/cid/cis346>
- Lipsky, B. A., Berendt, A. R., Deery, H. G., Embil, J. M., Joseph, W. S., Karchmer, A. W.,

Références bibliographiques

- LeFrock, J. L., Lew, D. P., Mader, J. T., Norden, C., Tan, J. S. et al. (2012b). Diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clinical Infectious Diseases*, 23(6), 431-441. <https://doi.org/10.7547/0950183>
- Lipsky, B. A., Senneville, É., Abbas, Z. G., Aragón-Sánchez, J., Diggle, M., Embil, J. M., Kono, S., Lavery, L. A., Malone, M., van Asten, S. A., Urbančič-Rovan, V., Peters, E. J. G. et International Working Group on the Diabetic Foot (IWGDF). (2020). Guidelines on the diagnosis and treatment of foot infection in persons with diabetes (IWGDF 2019 update). *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 36(Suppl 1), e3280. <https://doi.org/10.1002/dmrr.3280>
- Löndahl, M., Katzman, P., Fredholm, O., Nilsson, A. et Apelqvist, J. (2008). Is chronic diabetic foot ulcer an indicator of cardiac disease? *Journal of Wound Care*, 17(1), 12-16. <https://doi.org/10.12968/jowc.2008.17.1.27915>
- Luo, Z., Chen, M., Chen, T., She, P. et Wu, Y. (2019). Lactic Acid Produced by Glycolysis Contributed to Staphylococcus aureus Aggregation Induced by Glucose. *Current Microbiology*, 76(5), 607-612. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01666-z>
- Macdonald, K. E., Boeckh, S., Stacey, H. J. et Jones, J. D. (2021). The microbiology of diabetic foot infections: a meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 21, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06516-7>
- Macdonald, K. E., Jordan, C. Y., Crichton, E., Barnes, J. E., Harkin, G. E., Hall, L. M. L. et Jones, J. D. (2020). A retrospective analysis of the microbiology of diabetic foot infections at a Scottish tertiary hospital. *BMC Infectious Diseases*, 20(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4923-1>
- Madigan, M., & Martinko, J. (2007). *Brock. Biologie des micro-organismes* (11 e éditi).
- Magnan, C., Pantel, A., Dubois, A., Dunyach-Remy, C., Loubet, P., Sotto, A. et Lavigne, J.-P. (2022). Physiopathologie, écologie et diagnostic microbiologique des ostéites du pied chez le patient vivant avec un diabète sucré. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2022(546), 36-44. [https://doi.org/10.1016/s1773-035x\(22\)00311-2](https://doi.org/10.1016/s1773-035x(22)00311-2)
- Maity, S., Leton, N., Nayak, N., Jha, A., Anand, N., Thompson, K., Boothe, D., Cromer, A., Garcia, Y., Al-Islam, A. et Nauhria, S. (2024). A systematic review of diabetic foot infections: pathogenesis, diagnosis, and management strategies. *Frontiers in Clinical Diabetes and Healthcare*, 5(August), 1-14. <https://doi.org/10.3389/fcdhc.2024.1393309>
- Makeri, D., Odoki, M., Eilu, E. et Agwu, E. (2023). Update on prevalence and antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa isolated from diabetic foot ulcers in Africa: a systematic review and meta-analysis. *Bulletin of the National Research Centre*, 47(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-023-01119-5>
- Malone, M., Johani, K., Jensen, S. O., Gosbell, I. B., Dickson, H. G., Hu, H. et Vickery, K. (2017). Next Generation DNA Sequencing of Tissues from Infected Diabetic Foot Ulcers. *EBioMedicine*, 21, 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.06.026>
- McDermott, K., Fang, M., Boulton, A. J. M., Selvin, E. et Hicks, C. W. (2023). Etiology, Epidemiology, and Disparities in the Burden of Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes Care*, 46(1), 209-211. <https://doi.org/10.2337/dci22-0043>
- McManus, B. A., Daly, B., Polyzois, I., Wilson, P., Brennan, G. I., Fleming, T. E., Grealay, L. D., Healy, M. L. et Coleman, D. C. (2020). Comparative Microbiological and Whole-Genome Analysis of Staphylococcus aureus Populations in the Oro-Nasal Cavities, Skin and Diabetic Foot Ulcers of Patients With Type 2 Diabetes Reveals a Possible Oro-Nasal Reservoir for Ulcer Infection. *Frontiers in Microbiology*, 11, 748. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00748>
- Meggitt, B. (1976). Surgical management of the diabetic foot. *Br J Hosp Med*, 16, 227-332.
- Messad, N., Landraud, L., Canivet, B., Lina, G., Richard, J. L., Sotto, A., Lavigne, J. P., Lemichez, E. et French Study Group on the Diabetic Foot. (2013). Distribution of edin in

Références bibliographiques

- Staphylococcus aureus isolated from diabetic foot ulcers. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(9), 875-880. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12084>
- Mills, J. L., Conte, M. S., Armstrong, D. G., Pomposelli, F. B., Schanzer, A., Sidawy, A. N. et Andros, G. (2014). The society for vascular surgery lower extremity threatened limb classification system: Risk stratification based on Wound, Ischemia, and foot Infection (WIFI). *Journal of Vascular Surgery*, 59(1), 220-234.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2013.08.003>
- Mitra, S., Gilbert, J. A., Field, D. et Huson, D. H. (2010). Comparison of multiple metagenomes using phylogenetic networks based on ecological indices. *ISME Journal*, 4(10), 1236-1242. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.51>
- Mitra, S., Rupek, P., Richter, D. C., Ulrich, T., Gilbert, J. A., Meyer, F., Wilke, A. et Huson, D. H. (2011). Functional analysis of metagenomes and metatranscriptomes using SEED and KEGG. *BMC Bioinformatics*, 12(SUPPL. 1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-S1-S21>
- Miyan, Z., Fawwad, A., Sabir, R. et Basit, A. (2017). Microbiological pattern of diabetic foot infections at a tertiary care center in a developing country. *Journal of the Pakistan Medical Association*, 67(5), 665-669.
- Monecke, S., Coombs, G., Shore, A. C., Coleman, D. C., Akpaka, P., Borg, M., Chow, H., Ip, M., Jatzwauk, L., Jonas, D., Kadlec, K., Kearns, A., Laurent, F., O'Brien, F. G., Pearson, J., Ruppelt, A., Schwarz, S., Scicluna, E., Slickers, P., ... Ehricht, R. (2011). A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *PLoS ONE*, 6(4), e17936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017936>
- Monteiro-Soares, M., Boyko, E. J., Jeffcoate, W., Mills, J. L., Russell, D., Morbach, S. et Game, F. (2020). Diabetic foot ulcer classifications: A critical review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 36(S1), 1-16. <https://doi.org/10.1002/dmrr.3272>
- Morgan, S. J., Lippman, S. I., Bautista, G. E., Harrison, J. J., Harding, C. L., Gallagher, L. A., Cheng, A. C., Siehnel, R., Ravishankar, S., Usui, M. L., Olerud, J. E., Fleckman, P., Wolcott, R. D., Manoil, C. et Singh, P. K. (2019). Bacterial fitness in chronic wounds appears to be mediated by the capacity for high-density growth, not virulence or biofilm functions. *PLoS Pathogens*, 15(3), 1-27. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007511>
- Morsli, M., Salipante, F., Magnan, C., Dunyach-Remy, C., Sotto, A. et Lavigne, J.-P. (2024). Direct metagenomics investigation of non-surgical hard-to-heal wounds: a review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 23(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s12941-024-00698-z>
- Moura Neto, A., Zantut-Wittmann, D. E., Fernandes, T. D., Nery, M. et Parisi, M. C. R. (2013). Risk factors for ulceration and amputation in diabetic foot: Study in a cohort of 496 patients. *Endocrine*, 44(1), 119-124. <https://doi.org/10.1007/s12020-012-9829-2>
- Mponponsoo, K., Sibbald, R. G. et Somayaji, R. (2021). A Comprehensive Review of the Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Diabetic Foot Infections. *Advances in Skin and Wound Care*, 34(11), 574-581. <https://doi.org/10.1007/01.ASW.0000791876.10485.d4>
- Murray, P. R. (2014). The Clinician and the Microbiology Laboratory. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 1(January), 191-223. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00016-3>
- Mutonga, D. M., Mureithi, M. W., Ngugi, N. N. et Otieno, F. C. F. (2019). Bacterial isolation and antibiotic susceptibility from diabetic foot ulcers in Kenya using microbiological tests and comparison with RT-PCR in detection of S. aureus and MRSA. *BMC Research Notes*, 12(1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4278-0>
- Nandhini, L. P., Kamalanathan, S. et Sahoo, J. (2023). Definition, Diagnostic Criteria, Screening, Diagnosis, and Classification of Diabetes and Categories of Glucose

Références bibliographiques

- Intolerance: An Update. Dans J. Rodriguez-Saldana (dir.), *The Diabetes Textbook: Clinical Principles, Patient Management and Public Health* (vol. 2019, p. 71-85). Springer International Publishing.
- Nather, A., Bee, C. S., Chan, Y. H., Chew, J. L. L., Lin, C. B., Neo, S. et Sim, E. Y. (2008). Epidemiology of diabetic foot problems and predictive factors for limb loss. *Journal of Diabetes and its Complications*, 22(2), 77-82.
<https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2007.04.004>
- Natsis, N. E. et Cohen, P. R. (2018). Coagulase-Negative Staphylococcus Skin and Soft Tissue Infections. *American Journal of Clinical Dermatology*, 19(5), 671-677.
<https://doi.org/10.1007/s40257-018-0362-9>
- Nguyen, M. T. T., Ahern, N. R. et Train, M. K. (2020). Staphylococcus schleiferi diabetic foot osteomyelitis and bacteraemia in an immunocompromised host. *BMJ Case Reports*, 13(11), e238302. <https://doi.org/10.1136/bcr-2020-238302>
- Nikoloudi, M., Eleftheriadou, I., Tentolouris, A., Kosta, O. A. et Tentolouris, N. (2018). Diabetic Foot Infections: Update on Management. *Current Infectious Disease Reports*, 20(10). <https://doi.org/10.1007/s11908-018-0645-6>
- O'Connor, A. M., McManus, B. A., Kinnevey, P. M., Brennan, G. I., Fleming, T. E., Cashin, P. J., O'Sullivan, M., Polyzois, I. et Coleman, D. C. (2018). Significant enrichment and diversity of the Staphylococcal arginine catabolic mobile element ACME in Staphylococcus epidermidis isolates from subgingival peri-implantitis sites and periodontal pockets. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1558.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01558>
- Oates, A., Bowling, F. L., Boulton, A. J. M. et McBaina, A. J. (2012). Molecular and culture-based assessment of the microbial diversity of diabetic chronic foot wounds and contralateral skin sites. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(7), 2263-2271.
<https://doi.org/10.1128/JCM.06599-11>
- Oliveira, D. C., Tomasz, A. et De Lencastre, H. (2001). The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: Identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated mec elements. *Microbial Drug Resistance*, 7(4), 349-361. <https://doi.org/10.1089/10766290152773365>
- OMS. (2016). *Global Report on Diabetes; Executive Summary*.
https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/204874/WHO_NMH_NVI_16.3_eng.pdf;jsessionid=92CA019E41D6F2F42F433B58130916C6?sequence=1
- OMS. (2020). *Diagnosis and management of type 2 diabetes (HEARTS-D)*., No. WHO/UC, 1-35. <https://www.who.int/publications/i/item/who-ucn-ncd-20.1>
- OMS. (2023). *Diabète*. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
- Ondov, B. D., Bergman, N. H. et Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics*, 12, 385.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385>
- Ong, K. L., Stafford, L. K., McLaughlin, S. A., Boyko, E. J., Vollset, S. E., Smith, A. E., Dalton, B. E., Duprey, J., Cruz, J. A., Hagins, H., Lindstedt, P. A., Aali, A., Abate, Y. H., Abate, M. D., Abbasian, M., Abbasi-Kangevari, Z., Abbasi-Kangevari, M., ElHafeez, S. A., Abd-Rabu, R., ... Vos, T. (2023). Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet*, 402(10397), 203-234.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01301-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01301-6)
- Ouchenane, Z., Smati, F., Rolain, J. M. et Raoult, D. (2011). Molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates in Algeria. *Pathologie Biologie*, 59(6), e129-e132. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.11.004>
- Oyibo, S. O., Jude, E. B., Tarawneh, I., Nguyen, H. C., Harkless, L. B. et Boulton, A. J. M.

Références bibliographiques

- (2001). A Comparison of Two Diabetic Foot Ulcer Classification Systems. *Diabetes Care*, 24(1), 84-88. <https://doi.org/10.2337/diacare.24.1.84>
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A. et Parkhill, J. (2015). Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691-3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>
- Park, J. U., Oh, B., Lee, J. P., Choi, M. H., Lee, M. J. et Kim, B. S. (2019). Influence of Microbiota on Diabetic Foot Wound in Comparison with Adjacent Normal Skin Based on the Clinical Features. *BioMed Research International*, 2019(1), 7459236. <https://doi.org/10.1155/2019/7459236>
- Park, S., Rich, J., Hanses, F. et Lee, J. C. (2009). Defects in innate immunity predispose C57BL/6J-Lepr db/Lepr db Mice to infection by staphylococcus aureus. *Infection and Immunity*, 77(3), 1008-1014. <https://doi.org/10.1128/IAI.00976-08>
- Paul, S. K., Ghosh, S., Kawaguchiya, M., Urushibara, N., Hossain, M. A., Ahmed, S., Mahmud, C., Jilani, M. S. A., Haq, J. A., Ahmed, A. A. et Kobayashi, N. (2014). Detection and genetic characterization of PVL-positive ST8-MRSA-IVa and exfoliative toxin d-positive European CA-MRSA-Like ST1931 (CC80) MRSA-IVa strains in Bangladesh. *Microbial Drug Resistance*, 20(4), 325-336. <https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0153>
- Paula, D. de, Bracco, P. et Gregg, E. W. (2023). The Dynamics of Diabetes Prevalence, Morbidity, and Mortality. Dans J. Rodriguez-saldana (dir.), *The Diabetes Textbook*.
- Perzon, O., Cahn, A., Gellman, Y. N., Leibovitch, M., Peled, S., Elishoov, O., Haze, A., Olshtain-Pops, K. et Elinav, H. (2023). Enterococci in Diabetic Foot Infections: Prevalence, Clinical Characteristics, and Outcomes. *Open Forum Infectious Diseases*, 10(5), 1-8. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofad238>
- Peters, E. J. G., Lavery, L. A. et Armstrong, D. G. (2005). Diabetic lower extremity infection: Influence of physical, psychological, and social factors. *Journal of Diabetes and its Complications*, 19(2), 107-112. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2004.06.002>
- Petkovšek, Ž., Eleršič, K., Gubina, M., Žgur-Bertok, D. et Erjavec, M. S. (2009). Virulence potential of Escherichia coli isolates from skin and soft tissue infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(6), 1811-1817. <https://doi.org/10.1128/JCM.01421-08>
- Pitocco, D., Spanu, T., Di Leo, M., Vitiello, R., Rizzi, A., Tartaglione, L., Fiori, B., Caputo, S., Tinelli, G., Zaccardi, F., Flex, A., Galli, M., Pontecorvi, A. et Sanguinetti, M. (2019). Diabetic foot infections: A comprehensive overview. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(2), 26-37. https://doi.org/10.26355/EURREV_201904_17471
- Pop-Busui, R., Boulton, A. J. M., Feldman, E. L., Bril, V., Freeman, R., Malik, R. A., Sosenko, J. M. et Ziegler, D. (2017). Diabetic neuropathy: A position statement by the American diabetes association. *Diabetes Care*, 40(1), 136-154. <https://doi.org/10.2337/dc16-2042>
- Pouget, C., Dunyach-Remy, C., Pantel, A., Schuldiner, S., Sotto, A. et Lavigne, J. P. (2020). Biofilms in diabetic foot ulcers: Significance and clinical relevance. *Microorganisms*, 8(10), 1580. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101580>
- Pouget, C., Gustave, C. A., Ngba-Essebe, C., Laurent, F., Lemichez, E., Tristan, A., Sotto, A., Dunyach-Rémy, C. et Lavigne, J. P. (2021). Adaptation of Staphylococcus aureus in a Medium Mimicking a Diabetic Foot Environment. *Toxins*, 13(3). <https://doi.org/10.3390/TOXINS13030230>
- Radzieta, M., Sadeghpour-Heravi, F., Peters, T. J., Hu, H., Vickery, K., Jeffries, T., Dickson, H. G., Schwarzer, S., Jensen, S. O. et Malone, M. (2021). A multiomics approach to identify host-microbe alterations associated with infection severity in diabetic foot

Références bibliographiques

- infections: a pilot study. *npj Biofilms and Microbiomes*, 7:29.
<https://doi.org/10.1038/s41522-021-00202-x>
- Rai, N. K., Suryabhan, Ansari, M., Kumar, M., Shukla, V. K. et Tripathi, K. (2005). Effect of glycaemic control on apoptosis in diabetic wounds. *Journal of wound care*, 14(6), 277-281. <https://doi.org/10.12968/jowc.2005.14.6.26792>
- Rajab, A. A. H. et Hegazy, W. A. H. (2023). What's old is new again: Insights into diabetic foot microbiome. *World Journal of Diabetes*, 14(6), 680-704.
<https://doi.org/10.4239/wjd.v14.i6.680>
- Rajha, H., Alsheikh, R., Zar, A., Mohsen, S. et M. Zughaiar, S. (2024). Microbiology and Antimicrobial Resistance in Diabetic Foot Infections. Dans *Diabetic Foot Ulcers - Pathogenesis, Innovative Treatments and AI Applications*. IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.1004761>
- Ramakant, P., Verma, A. K., Misra, R., Prasad, K. N., Chand, G., Mishra, A., Agarwal, G., Agarwal, A. et Mishra, S. K. (2011). Changing microbiological profile of pathogenic bacteria in diabetic foot infections: time for a rethink on which empirical therapy to choose? *Diabetologia*, 54(1), 58-64. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1893-7>
- Ramdani-Bouguessa, N., Bes, M., Meugnier, H., Forey, F., Reverdy, M. E., Lina, G., Vandenesch, F., Tazir, M. et Etienne, J. (2006). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(3), 1083-1085. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.3.1083-1085.2006>
- Ranjan, A., Shaik, S., Nandanwar, N., Hussain, A., Tiwari, S. K., Semmler, T., Jadhav, S., Wieler, L. H., Alam, M., Colwell, R. R. et Ahmed, N. (2017). Comparative genomics of *Escherichia coli* isolated from skin and soft tissue and other extraintestinal infections. *mBio*, 8(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.01070-17>
- Ranjan, R., Rani, A., Metwally, A., McGee, H. S. et Perkins, D. L. (2016). Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 469(4), 967-977.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.083>
- Rasmussen, G., Monecke, S., Ehrlich, R. et Söderquist, B. (2013). Prevalence of Clonal Complexes and Virulence Genes among Commensal and Invasive *Staphylococcus aureus* Isolates in Sweden. *PLoS ONE*, 8(10), e77477.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077477>
- Raspovic, K. M. et Wukich, D. K. (2014). Self-reported quality of life and diabetic foot infections. *Journal of Foot and Ankle Surgery*, 53(6), 716-719.
<https://doi.org/10.1053/j.jfas.2014.06.011>
- Redel, H., Gao, Z., Li, H., Alekseyenko, A. V., Zhou, Y., Perez-Perez, G. I., Weinstock, G., Sodergren, E. et Blaser, M. J. (2013). Quantitation and composition of cutaneous microbiota in diabetic and nondiabetic men. *Journal of Infectious Diseases*, 207(7), 1105-1114. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit005>
- Richard, J. L., Sotto, A., Jourdan, N., Combescure, C., Vannereau, D., Rodier, M. et Lavigne, J. P. (2008). Risk factors and healing impact of multidrug-resistant bacteria in diabetic foot ulcers. *Diabetes and Metabolism*, 34(4), 363-369.
<https://doi.org/10.1016/j.diabet.2008.02.005>
- Roberts, A. D. et Simon, G. L. (2012). Diabetic foot infections: The role of microbiology and antibiotic treatment. *Seminars in Vascular Surgery*, 25(2), 75-81.
<https://doi.org/10.1053/j.semvascsurg.2012.04.010>
- Rodrigues, B. T., Vangaveti, V. N., Urkude, R., Biros, E. et Malabu, U. H. (2022). Prevalence and risk factors of lower limb amputations in patients with diabetic foot ulcers: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical*

Références bibliographiques

- Research and Reviews*, 16(2), 102397. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2022.102397>
- Rogers, K. L., Fey, P. D. et Rupp, M. E. (2009). Coagulase-Negative Staphylococcal Infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, 23(1), 73-98. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2008.10.001>
- Rolo, J., Miragaia, M., Turlej-Rogacka, A., Empel, J., Bouchami, O., Faria, N. A., Tavares, A., Hryniewicz, W., Fluit, A. C., de Lencastre, H. et CONCORD Working Group. (2012). High genetic diversity among community-associated staphylococcus aureus in europe: Results from a multicenter study. *PLoS ONE*, 7(4), e34768. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034768>
- Rosboth, S., Lechleitner, M. et Oberaigner, W. (2021). Risk factors for diabetic foot complications in type 2 diabetes—A systematic review. *Endocrinology, Diabetes and Metabolism*, 4(1), 1-32. <https://doi.org/10.1002/edm2.175>
- Rother, K. I. (2007). Diabetes Treatment — Bridging the Divide. *New England Journal of Medicine*, 356(15), 1499-1501. <https://doi.org/10.1056/NEJMp078030>
- Saeed, K., Esposito, S., Akram, A., Ascione, T., Bal, A. M., Bassetti, M., Carnelutti, A., Chan, M., Davis, J., Dryden, M., Farhan, M. F. M., Fernando, S., Gottlieb, T., Gould, I., Yildiz, M., LYE, D. C., Pagliano, P., Poole, S., Pottinger, P. S., ... Yalcin, A. N. (2020). Hot topics in diabetic foot infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(6), 105942. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105942>
- Schaper, N. C. (2004). Diabetic foot ulcer classification system for research purposes: A progress report on criteria for including patients in research studies. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 20(SUPPL. 1), 90-95. <https://doi.org/10.1002/dmrr.464>
- Schaper, N. C., Van Netten, J. J., Apelqvist, J., Bus, S. A., Hinchliffe, R. J. et Lipsky, B. A. (2019). Recommandations pratiques de l' IWGDF sur la prévention et la prise en charge du pied diabétique. *The International Working Group on the Diabetic Foot*, 101.
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Senneville, E. et Robineau, O. (2021). Diabetic foot osteomyelitis. *Bone and Joint Infections: From Microbiology to Diagnostics and Treatment*, 337-351. <https://doi.org/10.1002/9781119720676.ch21>
- Shahrokh, S., Tabatabaee, A., Yazdi, M. et Siavash, M. (2024). Proportion of toxin and non-toxin virulence factors of Staphylococcus aureus isolates from diabetic foot infection: a systematic review and meta-analysis. *BMC Microbiology*, 24(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03142-y>
- Shambat, S., Nadig, S., Prabhakara, S., Bes, M., Etienne, J. et Arakere, G. (2012). Clonal complexes and virulence factors of Staphylococcus aureus from several cities in India. *BMC Microbiology*, 12(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-64>
- Shettigar, K., Jain, S., Bhat, D. V., Acharya, R., Ramachandra, L., Satyamoorthy, K. et Murali, T. S. (2016). Virulence determinants in clinical Staphylococcus aureus from monomicrobial and polymicrobial infections of diabetic foot ulcers. *Journal of Medical Microbiology*, 65(12), 1392-1404. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000370>
- Shettigar, K. et Murali, T. S. (2020). Virulence factors and clonal diversity of Staphylococcus aureus in colonization and wound infection with emphasis on diabetic foot infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 39(12), 2235-2246. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03984-8>
- Siemens, N. et Lütticken, R. (2021). Streptococcus pyogenes (“group a streptococcus”), a highly adapted human pathogen—potential implications of its virulence regulation for epidemiology and disease management. *Pathogens*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/pathogens10060776>

Références bibliographiques

- Silva, V., Almeida, F., Carvalho, J. A., Castro, A. P., Ferreira, E., Manageiro, V., Tejedor-Junco, M. T., Caniça, M., Igrejas, G. et Poeta, P. (2020). Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* EMRSA-15 clone as the predominant cause of diabetic foot ulcer infections in Portugal. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 39(1), 179-186. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03709-6>
- Smith, J. T., Amador, S., McGonagle, C. J., Needle, D., Gibson, R. et Andam, C. P. (2020). Population genomics of *Staphylococcus pseudintermedius* in companion animals in the United States. *Communications Biology*, 3(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1009-y>
- Smith, K., Collier, A., Townsend, E. M., O'Donnell, L. E., Bal, A. M., Butcher, J., MacKay, W. G., Ramage, G. et Williams, C. (2016). One step closer to understanding the role of bacteria in diabetic foot ulcers: Characterising the microbiome of ulcers. *BMC Microbiology*, 16, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0665-z>
- Sohn, M.-W., Budiman-Mak, E., Lee, T. A., Oh, E. et Stuck, R. M. (2014). Significant J-shaped association between body mass index (BMI) and diabetic foot ulcers. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 32(30), 13-23. <https://doi.org/10.1002/dmrr>
- Sotto, A., Lina, G., Combescure, C., Bourg, G., Vidal, L., Jourdan, N., Etienne, J. et Lavigne, J.-P. (2008). Virulence Potential of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated From Diabetic Foot Ulcers: a new paradigm. *Diabetes Care*, 31(12), 2318-2324. <https://doi.org/10.2337/dc08-1010>
- Sotto, A., Richard, J.-L., Jourdan, N., Combescure, C., Bouziges, N. et Lavigne, J.-P. (2007). Miniaturized Oligonucleotide Arrays. *Diabetes Care*, 30(8), 2051-2056. <https://doi.org/10.2337/dc07-0461>
- Spaulding, A. R., Salgado-Pabón, W., Kohler, P. L., Horswill, A. R., Leung, D. Y. M. et Schlievert, P. M. (2013). Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 422-447. <https://doi.org/10.1128/CMR.00104-12>
- Spichler, A., Hurwitz, B. L., Armstrong, D. G. et Lipsky, B. A. (2015). Microbiology of diabetic foot infections: From Louis Pasteur to « crime scene investigation ». *BMC Medicine*, 13(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0232-0>
- Spoor, L. E., McAdam, P. R., Weinert, L. A., Rambaut, A., Hasman, H., Aarestrup, F. M., Kearns, A. M., Larsen, A. R., Skov, R. L. et Ross Fitzgerald, J. (2013). Livestock origin for a human pandemic clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *mBio*, 4(4), e00356-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00356-13>
- Stacey, H. J., Clements, C. S., Welburn, S. C. et Jones, J. D. (2019). The prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among diabetic patients: a meta-analysis. *Acta Diabetologica*, 56(8), 907-921. <https://doi.org/10.1007/s00592-019-01301-0>
- Stappers, M. H. T., Hagen, F., Reimnitz, P., Mouton, J. W., Meis, J. F. et Gyssens, I. C. (2015). Direct molecular versus culture-based assessment of Gram-positive cocci in biopsies of patients with major abscesses and diabetic foot infections. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34, 1885-1892. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2428-4>
- Taha, A. B. (2013). Relationship and susceptibility profile of *Staphylococcus aureus* infection diabetic foot ulcers with *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Foot*, 23(1), 11-16. <https://doi.org/10.1016/j.foot.2012.10.003>
- Takeuchi, F., Sekizuka, T., Yamashita, A., Ogasawara, Y., Mizuta, K. et Kuroda, M. (2014). MePIC, metagenomic pathogen identification for clinical specimens. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 67(1), 62-65. <https://doi.org/10.7883/yoken.67.62>
- Taki, E., Jabalameli, F., Tehrani, M. R. M., Feizabadi, M. M., Halimi, S., Sanjari, M., Amini, M. R., Beigverdi, R. et Emaneini, M. (2023). Molecular Characteristics of

Références bibliographiques

- Staphylococcus aureus Strains Isolated from Nasal Cavity and Wound Infections Among Diabetic Patients. *Current Microbiology*, 80(5), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03262-8>
- Teixeira, N. B., Castelo Branco Fortaleza, C. M., de Souza, M. C., Monteiro Pereira, T. A., de Camargo Colenci, B. P. et Ribeiro de Souza da Cunha, M. de L. (2021). Molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus among insulin-dependent diabetic individuals in Brazil. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 20(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00401-y>
- Tentolouris, N., Petrikos, G., Vallianou, N., Zachos, C., Daikos, G. L., Tsapogas, P., Markou, G. et Katsilambros, N. (2006). Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in infected and uninfected diabetic foot ulcers. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(2), 186-189. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01279.x>
- Teraon, Y. (2012). The virulence factors and pathogenic mechanisms of Streptococcus pyogenes. *Journal of Oral Biosciences*, 54(2), 96-100. <https://doi.org/10.1016/j.job.2012.02.004>
- Tomic-Canic, M., Perez-Perez, G. I. et Blumenberg, M. (2014). Cutaneous microbiome studies in the times of affordable sequencing. *Journal of Dermatological Science*, 75(2), 82-87. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2014.05.001>
- Tomic, D., Shaw, J. E. et Magliano, D. J. (2022). The burden and risks of emerging complications of diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 18(9), 525-539. <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00690-7>
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L. et Fowler, V. G. (2015). Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603-661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
- Tristan, A., Bes, M., Meugnier, H., Lina, G., Bozdogan, B., Courvalin, P., Reverdy, M. E., Enright, M. C., Vandenesch, F. et Etienne, J. (2007). Global distribution of Pantone-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant Staphylococcus aureus, 2006. *Emerging Infectious Diseases*, 13(4), 594-600. <https://doi.org/10.3201/eid1304.061316>
- Uberoi, A., Campbell, A. et Grice, E. A. (2020). The wound microbiome. *Wound Healing, Tissue Repair, and Regeneration in Diabetes*, 237-258. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816413-6.00012-5>
- Uçkay, I., K.Gariani, Pataky, Z. et B.A.Lipsky. (2014). Diabetic foot infections: state-of-the-art I. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 227-242.
- Udo, E. E., O'Brien, F. G., Al-Sweih, N., Noronha, B., Matthew, B. et Grubb, W. B. (2008). Genetic lineages of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Kuwait hospitals. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(10), 3514-3516. <https://doi.org/10.1128/JCM.00966-08>
- Udo, E. E. et Sarkhoo, E. (2010). The dissemination of ST80-SCCmec-IV community-associated methicillin resistant Staphylococcus aureus clone in Kuwait hospitals. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-31>
- Urish, K. L. et Cassat, J. E. (2020). Staphylococcus aureus Osteomyelitis: Bone, Bugs, and Surgery. *Infection and Immunity*, 88(7). <https://doi.org/10.1128/IAI.00932-19>
- van Belkum, A., Melles, D. C., Nouwen, J., van Leeuwen, W. B., van Wamel, W., Vos, M. C., Wertheim, H. F. L. et Verbrugh, H. A. (2009). Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by Staphylococcus aureus. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(1), 32-47. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.09.012>
- van Netten, J. J., Bus, S. A., Apelqvist, J., Lipsky, B. A., Hinchliffe, R. J., Game, F., Rayman,

Références bibliographiques

- G., Lazzarini, P. A., Forsythe, R. O., Peters, E. J. G., Senneville, É., Vas, P., Monteiro-Soares, M. et Schaper, N. C. (2020). Definitions and criteria for diabetic foot disease. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 36(S1), 1-6.
<https://doi.org/10.1002/dmrr.3268>
- Vandenesch, F., Lina, G. et Henry, T. (2012). Staphylococcus aureus Hemolysins, bi-component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(February), 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00012>
- Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M. C., Lina, G., Nimmo, G. R., Heffernan, H., Liassine, N., Bes, M., Greenland, T., Reverdy, M. E. et Etienne, J. (2003). Community-acquired methicillin-resistant staphylococcus aureus carrying panton-valentine leukocidin genes: Worldwide emergence. *Emerging Infectious Diseases*, 9(8), 978-984.
<https://doi.org/10.3201/eid0908.030089>
- Vestergaard, M., Frees, D. et Ingmer, H. (2019). Antibiotic resistance and the MRSA problem. *Gram-Positive Pathogens*, 747-765.
<https://doi.org/10.1128/9781683670131.ch47>
- Větrovský, T., Baldrian, P. et Morais, D. (2018). SEED 2: A user-friendly platform for amplicon high-throughput sequencing data analyses. *Bioinformatics*, 34(13), 2292-2294.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty071>
- Viquez-Molina, G., Aragón-Sánchez, J., Pérez-Corrales, C., Murillo-Vargas, C., López-Valverde, M. E. et Lipsky, B. A. (2018). Virulence Factor Genes in Staphylococcus aureus Isolated From Diabetic Foot Soft Tissue and Bone Infections. *International Journal of Lower Extremity Wounds*, 17(1), 36-41.
<https://doi.org/10.1177/1534734618764237>
- von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H. et Peters, G. (2001). Nasal Carriage as a Source of Staphylococcus aureus Bacteremia. *New England Journal of Medicine*, 344(1), 11-16. <https://doi.org/10.1056/NEJM200101043440102>
- Vu, B. G., Stach, C. S., Salgado-Pabón, W., Diekema, D. J., Gardner, S. E. et Schlievert, P. M. (2014). Superantigens of Staphylococcus aureus from patients with diabetic foot ulcers. *Journal of Infectious Diseases*, 210(12), 1920-1927.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiu350>
- Vuong, C. et Otto, M. (2002). Staphylococcus epidermidis infections. *Microbes and Infection*, 18(4), 702-703. <https://doi.org/10.1017/S0021859600009278>
- Wagner, F. W. (1979). A classification and treatment program for diabetic, neuropathic, and dysvascular foot problems. *Instr Course Lect*, 28(1), 143-165.
- Wasfi, R., Hamed, S. M., Amer, M. A. et Fahmy, L. I. (2020). Proteus mirabilis Biofilm: Development and Therapeutic Strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(August), 1-14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00414>
- Wertheim, H. F. L., Melles, D. C., Vos, M. C., Van Leeuwen, W., Van Belkum, A., Verbrugh, H. A. et Nouwen, J. L. (2005). The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. *Lancet Infectious Diseases*, 5(12), 751-762.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70295-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70295-4)
- Wertheim, H. F. L., Vos, M. C., Ott, A., Van Belkum, A., Voss, A., Kluytmans, J. A. J. W., Van Keulen, P. H. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Meester, M. H. M. et Verbrugh, H. A. (2004). Risk and outcome of nosocomial Staphylococcus aureus bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet*, 364(9435), 703-705.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16897-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16897-9)
- Williams, D. T., Hilton, J. R. et Harding, K. G. (2004). Diagnosing foot infection in diabetes. *Clinical Infectious Diseases*, 39(SUPPL. 2), 83-86. <https://doi.org/10.1086/383267>
- Yang, W. T., Chiang, I., Tseng, C. H., Cheng, C., Lin, J. H., Liu, P. Y. et Huang, Y. T.

Références bibliographiques

- (2022). Metagenomic Sequencing and Histology on a Chronic Wound Identified Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoma. *Evolutionary Bioinformatics*, 18, 0-4. <https://doi.org/10.1177/11769343221110663>
- Yao, Y., Sturdevant, D. E., Villaruz, A., Xu, L., Gao, Q. et Otto, M. (2005). Factors characterizing *Staphylococcus epidermidis* invasiveness determined by comparative genomics. *Infection and Immunity*, 73(3), 1856-1860. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1856-1860.2005>
- Zanella, M. C., Kressmann, B., Wuarin, L., Coulin, B., Maître, S., Suvà, D., Lipsky, B. A. et Uçkay, I. (2016). Microbiologie et traitement antibiotique du pied diabétique infecté. *Revue Medicale Suisse*, 12(514), 732-737. <https://doi.org/10.53738/revmed.2016.12.514.0732>
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F. M. et Larsen, M. V. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2640-2644. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>
- Zhang, P., Lu, J., Jing, Y., Tang, S., Zhu, D. et Bi, Y. (2017). Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis†. *Annals of Medicine*, 49(2), 106-116. <https://doi.org/10.1080/07853890.2016.1231932>
- Zhou, S., Hu, X., Wang, Y., Fei, W., Sheng, Y. et Que, H. (2024). The Global Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Patients with Diabetic Foot Ulcers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 17(February), 563-574. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S446911>
- Zou, M., Cai, Y., Hu, P., Cao, Y., Luo, X., Fan, X., Zhang, B., Wu, X., Jiang, N., Lin, Q., Zhou, H., Xue, Y. et Gao, F. (2020). Analysis of the composition and functions of the microbiome in diabetic foot osteomyelitis based on 16s rRNA and metagenome sequencing technology. *Diabetes*, 69(11), 2423-2439. <https://doi.org/10.2337/db20-0503>

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Prélèvement et transport des échantillons

But

Réaliser des prélèvements à partir des IPD, conformément aux bonnes pratiques. Ces prélèvements doivent impérativement être effectués par un spécialiste.

Matériel nécessaire

- Sérum physiologique stérile à 0,9 %
- Gaze stérile
- Flacons stériles avec bouchons
- Curette, scalpel ou seringue stérile

Procédure

1. Prélèvement à partir des IPD

a. Préparation de la plaie

Nettoyer soigneusement la plaie à l'aide de sérum physiologique stérile. L'utilisation d'un antiseptique est possible, mais celui-ci doit être éliminé par rinçage au sérum physiologique.

b. Méthode de prélèvement

- **Curetage** : réaliser un grattage en profondeur de la base de l'ulcère à l'aide d'une curette ou d'un scalpel stérile, en évitant les tissus nécrotiques superficiels.
- **Écouvillonnage profond** : frotter le fond de la plaie à l'aide d'un écouvillon stérile, en prenant soin d'éviter les bords de la plaie et la peau environnante, afin de limiter la contamination par la flore cutanée.

Annexes

2. Prélèvement à partir de la PSPC

Après un nettoyage au sérum physiologique stérile, les prélèvements de la PSPC ont été réalisés par écouvillonnage d'une zone d'environ 50 cm².

3. Transport des échantillons au laboratoire

Deux écouvillons doivent être prélevés pour chaque site (IPD et PSPC). L'un doit être placé dans un tube contenant 1 ml de sérum physiologique stérile (0,9 %, w/v) pour l'isolement des souches bactériennes, et l'autre dans un tube contenant un milieu de transport liquide DNA/RNA Shield (Zymo Research, USA) destiné au séquençage métagénomique.

Informations à indiquer sur les tubes de prélèvement

- Nom et prénom du patient
- Date de naissance
- Service prescripteur ou service de prélèvement
- Nom et fonction du préleveur
- Localisation et nature du prélèvement

Annexes

Annexe 2 : Fiche de prélèvement

Informations du patient :

Nom et Prénom :

Sexe :

Date de naissance :

Service de prélèvement:

Nom du service de prélèvement :

Nom et fonction du préleveur :

La localisation du site et nature du prélèvement :

Date et heure du prélèvement :

Les informations cliniques :

Antibiothérapie (antibiotique+durée de traitement):

Durée et stade de l'infection :

Signature :

Annexes

Annexe 3 : Composition de la gélose Chapman (pour 1 litre) :

Composant	Quantité (g/L)
Chlorure de sodium (NaCl)	75 g
Mannitol	10 g
Extrait de viande	1 g
Peptone	10 g
Rouge de phénol	0,025 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

Annexes

Annexe 4 : Informations sur le séquençage du génome entier des souches de *Staphylococcus* et *Mammaliicoccus* spp. isolées à partir des IPD et PSPC

BioProject PRJDB13730

BioProject Submission PSUB017704

DRA Submission DRA014296

BioSample Submission SSUB022133

Annexes

Annexe 5: Informations sur les souches de *Staphylococcus* et *Mammaliicoccus* spp. utilisées dans l'analyse du pangéome.

Species	Strain name	BioProject	Accession	Origin	Source
<i>S.aureus</i>	AA45	PRJNA64841 1	JAEOVO000000000	Egypt	Blood
<i>S.aureus</i>	S0924	PRJEB4745	CBWV000000000	USA	Urine
<i>S.aureus</i>	S1475	PRJNA22411 6	NZ_CBWW000000000	Netherlan ds	Tracheal aspirate
<i>S.aureus</i>	11819-97	PRJNA78269	CP003194	Denmark	Abscess
<i>S.aureus</i>	GR1	PRJNA22411 6	NZ_AJLX000000000	India	Blood
<i>S.aureus</i>	VB12268	PRJNA32110 9	LXWS000000000	India	Blood
<i>S.aureus</i>	VB1490	PRJNA34842 7	MLQB000000000	India	Blood
<i>S.aureus</i>	CM17	PRJNA22411 6	NZ_PZST000000000	Italy	Sputum
<i>S.aureus</i>	TW20	PRJNA22411 6	NC_017331	UK	NA
<i>S.aureus</i>	3688STDY6124945	PRJNA22411 6	NZ_FQJP000000000	Thailand	NA
<i>S.aureus</i>	MW2	PRJNA22411 6	NC_003923	USA	Blood
<i>S.aureus</i>	AA51	PRJNA22411 6	NZ_JAEVR000000000	Egypt	Pus
<i>S.aureus</i>	MSSA476	PRJNA266	BX571857	UK	Osteomyeliti s
<i>S.aureus</i>	3688STDY6125016	PRJEB9575	FQEO000000000	Thailand	NA
<i>S.aureus</i>	AA6	PRJNA22411 6	NZ_JAEVX000000000	Egypt	Aspirate
<i>S.aureus</i>	3688STDY6124880	PRJNA22411 6	NZ_FQKA000000000	Thailand	NA
<i>S.aureus</i>	3688STDY6124954	PRJNA22411 6	NZ_FQJV000000000	Thailand	NA
<i>S.aureus</i>	LK34	PRJNA50698 8	RAQY000000000	USA	DFU
<i>S.epidermidis</i>	14.1.R1	PRJNA35816 9		Denmark	Skin
<i>S.epidermidis</i>	SE68	PRJNA22411 6	NZ_WBQA000000000	UK	Blood
<i>S.epidermidis</i>	BB424986M	PRJNA22411 6	NZ_WBRH000000000	UK	Blood
<i>S.epidermidis</i>	BB403186T	PRJNA22411 6	NZ_WBRU000000000	UK	Blood
<i>S.epidermidis</i>	AK-612	PRJNA52557 8	SKCE000000000	India	Ear
<i>S.epidermidis</i>	C36	PRJNA22411 6	NZ_JADPYL000000000	South Africa	Blood
<i>S.epidermidis</i>	C40	PRJNA22411 6	NZ_JADPYJ000000000	South Africa	Blood
<i>S.epidermidis</i>	C146	PRJNA22411 6	NZ_JADWOP000000000	South Africa	Blood
<i>S.haemolyticu s</i>	AA12	PRJNA64841 1	JAEOVW000000000	Egypt	Pus
<i>S.haemolyticu s</i>	AA48	PRJNA64841 1	JAEOVZ000000000	Egypt	Pus
<i>S.haemolyticu s</i>	AA83	PRJNA64841 1	JAEOVZ000000000	Egypt	Blood
<i>S.haemolyticu s</i>	DE0439	PRJNA54369 2	VDSF000000000	USA	Environment al
<i>S.haemolyticu s</i>	SH_16	PRJEB32204	CAJCGR000000000	Norway	Groin

Annexes

<i>S. haemolyticus</i>	VB5326	PRJNA224116	SAMN10031557	India	Blood
<i>S. haemolyticus</i>	CN1219	PRJEB2705	CUFC00000000	UK	Human
<i>S. haemolyticus</i>	OG2	PRJNA375758	NCXH00000000	Germany	Kefir
<i>S. simulans</i>	CJ16	PRJNA294936	LJSL00000000	China	Surgical infection
<i>S. simulans</i>	1H5	PRJNA722783	JAGSWQ00000000	UK	NA
<i>S. simulans</i>	UMC-CNS-990	PRJNA221573	AXDY00000000	USA	Mammary gland
<i>S. simulans</i>	MR1	PRJNA321327		USA	Brain tissue
<i>S. simulans</i>	SNUC 1336	PRJNA342349	PZGM00000000	Canada	Mastitis
<i>S. simulans</i>	HAA294	PRJNA702288	JAFFRM00000000	Germany	Skin
<i>S. simulans</i>	NCTC 11046	PRJNA339206	PPRU00000000	UK	Skin
<i>S. capae</i>	9557	PRJNA273366	JXXP00000000	China	Cerebrospinal fluid
<i>S. capae</i>	JMUB145	PRJDB6943	AP018585	Japan	Blood
<i>S. capae</i>	JMUB590	PRJDB6943	AP018586	Japan	Nasal cavity
<i>S. capae</i>	JMUB898	PRJDB6943	AP018587	Japan	Graft infection
<i>S. capae</i>	M23864:W1	PRJNA34647	ACJB00000000	NA	NA
<i>S. capae</i>	1H22	PRJNA722783	JAGSWW00000000	UK	NA
<i>S. capae</i>	SY333	PRJNA626385		China	Puncture fluid
<i>S. hominis</i>	1H9	PRJNA722783	JAGSWT00000000	UK	NA
<i>S. hominis</i>	ZBW5	PRJNA163345	AKGC00000000	China	Skin
<i>S. hominis</i>	UFMG-H7B	PRJNA435944	JAAVMU00000000	Brazil	Urine
<i>S. hominis</i>	C5	PRJNA816516		USA	Skin
<i>S. hominis</i>	2842STDY5753564	PRJEB4909	FDPE00000000	Netherlands	Blood
<i>S. hominis</i>	acrll	PRJNA546603	JALCWP00000000	USA	Skin
<i>S. hominis</i>	384	PRJNA808897	JAKUUV00000000	Thailand	Skin wound
<i>S. hominis</i>	NC15	PRJNA636233	JAIBMT00000000	India	Milk
<i>S. hominis</i>	HAB38	PRJNA702288	JAFFRR00000000	Germany	Skin
<i>S. saprophyticus</i>	63	PRJNA352403	MPAV00000000	Japan	Urine
<i>S. saprophyticus</i>	SNUC 2120	PRJNA342349	PZHM00000000	Canada	Mastitis
<i>S. saprophyticus</i>	SS536	PRJNA328825	SDMA00000000	Brazil	Urine
<i>S. saprophyticus</i>	SW396	PRJNA524186	SJOX00000000	USA	Intestinal content
<i>S. saprophyticus</i>	CHK146-2161	PRJNA543206	DYUY00000000	Denmark	Feces
<i>S. saprophyticus</i>	VjHHoM0pEl_bin.12.MAG	PRJEB47281	CALUAP00000000	USA	Skin
<i>S. saprophyticus</i>	F2AH2Ly	PRJNA636233	JAIWMM00000000	India	NA
<i>S. saprophyticus</i>	HAF121	PRJNA702288	JAFFRP00000000	Germany	Skin
<i>S. saprophyticus</i>	FDAARGOS_168	PRJNA231221		USA	Urine

Annexes

<i>M.sciuri</i>	FDAARGOS_285	PRJNA231221		USA	NA
<i>M.sciuri</i>	82104	PRJNA678127		China	Urine
<i>M.sciuri</i>	WHA07	PRJNA741091		China	Bioaerosol of a chicken farm
<i>M.sciuri</i>	MIN-176	PRJNA769286		Pakistan	NA
<i>M.sciuri</i>	NS202	PRJNA278195	LDTM00000000	India	Oryza sativa
<i>M.sciuri</i>	BL01	PRJNA527079	SPPH00000000	UK	Mus musculus
<i>M.sciuri</i>	UFMG-H6	PRJNA435944	JAAMW00000000	Brazil	Urine
<i>M.sciuri</i>	NCTC12103	PRJEB6403		NA	Skin
<i>M.sciuri</i>	GDQ20D70P	PRJNA224116	JALGPB00000000	Ghana	Nasal cavity
<i>M.sciuri</i>	SS02	PRJNA224116	NZ_JACDQU01000000	Brazil	NA
<i>M.sciuri</i>	MGBC107897	PRJEB45234	CAJTRY00000000	Denmark	Feces
<i>M.sciuri</i>	SNUC 1353	PRJNA342349	QYJA00000000	Canada	Mastitis

Annexes

Annexe 6: Données de séquençage métagénomique shotgun des échantillons prélevés sur les IPD et la PSPC

Project Name	Material	BioProject	Bio Sample	SRA submission
P01-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576164	DRS277512
P01-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576165	DRS277513
P02-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576166	DRS277514
P02-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576167	DRS277515
P03-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576168	DRS277516
P03-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576169	DRS277517
P04-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576170	DRS277518
P04-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576171	DRS277519
P05-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576172	DRS277520
P05-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576173	DRS277521
P06-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576174	DRS277522
P06-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576175	DRS277523
P07-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576176	DRS277524
P07-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576177	DRS277525
P08-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576178	DRS277526
P08-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576179	DRS277527
P09-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576180	DRS277528
P09-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576181	DRS277529
P10-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576182	DRS277530
P10-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576183	DRS277531
P11-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576184	DRS277532
P11-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576185	DRS277533
P12-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576186	DRS277534
P12-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576187	DRS277535
P13-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576188	DRS277536
P13-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576189	DRS277537
P14-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576190	DRS277538
P14-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576191	DRS277539
P15-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576192	DRS277540
P15-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576193	DRS277541
P16-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576194	DRS277542
P16-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576195	DRS277543
P17-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576196	DRS277544
P17-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576197	DRS277545
P18-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576198	DRS277546
P18-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576199	DRS277547
P19-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576200	DRS277548
P19-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576201	DRS277549
P20-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576202	DRS277550

Annexes

P20-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576203	DRS277551
P21-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576204	DRS277552
P21-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576205	DRS277553
P22-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576206	DRS277554
P22-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576207	DRS277555
P23-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576208	DRS277556
P23-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576209	DRS277557
P24-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576210	DRS277558
P24-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576211	DRS277559
P25-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576212	DRS277560
P25-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576213	DRS277561
P26-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576214	DRS277562
P26-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576215	DRS277563
P27-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576216	DRS277564
P27-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576217	DRS277565
P28-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576218	DRS277566
P28-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576219	DRS277567
P29-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576220	DRS277568
P29-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576221	DRS277569
P30-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576222	DRS277570
P30-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576223	DRS277571
P31-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576224	DRS277572
P31-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576225	DRS277573
P32-site-A	DFI	PRJDB13730	SAMD00576226	DRS277574
P32-site-B	Skin	PRJDB13730	SAMD00576227	DRS277575

RESEARCH

Open Access



Whole genome sequencing and pan-genome analysis of *Staphylococcus/Mammaliicoccus* spp. isolated from diabetic foot ulcers and contralateral healthy skin of Algerian patients

Nerdjes Ferhaoui¹, Rina Tanaka², Tsuyoshi Sekizuka², Makoto Kuroda² and Mohammed Sebahia^{1*}

Abstract

Background Diabetic foot infections (DFIs) are the most common complications of diabetic foot ulcers (DFUs), and a significant cause of lower extremity amputation. In this study we used whole genome sequencing to characterize the clonal composition, virulence and resistance genetic determinants of 58 *Staphylococcus/Mammaliicoccus* spp. isolates from contralateral healthy skin and DFU from 44 hospitalized patients.

Results *S. aureus* (n = 32) and *S. epidermidis* (n = 10) isolates were recovered from both DFUs and healthy skin, whereas, *S. haemolyticus* (n = 8), *M. sciuri* (n = 1), *S. hominis* (n = 1) and *S. simulans* (n = 3) were recovered exclusively from healthy skin. In contrast, *S. caprae* (n = 2) and *S. saprophyticus* (n = 1) were recovered only from DFUs. Among *S. aureus* isolates, MRSA were present with high prevalence (27/32, 84.4%), 18 of which (66.7%) were from DFUs and 9 (33.3%) from healthy skin. In contrast, the coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS)/*Mammaliicoccus* isolates (n = 26), in particular *S. epidermidis* and *S. haemolyticus* were more prevalent in healthy skin, (10/26, 38.5%) and (8/26, 30.8%), respectively. MLST, spa and SCCmec typing classified the 32 *S. aureus* isolates into 6 STs, ST672, ST80, ST241, ST1, ST97, ST291 and 4 unknown STs (STNF); 8 spa types, t044, t037, t3841, t1247, t127, t639, t937 and t9432 and 2 SCCmec types, type IV and type III(A). Among CoNS, the *S. epidermidis* isolates belonged to ST54, ST35 and ST640. *S. haemolyticus* belonged to ST3, ST25, ST29, ST1 and ST56. The sole *M. sciuri* isolate was found to carry an SCCmec type III(A). A wide range of virulence genes and antimicrobial resistance genes were found among our isolates, with varying distribution between species or STs. The pan-genome analysis revealed a highly clonal population of *Staphylococcus* isolates, particularly among *S. aureus* isolates. Interestingly, the majority of *S. aureus* isolates including MRSA, recovered from the healthy skin and DFUs of the same patient belonged to the same clone and exhibited similar virulence/resistance genotype.

*Correspondence:
Mohammed Sebahia
m.sebahia@univ-chlef.dz

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Conclusions Our study provides clinically relevant information on the population profile, virulence and antibiotic resistance of *Staphylococcus/Mammaliococcus* spp. in DFIs, which could serve as a basis for further studies on these as well as other groups of pathogens associated with DFIs.

Keywords *Staphylococcus*, *Mammaliococcus*, MRSA, Diabetic foot Ulcer Infection

Background

Diabetes is a fast-growing global problem with huge social, health, and economic consequences [1]. The prevalence of diabetes in 2021 was estimated to be 10.5% (536.6 million people), and it is expected to raise to 12.2% (783.2 million) in 2045 [2].

People with diabetes are at increased risk of long-term complications such as coronary heart disease, cerebrovascular and peripheral vascular diseases and diabetic foot ulcers (DFUs) [3]. It was estimated that 15% of diabetics will develop DFUs during their existence [4].

Microbial infections of the DFUs, termed diabetic foot infections (DFIs) are key contributors to the amputation risk [5]. Limb loss associated with DFUs have a significant negative impact on mobility, psychosocial well-being, and quality of life of the patients and increase healthcare costs [6, 7].

Bacterial species belonging to the genus *Staphylococcus* are common colonizers of skin and mucous membranes of humans and animals, but also opportunistic pathogens capable of causing a wide range of infections. The staphylococci can be differentiated into Coagulase-Positive (CoPS) and Coagulase-Negative (CoNS), based on their ability to produce coagulase. Recently, five species among the CoNS (*S. sciuri*, *S. fleurettii*, *S. lentus*, *S. stepanovicii* and *S. vitulinus*), and belonging to *S. sciuri* group, were reclassified into the novel genus *Mammaliococcus*, with *Mammaliococcus (M.) sciuri* as the type species [8].

The CoPS, which are considered as more pathogenic than the CoNS, include the notorious pathogen, *S. aureus*, which is the main causative agent of both community acquired and nosocomial infections in humans as well as in animals [9–12], including DFIs [12, 13]. *S. aureus* can deploy numerous virulence factors which are implicated in DFI and delayed wound healing process [14, 15]. However, the CoNS and the *Mammaliococcus* are now known to be also frequently associated with clinical infections, including diabetic foot osteomyelitis [16], particularly in immune-compromised and hospitalized patients [17].

Both *Staphylococcus* and *Mammaliococcus* species are becoming increasingly resistant to several antibiotics, as a result of the acquisition of resistance genes [18], limiting further the therapeutic options against the infections caused by these bacteria, and leading to worse clinical outcomes [19].

Thus, understanding the genetic characteristics of *Staphylococcus* and related bacteria in DFIs can be exploited for both therapeutic and diagnostic purposes.

Apart from one study by Djahmi et al. (2013) [20], data on the staphylococci associated with DFIs in Algeria are lacking. Therefore, in the present study we used whole genome sequencing (WGS) to characterize the genetic diversity, antibiotic resistance and virulence genetic determinants of *Staphylococcus* and *Mammaliococcus* spp. isolates recovered from DFIs; and to assess the potential association between clones/species and/or virulence/resistance genes with PEDIS grades and the source of isolates.

Results

Species and source of *Staphylococcus/Mammaliococcus* isolates

Eight *Staphylococcus/Mammaliococcus* species were identified among the 58 isolates, including *S. aureus* (32/58, 55.2%), *S. epidermidis* (10/58, 17.2%), *S. haemolyticus* (8/58, 13.8%), *S. simulans* (3/58, 5.2%), *S. caprae* (2/58, 3.5%), *S. hominis*, *S. saprophyticus* and *M. sciuri* (1/58 each, 1.7%). The characteristics of the 58 isolates included in this study are shown in Table 1.

Among the 32 *S. aureus* isolates, 23/32 (71.9%) were recovered from DFUs and 9/32 (28.1%) from healthy skin. The 10 *S. epidermidis* isolates were recovered from 8 patients, including 6/10 (60%) from healthy skin and 4/10 (40%) from DFUs. All the *S. haemolyticus* (n=8), *M. sciuri* (n=1), *S. hominis* (n=1) and *S. simulans* (n=3) isolates were recovered exclusively from healthy skin, but *S. caprae* (n=2) and *S. saprophyticus* (n=1) were recovered only from DFUs.

Among the 32 *S. aureus* isolates, 27/32 (84.4%) carried the *mecA* gene, and were therefore MRSA; 18/27 of which (66.7%) were from DFUs and 9/27 (33.3%) from healthy skin.

Statistically, *S. aureus* including MRSA isolates and CoNS were significantly associated with the source of isolation (p -value=0.004).

Molecular typing of the *Staphylococcus/Mammaliococcus* isolates

Clones of *S. aureus* were characterized based on the combination of MLST, SCC*mec* and *spa* typing. *In silico* determination of MLST revealed that *S. aureus* isolates belonged to 6 known STs including ST80 (16/32, 50%), ST241 (5/32, 15.6%), ST672 (3/32, 9.4%), ST1 (2/32,

Table 1 Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Staphylococcus/Mammaliococcus* species recovered from DFUs and Healthy skin (n = 58)

Patient	Age/sex	PEDIS grade	Ulcer location	Antibiotics	Iso-lates (n)	Origin	species	SCCmec	ST-spa
P01	73/M	3	Forefoot	Ciprofloxacin	3	DFU	<i>S. aureus</i>	Nd(2B)	ST672-t3841
						HS	<i>S. aureus</i>	Nd(2B)	ST672-t3841
						HS	<i>S. epidermidis</i>	MSCoNS	ST54
P02	51/F	3	Midfoot	Amoxicillin-clavulanate	2	HS	<i>S. aureus</i>	Ivc(2B)	ST80-t1247
						HS	<i>S. aureus</i>	III(3 A)	STNF-t037
P03	61/M	4	Heel	Metronidazole, Cefotaxime	3	DFU	<i>S. aureus</i>	Ivc(2B)	ST80-t044
						HS	<i>S. aureus</i>	Ivc(2B)	ST80-t044
						HS	<i>S. haemolyticus</i>	MSCoNS	ST3 ⁹
P04	62/M	3	Forefoot	Clindamycin, Ciprofloxacin	2	DFU	<i>S. epidermidis</i>	MSCoNS	ST54
						HS	<i>S. epidermidis</i>	MSCoNS	ST54
P05	60/F	4	Midfoot	Metronidazole, Cefotaxime	3	DFU	<i>S. epidermidis</i>	MSCoNS	ST54
						HS	<i>S. haemolyticus</i>	MSCoNS	ST29
						HS	<i>M. sciuri</i>	III(3 A)	STNF
P06	71/M	3	Forefoot	Ciprofloxacin	2	DFU	<i>S. epidermidis</i>	MSCoNS	ST54
						HS	<i>S. epidermidis</i>	MSCoNS	ST54
P07	61/M	3	Forefoot	Clindamycin	1	HS	<i>S. epidermidis</i>	MSCoNS	STNF
P08	63/F	3	Heel	Metronidazole, Cefotaxime	1	HS	<i>S. haemolyticus</i>	MSCoNS	ST25
P09	64/M	4	Forefoot	Cefotaxime	3	DFU	<i>S. aureus</i>	Ivc(2B)	ST80-t044
						DFU	<i>S. caprae</i>	MSCoNS	STNF
						HS	<i>S. aureus</i>	Ivc(2B)	ST80-t044
P10	73/M	2	Heel	Amoxicillin-clavulanate	2	DFU	<i>S. aureus</i>	MSSA	ST291-t937
						HS	<i>S. hominis</i>	MSCoNS	STNF
						DFU	<i>S. aureus</i>	III(3 A)	STNF-t037
P11	66/M	2	Midfoot	Clindamycin	1	DFU	<i>S. aureus</i>	III(3 A)	STNF-t037
P13	54/M	4	Forefoot	Bactrim	1	HS	<i>S. epidermidis</i>	MSCoNS	ST35
P14	80/F	2	Forefoot	Imipenem	1	HS	<i>S. haemolyticus</i>	MSCoNS	ST3
P15	74/M	2	Heel	Amoxicillin-clavulanate	3	DFU	<i>S. aureus</i>	III(3 A)	ST241-t037
						HS	<i>S. aureus</i>	III(3 A)	ST241-t037
						HS	<i>S. epidermidis</i>	MSCoNS	ST35
P16	61/M	3	Forefoot	Cefazolin	2	DFU	<i>S. aureus</i>	III(3 A)	ST241-t037
						HS	<i>S. haemolyticus</i>	MSCoNS	ST3
P17	70/M	2	Heel	Bactrim	2	DFU	<i>S. epidermidis</i>	MSCoNS	ST640
						HS	<i>S. simulans</i>	MSCoNS	STNF
P18	49/M	4	Midfoot	Clindamycin, Cefotaxime	1	HS	<i>S. simulans</i>	MSCoNS	STNF
P19	44/M	3	Forefoot	Imipenem	2	DFU	<i>S. caprae</i>	MSCoNS	STNF
						HS	<i>S. simulans</i>	MSCoNS	STNF
P20	71/M	2	Midfoot	Imipenem	1	HS	<i>S. haemolyticus</i>	MSCoNS	ST1
P26	85/M	4	Heel	Clindamycin, Ciprofloxacin	1	DFU	<i>S. aureus</i>	III(3 A)	STNF-t037
P27	82/M	4	Forefoot	Metronidazole, Cefotaxime	1	HS	<i>S. haemolyticus</i>	MSCoNS	ST56
P28	72/M	4	Midfoot	Metronidazole, Cefotaxime	1	HS	<i>S. haemolyticus</i>	MSCoNS	ST25
P29	54/M	3	Heel	Bactrim, Cefotaxime	1	HS	<i>S. aureus</i>	Ivc(2B)	ST80-t044
P30	59/M	3	Forefoot	Ciprofloxacin	1	HS	<i>S. aureus</i>	MSSA	ST97-t9432
P31	64/M	4	Forefoot	Clindamycin, Ciprofloxacin	1	DFU	<i>S. aureus</i>	Nd(2B)	ST672-t3841
P32	60/M	3	Heel	Metronidazole, Cefotaxime	2	DFU	<i>S. aureus</i>	III(3 A)	ST241-t037
						HS	<i>S. aureus</i>	III(3 A)	ST241-t037
S16*	57/F	3	Heel	Cefazolin	1	DFU	<i>S. aureus</i>	MSSA	STNF-t037
S17K*	72/M	2	Heel	Amoxicillin-clavulanate	1	DFU	<i>S. aureus</i>	Ivc(2B)	ST80-t044
S104K*	60/F	2	Midfoot	Imipenem	1	DFU	<i>S. aureus</i>	Ivc(2B)	ST80-t044
S4K*	59/M	2	Forefoot	Clindamycin, Ciprofloxacin	1	DFU	<i>S. saprophyticus</i>	MSCoNS	STNF
S6K*	49/M	3	Midfoot	Bactrim	1	DFU	<i>S. aureus</i>	Ivc(2B)	ST80-t044
S7K*	58/M	3	Heel	Ciprofloxacin	1	DFU	<i>S. aureus</i>	Ivc(2B)	ST80-t044
S8K*	60/M	4	Heel	Metronidazole, Cefotaxime	1	DFU	<i>S. aureus</i>	Ivc(2B)	ST80-t044

Table 1 (continued)

Patient	Age/sex	PEDIS grade	Ulcer location	Antibiotics	Iso-lates (n)	Origin	species	SCCmec	ST-spa
S9K*	52/M	3	Midfoot	Cephalexin, Gentamicin	1	DFU	<i>S. aureus</i>	IVc(2B)	ST80-t044
S10K*	60/M	4	Forefoot	Metronidazole, Cefotaxime	1	DFU	<i>S. aureus</i>	IVc(2B)	ST80-t044
S11K*	67/M	4	Heel	Clindamycin, Ciprofloxacin	2	DFU	<i>S. aureus</i>	IVc(2B)	ST80-t044
S12K*	85/M	3	Forefoot	Ciprofloxacin	2	DFU	<i>S. aureus</i>	IVc(2B)	ST80-t044
			Forefoot			DFU			
S14K*	60/F	4	Midfoot	Cefazolin	1	DFU	<i>S. aureus</i>	MSSA	ST1-t127
			Heel			DFU			

DFU: diabetic foot ulcer; HS: healthy skin; M: Male, F: female; MSSA: methicillin-sensitive *S. aureus*; MCoNS: methicillin-sensitive coagulase negative staphylococci; ST: sequence type; STNF: ST not found; SCCmec: Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*. *Patients sampled only from DFU (additional strains). § Novel allele, ST may indicate nearest ST. Values are numbers

6.3%), ST97 and ST291 (1/32 each, 3.1%), and 4 STNF (4/32, 12.5%).

Eight spa types were identified among *S. aureus* isolates. The dominant one was t044 (13/32, 40.6%), followed by t037 (9/32, 28.1%), t3841 (3/32, 9.4%), t1247 and t127 (2/32 each, 6.3%), t639, t9432 and t937 (1/32 each, 3.1%).

Two SCCmec types were identified among MRSA isolates, type IV (19/27, 70.4%) and type III(A) (8/27, 29.6%). The type IV isolates were assigned to subtype IVc(2B) (16/27, 59.3%) and IVd(2B) (3/27, 11.11%).

Among CoNS/*Mammaliococcus* isolates, SCCmec type III(A) (1/26, 3.8%) was detected in the sole *M. sciuri* isolate.

The dominant MRSA clone (13/27, 48.1%) was ST80- t044- IVc(2B), followed by ST241-t037- III(3 A) (5/27, 18.5%); whereas, ST672- t3841- IVd(2B) and STNF-t037- III(3 A) were each represented by 3/27 (11.1%) isolates. In addition, 2 other spa types were detected among ST80- IVc(2B) isolates, t1247 (2/27, 7.4%) and t639 (1/27, 3.7%).

2/5 (40%) of MSSA isolates belonged to ST1-t127, while ST97-t9432, ST291-t937 and STNF-t037 were each represented by one isolate (1/5, 20%).

Among *S. epidermidis* isolates, 6/10 (60%) belonged to ST54, 2/10 (20%) to ST35 and 1/10 (10%) to ST640. 3/8 (37.5%) *S. haemolyticus* belonged to ST3 and 2/8 (25%) to ST25, while ST29, ST1 and ST56 were each represented by 1/8 (12.5%) isolate.

Virulence genes

The presence and distribution of the virulence genes are summarized in Tables 2, 3 and S2.

A total of 116 virulence genes were detected among *S. aureus* isolates including 42 adhesion genes and a large number of type 8 capsular polysaccharide, immune evasion and exoenzyme genes.

Thirty-five toxin-encoding genes were found among MRSA/MSSA isolates including 6 hemolysins (*hlgA*, *hlgB*, *hlgC*, *hly*, *hld* and *hla/hly*), 13 staphylococcal

enterotoxins (*se*) and staphylococcal enterotoxin-like toxins (*sel*) (*sea*, *seb*, *seh*, *sek*, *seq*, *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, *seu* *selk* and *selq*), with different carriage proportions ranging from 3.1 to 100%. ST1 isolates carried the highest number (n=7) of *se/sel* genes, *sea*, *seb*, *seh*, *sek*, *seq*, *selk* and *selq*. In contrast, none of the *se/sel* genes were detected among the ST80 isolates.

Remarkably, none of the *Staphylococcus/Mammaliococcus* isolates harbored an exfoliatin toxin gene (*eta* or *etb*) or a toxic shock syndrome toxin (*tst*) gene.

The leukocidins genes (*lukD*, *lukE*) were detected in all *S. aureus* isolates (32/32, 100%), while *lukF/lukS-PV* were detected only in ST80 isolates (16/32, 50%). In addition, *edinB* gene encoding epidermal cell differentiation inhibitors was also detected only in ST80 isolates (16/32, 50%) and in ST291- t937 (1/32, 3.1%).

On the other hand, the sole virulence factor found among the 26 CoNS/*Mammaliococcus* isolates was the arginine catabolic mobile element (*ACME*), which was exclusively present in *S. epidermidis* isolates (9/26, 34.6%).

The association of virulence genes with *S. aureus* ST or CoNS/*Mammaliococcus* species was statistically significant. In contrast, no statistically significant association was found between the presence/absence of virulence genes and PEDIS grades or the source of isolates (*p*-value > 0.05).

Resistance genes

S. aureus

The distribution of the genetic determinants of antibiotic resistance among the *S. aureus* is shown in Tables 4 and S2. Genes encoding β-lactam resistance, *mecA* and *blaZ*, were detected among *S. aureus* isolates at frequencies of 84.4% (27/32) and 50% (16/32), respectively.

The genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes (*AME*), *aph(3')-III/aph(3')-IIIa*, were the most prevalent among *S. aureus* isolates (25/32, 78.1%). All ST80 isolates (16/32, 50%) were positive for *ant(6)-Ia* and *aph(3')-III/aph(3')-IIIa* genes, and all ST241 isolates

Table 2 Virulence gene profiles in *S. aureus* isolates recovered from DFUs and Healthy skin (n= 32)

	ST1-t127 (n=2) n(%)	ST241- t037 (n=5) n(%)	ST291- t937 (n=1) n(%)	ST672- t3841 (n=3) n(%)	ST80-t044/ t1247/t639 (n=16) n(%)	ST97- t9432 (n=1) n(%)	STNF- t037 (n=4) n(%)	Total (n=32) n(%)	[§] p-value
Adhesion									
<i>clfA</i>	2(100)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	1(100)	4(100)	12(37.5)	<0.001
<i>clfB</i>	2(100)	5(100)	0(0)	3(100)	0(0)	1(100)	2(50)	13(40.6)	<0.001
<i>ebp</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>fnbA</i>	2(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(6.3)	<0.001
<i>fnbB</i>	2(100)	0(0)	0(0)	0(0)	1(6.3)	0(0)	0(0)	3(9.4)	0.002
<i>map</i>	0(0)	5(100)	0(0)	3(100)	15(93.8)	1(100)	4(100)	28(87.5)	0.001
<i>capA</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
<i>cap8A</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>cap8B</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>cap8C</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>cap8D</i>	0(0)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	30(93.8)	<0.001
<i>cap8E</i>	0(0)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	30(93.8)	<0.001
<i>cap8F</i>	0(0)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	30(93.8)	<0.001
<i>cap8G</i>	0(0)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	30(93.8)	<0.001
<i>cap8H</i>	0(0)	5(100)	0(0)	3(100)	16(100)	0(0)	4(100)	28(87.5)	<0.001
<i>cap8I</i>	2(100)	5(100)	0(0)	3(100)	16(100)	0(0)	4(100)	30(93.8)	<0.001
<i>cap8J</i>	2(100)	5(100)	0(0)	3(100)	16(100)	0(0)	4(100)	30(93.8)	<0.001
<i>cap8K</i>	2(100)	5(100)	0(0)	3(100)	16(100)	0(0)	4(100)	30(93.8)	<0.001
<i>cap8L</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>cap8M</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>cap8N</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>cap8O</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>cap8P</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>capN</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
<i>srtB</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	15(93.8)	1(100)	4(100)	31(96.9)	0.984
<i>sdrC</i>	2(100)	5(100)	0(0)	1(33.3)	12(75)	1(100)	4(100)	25(78.1)	0.104
<i>sdrD</i>	2(100)	5(100)	0(0)	3(100)	15(93.8)	1(100)	4(100)	30(93.8)	0.014
<i>sdrE</i>	1(50)	3(60)	0(0)	0(0)	15(93.8)	1(100)	3(75)	23(71.9)	0.018
<i>icaA/B/C/D/R</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>isdA</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>isdB</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>isdC</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>isdD</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	15(93.8)	1(100)	4(100)	31(96.9)	0.984
<i>isdE</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>isdF</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>isdG</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>isdI</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
<i>harA</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
Toxins									
Haemolysins									
<i>hly/hla</i>	2(100)	0(0)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	0(0)	23(71.9)	<0.001
<i>hly/hlb</i>	1(50)	0(0)	1(100)	1(33.3)	5(31.3)	1(100)	0(0)	9(28.1)	0.161
<i>hly/hld</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>hly/hly/hlc</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
Enterotoxins and Enterotoxin-like									
<i>sea</i>	2(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	4(100)	6(18.8)	<0.001
<i>seb</i>	2(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(100)	0(0)	3(9.4)	<0.001
<i>seh</i>	2(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(6.3)	<0.001
<i>egc cluster*</i>	0(0)	0(0)	0(0)	3(100)	0(0)	0(0)	0(0)	3(9.4)	<0.001
<i>sek</i>	2(100)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	4(100)	11(34.4)	<0.001

Table 2 (continued)

	ST1-t127 (n=2) n(%)	ST241- t037 (n=5) n(%)	ST291- t937 (n=1) n(%)	ST672- t3841 (n=3) n(%)	ST80-t044/ t1247/t639 (n=16) n(%)	ST97- t9432 (n=1) n(%)	STNF- t037 (n=4) n(%)	Total (n=32) n(%)	\S p-value
<i>seq</i>	2(100)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	4(100)	11(34.4)	<0.001
<i>selk</i>	2(100)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	4(100)	11(34.4)	<0.001
<i>selq</i>	2(100)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	4(100)	11(34.4)	<0.001
Staphylococcal exotoxin-like									
<i>set16</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	0(0)	0(0)	0(0)	2(6.3)	0.060
<i>set17</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
<i>set18</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
<i>set19</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(33.3)	0(0)	1(100)	0(0)	2(6.3)	0.002
<i>set20</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
<i>set21</i>	1(50)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.1)	0.017
<i>set22</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
<i>set23</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
<i>set24</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
<i>set25</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
<i>set26</i>	1(50)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.1)	0.017
Other toxins									
<i>edinB</i>	0(0)	0(0)	1(100)	0(0)	16(100)	0(0)	0(0)	17(53.1)	<0.001
<i>lukS-PV/lukF-PV</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	16(100)	0(0)	0(0)	16(50)	<0.001
<i>lukD/E</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
Type VII secretion system									
<i>esaA</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>esaB</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>esaD</i>	2(100)	0(0)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	0(0)	23(71.9)	<0.001
<i>esaE</i>	2(100)	0(0)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	0(0)	23(71.9)	<0.001
<i>esaG</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
<i>esaG1</i>	1(50)	5(100)	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	4(100)	11(34.4)	<0.001
<i>esaG2</i>	1(50)	0(0)	0(0)	2(66.7)	13(81.3)	0(0)	0(0)	16(50)	0.007
<i>esaG3</i>	1(50)	0(0)	0(0)	2(66.7)	0(0)	0(0)	0(0)	3(9.4)	0.006
<i>esaG4</i>	1(50)	5(100)	0(0)	2(66.7)	0(0)	0(0)	4(100)	12(37.5)	<0.001
<i>esaG5</i>	1(50)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.1)	0.017
<i>esaG6</i>	0(0)	0(0)	1(100)	2(66.7)	0(0)	0(0)	0(0)	3(9.4)	<0.001
<i>esaG7</i>	1(50)	0(0)	0(0)	2(66.7)	0(0)	0(0)	0(0)	3(9.4)	0.006
<i>esaG8</i>	1(50)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.1)	0.017
<i>esaG9</i>	1(50)	5(100)	0(0)	2(66.7)	13(81.3)	0(0)	4(100)	25(78.1)	0.091
<i>essA</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>essB</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>essC</i>	2(100)	0(0)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	0(0)	23(71.9)	<0.001
<i>esxA</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>esxB</i>	2(100)	0(0)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	0(0)	23(71.9)	<0.001
<i>esxC</i>	2(100)	0(0)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	0(0)	23(71.9)	<0.001
<i>esxD</i>	2(100)	0(0)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	0(0)	23(71.9)	<0.001
Degrading enzyme									
Lipases									
<i>geh</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>lip</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
Proteases									
<i>sspA</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>sspB</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	0(0)	28(87.5)	<0.001
<i>sspC</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>splA</i>	2(100)	5(100)	1(100)	0(0)	16(100)	1(100)	4(100)	29(90.6)	<0.001
<i>splB</i>	2(100)	5(100)	0(0)	0(0)	16(100)	1(100)	4(100)	28(87.5)	<0.001

Table 2 (continued)

	ST1-t127 (n=2) n(%)	ST241- t037 (n=5) n(%)	ST291- t937 (n=1) n(%)	ST672- t3841 (n=3) n(%)	ST80-t044/ t1247/t639 (n=16) n(%)	ST97- t9432 (n=1) n(%)	STNF- t037 (n=4) n(%)	Total (n=32) n(%)	[§] p-value
<i>spIE</i>	2(100)	5(100)	1(100)	0(0)	0(0)	1(100)	4(100)	13(40.6)	<0.001
Hyaluronidases									
<i>hysA</i>	2(100)	5(100)	1(100)	0(0)	16(100)	0(0)	4(100)	28(87.5)	<0.001
Coagulases									
<i>coa</i>	2(100)	0(0)	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	3(9.4)	<0.001
<i>vWbp</i>	2(100)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	4(100)	11(34.4)	<0.001
Other enzymes									
<i>aur</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
Immune evasion									
<i>adsA</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N
<i>chp</i>	0(0)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	5(15.6)	<0.001
<i>sak</i>	2(100)	5(100)	0(0)	3(100)	14(87.5)	1(100)	4(100)	29(90.6)	0.077
<i>scn</i>	2(100)	5(100)	0(0)	3(100)	14(87.5)	1(100)	4(100)	29(90.6)	0.077
<i>spa</i>	2(100)	0(0)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	0(0)	23(71.9)	<0.001
<i>sbi</i>	2(100)	5(100)	1(100)	3(100)	16(100)	1(100)	4(100)	32(100)	N

[§]Chi-squared test was used to calculate p-values for describing the association of each gene and STs, p-values <0.05 were considered statistically significant

*egc cluster corresponds to seg, sei, sem, sen, seo and seu genes

Values are numbers and percentages in brackets

Table 3 Virulence gene profiles in CoNS/*M. sciuri* isolates recovered from DFUs and Healthy skin (n=26)

	<i>M. sciuri</i> (n=1) n(%)	<i>S. caprae</i> (n=2) n(%)	<i>S. epidermi- dis</i> (n=10) n(%)	<i>S. haemolyti- cus</i> (n=8) n(%)	<i>S. hominis</i> (n=1) n(%)	<i>S. sapro- phyticus</i> (n=1) n(%)	<i>S. simulans</i> (n=3) n(%)	Total (n=26) n(%)	*p- value
ACME	0(0)	0(0)	9(90)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	9(34.6)	0.001

*Chi-squared test was used to calculate p-values for describing the association between genes and species, p-values <0.05 were considered statistically significant

Values are numbers and percentages in brackets

(5/32, 15.6%) were positive for 3 AME genes, *ant(9)-Ia*, *aac(6')-aph(2'')* and *aph(3')-III*.

Four genes encoding resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB) were detected in *S. aureus* isolates. The *msr(A)* and *mph(C)* genes were detected in all the ST672 isolates (3/32, 9.4%), and the *erm(A)* in all the ST241 isolates (5/32, 15.6%).

Three genes encoding resistance to tetracycline were detected among *S. aureus* isolates, *tet(M)* (9/32, 28.1%), *tet(K)* (2/32, 6.3%) and *tet(38)* (6/32, 18.8%). Remarkably, only isolates belonging to t037 and harboring *SCCmec-III* (ST241 and STNF) carried *tet(M)*.

The *fusB* and *fusC* genes coding for fusidic acid resistance were detected in all the ST80-t1247 (2/32, 6.3%) and ST1-t127 (2/32, 6.3%), respectively. The *dfrG* gene coding for trimethoprim-sulfamethoxazole resistance was detected only in ST241 isolates (5/32, 15.6%).

CoNS/*M. sciuri*

As presented in Table 5, various resistance genes were also identified among the twenty-six CoNS/*M. sciuri* isolates. 18/26 (69.2%) carried both *mecA* and *blaZ* genes.

Remarkably, the single *M. sciuri* isolate harbored both *mecA* and *mecA1* (1/1, 100%). 9/10 (90%) *S. epidermidis* isolates carried both *fusB* and *fusC* genes. In addition, *msr(A)* and *mph(C)* were detected in *S. epidermidis* (2/10, 20%) and *S. haemolyticus* (8/8, 100%) isolates. Moreover, *ermC* was found in *S. haemolyticus* (5/8, 62.5%) and *S. epidermidis* (1/10, 10%) isolates. *aac(6')-aph(2'')*/*aac(6')-Ie/aph(2'')*-*Ia* genes were detected in *S. haemolyticus* (7/8, 87.5%) and *M. sciuri* (1/1, 100%).

The *aph(3')-III/aph(3')-IIIa* (6/8, 75%) and *tet(K)* (7/10, 70%) genes were found exclusively in *S. haemolyticus* and in *S. epidermidis*, respectively. Genes conferring resistance to streptogramin (*vat(B)*, *vat(C)* and *vga(B)*), macrolides (*vga(B)* and *vga(A)LC*), kanamycin/neomycin (*aadD*), tetracycline (*tet(L)*), streptomycin (*str*) and to quaternary ammonium compounds (*qacB*) were detected only in *S. haemolyticus* isolates, at a frequency of one gene per isolate (1/8, 12.5%).

Pan-genome analysis

The pan-genome of each species was determined and phylogenetic trees were built based on gene presence/

Table 4 Resistance gene profiles in *S. aureus* isolates recovered from DFUs and Healthy skin (n = 32)

	ST1-t127 (n=2) n(%)	ST241-t037 (n=5) n(%)	ST291-t937 (n=1) n(%)	ST672-t3841 (n=3) n(%)	ST80-t044/ t1247/t639 (n= 16) n(%)	ST97-t9432 (n= 1) n(%)	STNF-t037 (n= 4) n(%)	Total (n=32) n(%)	*p-value
β-lactams									
<i>mecA</i>	0(0)	5(100)	0(0)	3(100)	16(100)	0(0)	3(75)	27(84.4)	<0.001
<i>blaZ</i>	0(0)	5(100)	1(100)	3(100)	2(12.5)	1(100)	4(100)	16(50)	<0.001
<i>blaI</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(33.3)	0(0)	1(100)	0(0)	2(6.3)	0.002
<i>blaR1</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(33.3)	0(0)	1(100)	0(0)	2(6.3)	0.002
Aminoglycoside									
<i>ant(6)-Ia</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	16(100)	1(100)	0(0)	17(53.1)	<0.001
<i>ant(9)-Ia</i>	0(0)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	5(15.6)	<0.001
<i>aac(6)-aph(2')</i>	0(0)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	3(75)	8(25)	<0.001
<i>aph(3)-III</i>	0(0)	5(100)	0(0)	2(66.7)	13(81.3)	0(0)	0(0)	20(62.5)	0.005
<i>aph(3)-IIIa</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	5(15.6)	0.207
<i>sat4</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	5(15.6)	0.207
Macrolides									
<i>mph(C)</i>	0(0)	0(0)	0(0)	3(100)	0(0)	0(0)	0(0)	3(9.4)	<0.001
<i>msr(A)</i>	0(0)	0(0)	0(0)	3(100)	0(0)	0(0)	0(0)	3(9.4)	<0.001
<i>ermA</i>	0(0)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	5(15.6)	<0.001
<i>ermC</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(6.3)	1(100)	0(0)	2(6.3)	0.014
Tetracycline									
<i>tet(K)</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(12.5)	0(0)	0(0)	2(6.3)	0.907
<i>tet(M)</i>	0(0)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	4(100)	9(28.1)	<0.001
<i>tet(38)</i>	1(50)	0(0)	0(0)	1(33.3)	3(18.8)	1(100)	0(0)	6(18.8)	0.214
Fusidic acid									
<i>fusB</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(12.5)	0(0)	0(0)	2(6.3)	0.907
<i>fusC</i>	2(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(6.3)	<0.001
Trimethoprim-sulfamethoxazole									
<i>dfpG</i>	0(0)	5(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	5(15.6)	<0.001
Fosfomycin									
<i>fosB</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(33.3)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.1)	0.126

*Chi-squared test was used to calculate p-values for describing the association between genes and STs, p-values <0.05 were considered statistically significant
Values are numbers and percentages in brackets

absence matrix. Interestingly, isolates from DFUs are intermingled among the healthy skin isolates throughout the trees. A high number of accessory genes was observed, particularly, in *S. epidermidis* (4383, 72.3%), *S. aureus* (3997, 67.1%), *S. haemolyticus* (3874, 65.9%) and *M. sciuri* (3813, 65.7%) (Fig. 1).

The pan-genome analysis separated the ST80 *S. aureus* isolates into three subgroups (Fig. 2), one comprised of 10 closely related t044 isolates, the second comprised of 2 t1247 and 1 t639 related isolates, and the third contained 3 t044 isolates, which were more distantly related to ST80 strains from the other countries. *S. aureus* ST80, ST1, ST672, ST241 and STNF were found to be closely related to each other and were more distantly related to the reference strains.

The phylogenetic tree of *S. epidermidis* revealed two major clusters, the first included ST54 isolates, which were distinct from the reference *S. epidermidis* strains, and the second included the reference ST54 strains

(Fig. 3). The ST35 isolates clustered together, but separate from the ST35 strains from other countries.

The phylogenetic tree of *S. haemolyticus* revealed a clear distinction between our isolates and the reference strains (Fig. 4).

Similarly, *S. simulans* and *S. caprae* isolates (Figs. 5 and 6) from our study were closely related and more distantly related to the clinical isolates from China (CJ16) and Japan (JMUB145, JMUB590 and JMUB898), respectively.

S. saprophyticus and *S. hominis* isolates clustered with clinical isolates from India and the Netherlands, respectively (Figs. 7 and 8).

However, our single *M. sciuri* isolate formed an out-group, which was distinct from the rest of the reference strains (Fig. 9).

Table 5 Resistance gene profiles in CoNS species and *M. sciuri* recovered from DFUs and Healthy skin (n = 26)

	<i>M. sciuri</i> (n = 1) n(%)	<i>S. caprae</i> (n = 2) n(%)	<i>S. epidermidis</i> (n = 10) n(%)	<i>S. haemolyticus</i> (n = 8) n(%)	<i>S. hominis</i> (n = 1) n(%)	<i>S. saprophyticus</i> (n = 1) n(%)	<i>S. simulans</i> (n = 3) n(%)	Total (n = 26) n(%)	*p-value
Resistance genes									
β-lactams									
<i>blaZ</i>	0(0)	2(100)	10(100)	8(100)	1(100)	0(0)	0(0)	21(80.8)	< 0.001
<i>blaI</i>	0(0)	2(100)	1(10)	2(25)	0(0)	0(0)	0(0)	5(19.2)	0.103
<i>blaR1</i>	0(0)	1(50)	1(10)	2(25)	0(0)	0(0)	0(0)	4(15.4)	0.714
<i>mecA</i>	1(100)	0(0)	9(90)	8(100)	1(100)	0(0)	0(0)	19(73.1)	0.002
<i>mecA1</i>	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	< 0.001
<i>mecI</i>	1(100)	0(0)	1(10)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(7.7)	0.038
<i>mecR1</i>	1(100)	0(0)	1(10)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(7.7)	0.038
Aminoglycoside									
<i>aac(6')-aph(2'')</i>	0(0)	0(0)	0(0)	5(62.5)	0(0)	0(0)	0(0)	5(19.2)	0.030
<i>aac(6')-le/aph(2'')-la</i>	1(100)	0(0)	0(0)	2(25)	0(0)	0(0)	0(0)	3(11.5)	0.079
<i>aph(3)-III</i>	0(0)	0(0)	0(0)	4(50)	0(0)	0(0)	0(0)	4(15.4)	0.100
<i>aph(3)-IIIa</i>	0(0)	0(0)	0(0)	2(25)	0(0)	0(0)	0(0)	2(7.7)	0.560
<i>sat4</i>	0(0)	0(0)	0(0)	2(25)	0(0)	0(0)	0(0)	2(7.7)	0.560
Streptogramin									
<i>vat(B)</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(12.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	0.886
<i>vat(C)</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(12.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	0.886
<i>vgb(B)</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(12.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	0.886
Macrolides									
<i>mph(C)</i>	0(0)	0(0)	2(20)	8(100)	0(0)	0(0)	0(0)	10(38.5)	0.004
<i>msr(A)</i>	0(0)	0(0)	2(20)	8(100)	1(100)	0(0)	0(0)	11(42.3)	0.003
<i>ermC</i>	0(0)	0(0)	1(10)	5(62.5)	0(0)	0(0)	0(0)	6(23.1)	0.110
<i>vga(A)</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(12.5)	0(0)	0(0)	3(100)	4(15.4)	0.004
<i>vga(B)</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(12.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	0.886
<i>vga(A)LC</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(12.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	0.886
<i>sal(A)</i>	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	< 0.001
Tetracycline									
<i>tet(L)</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(12.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	0.886
<i>tet(K)</i>	0(0)	7(70)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	7(26.9)	0.018
Fusidic acid									
<i>fusB</i>	0(0)	1(50)	9(90)	3(37.5)	0(0)	0(0)	0(0)	13(50)	0.045
<i>fusC</i>	0(0)	0(0)	1(10)	1(12.5)	0(0)	0(0)	0(0)	2(7.7)	0.986
Trimethoprim-sulfamethoxazole									
<i>dfpG</i>	0(0)	0(0)	0(0)	5(62.5)	0(0)	0(0)	0(0)	5(19.2)	0.030
<i>dfpS1</i>	0(0)	0(0)	1(10)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	0.948
Fosfomycin									
<i>fosB</i>	0(0)	0(0)	10(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	10(38.5)	< 0.001
Streptomycin									
<i>str</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(12.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	0.886
kanamycin and neomycin									
<i>aadD</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(12.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	0.886
Quaternary ammonium compounds									
<i>qacB</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(12.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(3.8)	0.886

*Chi-squared test was used to calculate p-values for describing the association between genes and species, p-values < 0.05 were considered statistically significant
Values are numbers and percentages in brackets

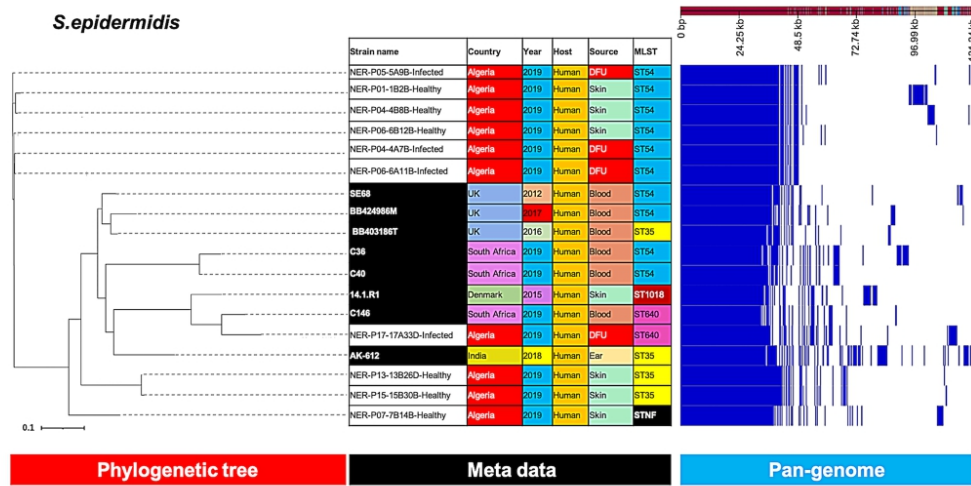


Fig. 3 Phylogenetic analysis of *S. epidermidis* based on the pan-genomes with Roary. On the right of each panel, the heatmap was generated using the presence and absence of core and accessory genes produced by Roary, genes are represented by white and blue bar for absence and presence, respectively. Phylogenetic tree was visualized in the online interactive viewer Phandango using the absence and presence matrix of genes and the tree files in the standard Newick tree format generated by Roary. Meta data were shown in the middle, reference strains (SE68, BB424986M, BB403186T, C36, C40, 14.1.R1, C146, AK-612) were highlighted by black in the strain name

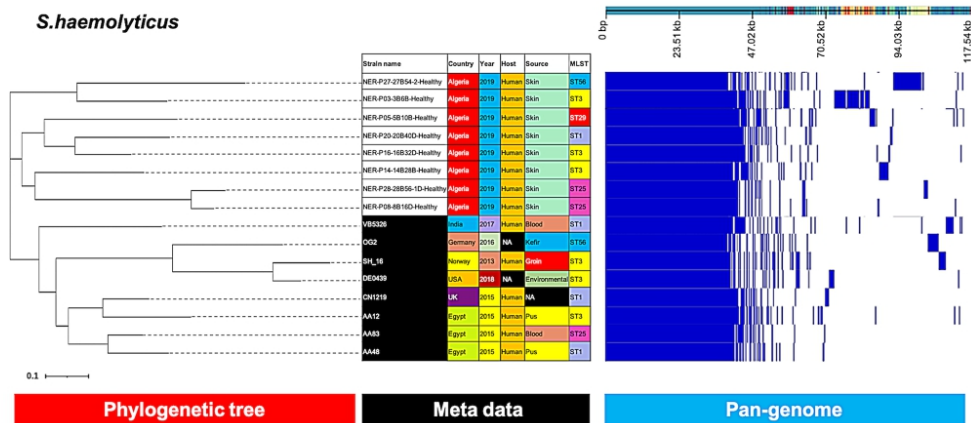


Fig. 4 Phylogenetic analysis of *S. haemolyticus* based on the pan-genomes with Roary. On the right of each panel, the heatmap was generated using the presence and absence of core and accessory genes produced by Roary, genes are represented by white and blue bar for absence and presence, respectively. Phylogenetic tree was visualized in the online interactive viewer Phandango using the absence and presence matrix of genes and the tree files in the standard Newick tree format generated by Roary. Meta data were shown in the middle, reference strains (VB5326, OG2, SH_16, DE0439, CN1219, AA12, AA83, AA48) were highlighted by black in the strain name

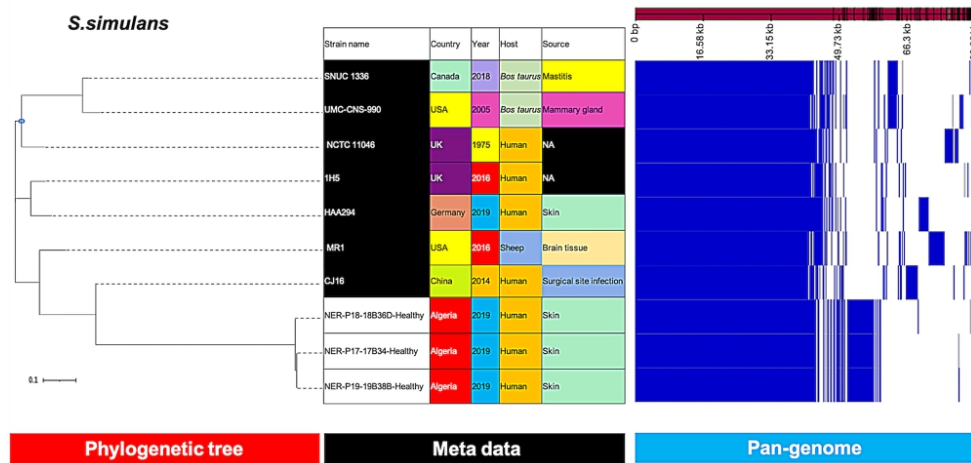


Fig. 5 Phylogenetic analysis of *S. simulans* based on the pan-genomes with Roary. On the right of each panel, the heatmap was generated using the presence and absence of core and accessory genes produced by Roary, genes are represented by white and blue bar for absence and presence, respectively. Phylogenetic tree was visualized in the online interactive viewer Phandango using the absence and presence matrix of genes and the tree files in the standard Newick tree format generated by Roary. Meta data were shown in the middle, reference strains (SNUC 1336, UMC-CNS-990, NCTC 11,046, 1H5, HAA294, MR1, CJ16) were highlighted by black in the strain name

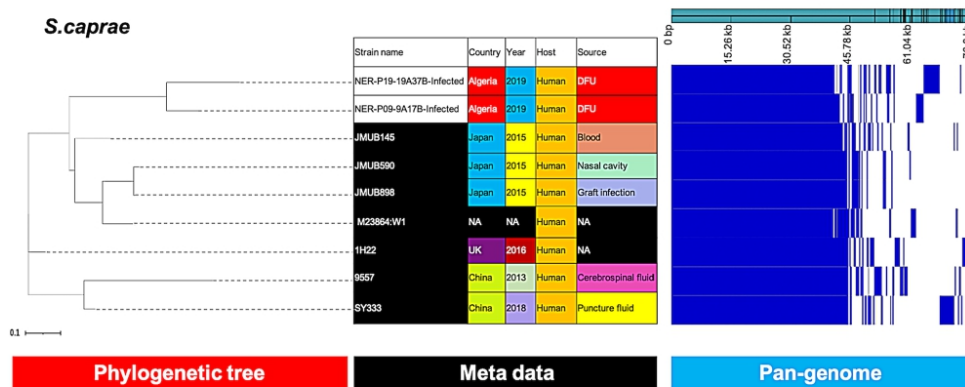


Fig. 6 Phylogenetic analysis of *S. caprae* based on the pan-genomes with Roary. On the right of each panel, the heatmap was generated using the presence and absence of core and accessory genes produced by Roary, genes are represented by white and blue bar for absence and presence, respectively. Phylogenetic tree was visualized in the online interactive viewer Phandango using the absence and presence matrix of genes and the tree files in the standard Newick tree format generated by Roary. Meta data were shown in the middle, reference strains (JMUB145, JMUB590, JMUB898, M23864/W1, 1H22, 9557, SY333) were highlighted by black in the strain name

Discussion

In this study, we investigated clonal composition, virulence and resistance determinants of *Staphylococcus/Mammaliococcus* species isolated from DFUs and healthy skin. *S. aureus* was recovered from the same

sampling site alone or in combination with other CoNS/*Mammaliococcus* species.

S. aureus isolates, including MRSA recovered from the healthy skin and DFUs of each patient, belonged mostly to the same clone and had similar genotype (P1, P3, P9, P15 and P32). This is consistent with earlier findings that

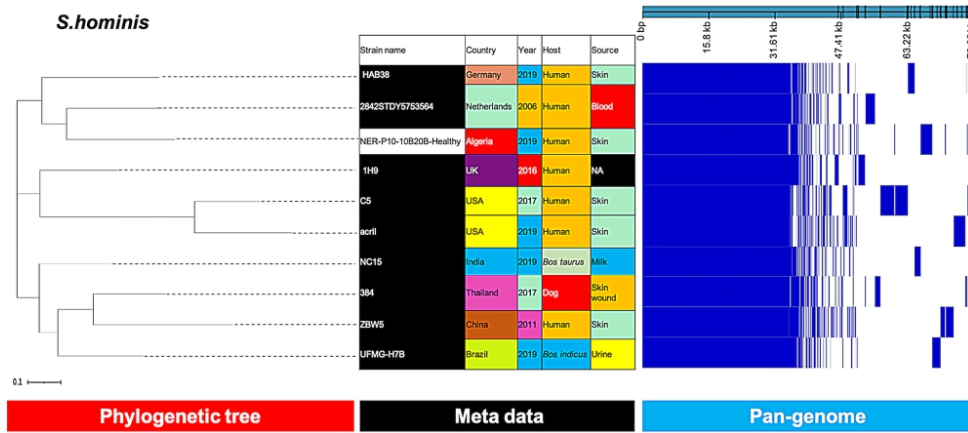


Fig. 7 Phylogenetic analysis of *S. hominis* based on the pan-genomes with Roary. On the right of each panel, the heatmap was generated using the presence and absence of core and accessory genes produced by Roary, genes are represented by white and blue bar for absence and presence, respectively. Phylogenetic tree was visualized in the online interactive viewer Phandango using the absence and presence matrix of genes and the tree files in the standard Newick tree format generated by Roary. Meta data were shown in the middle, reference strains (HAB38, 28425TDY5753564, 1H9, C5, acrII, NC15, 384, ZBW5, UFMG-H7B) were highlighted by black in the strain name

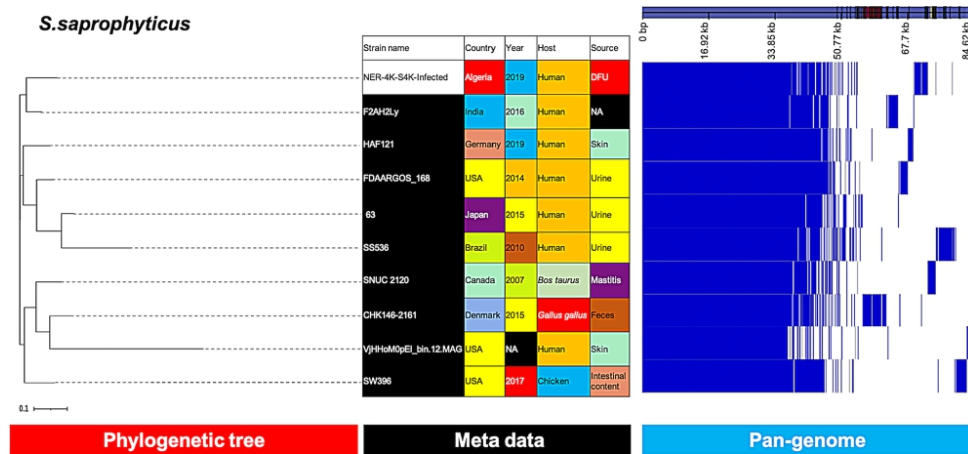


Fig. 8 Phylogenetic analysis of *S. saprophyticus* based on the pan-genomes with Roary. On the right of each panel, the heatmap was generated using the presence and absence of core and accessory genes produced by Roary, genes are represented by white and blue bar for absence and presence, respectively. Phylogenetic tree was visualized in the online interactive viewer Phandango using the absence and presence matrix of genes and the tree files in the standard Newick tree format generated by Roary. Meta data were shown in the middle, reference strains (F2AH2Ly, HAF121, FDAARGOS_168, 63, SS536, SNUC 2120, CHK146-2161, VjHhMqPEI_bin.12.MAG, SW396) were highlighted by black in the strain name

S. aureus isolates recovered from 4 distinct anatomical sites (oro-nasal cavity, periodontal pockets, skin and ulcer) of patients with type 2 diabetes were highly related in the same patient [21]. However, MRSA isolates

belonging to different clones were also recovered from the same sampling site (P2).

S. aureus isolates, in particular MRSA, were more prevalent in DFIs than the healthy skin. This finding led to suggest that *S. aureus*, especially MRSA play a significant

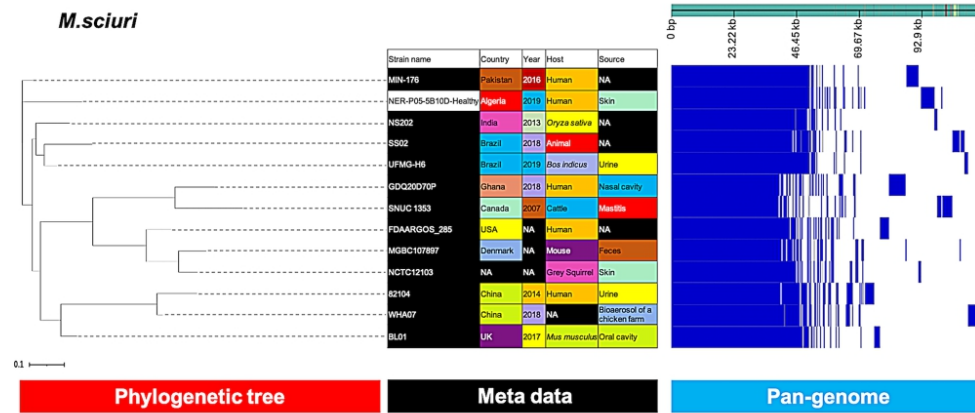


Fig. 9 Phylogenetic analysis of *M. sciuri* based on the pan-genomes with Roary. On the right, the heatmap was generated using the presence and absence of core and accessory genes produced by Roary, genes are represented by white and blue bar for absence and presence, respectively. The phylogenetic tree was visualized in the online interactive viewer Phandango using the absence and presence matrix of genes and the tree file in the standard Newick tree format generated by Roary. Meta data were shown in the middle, reference strains (MIN-176, NS202, UFMG-H6, GDQ20D70P, SNUC 1353, FDAARGOS_285, MGBC107897, NCTC 12103, 82,104, WHA07, BL01) were highlighted by black in the strain name

role in the development and the chronicity of DFIs as described in previous studies [22, 23].

In contrast, CoNS species were mostly recovered from healthy skin, with the exception of *S. caprae* and *S. saprophyticus* which were isolated only from DFIs.

Diabetic patients are thought to be major vehicles for clonal dissemination of staphylococci between hospitals and the community [24]; this could explain the relatively high genetic diversity of our staphylococci. Indeed, our MRSA isolates carried SCCmec III or IV, which are commonly associated with healthcare- and community-acquired infections, respectively.

This study revealed that the dominant MRSA clone (13/27, 48.1%) had the characteristics of the European clone (ST80- t044- IVc(2B)) [25]. Only isolates belonging to this clone carried *lukE/lukS-PV*.

Despite the known community origin of *PVL*-positive ST80- IV [26], this clone was highly prevalent in our investigation, confirming the results of other studies from Algeria, which reported the widespread occurrence of *PVL*-positive ST80- IV in Algerian hospitals [27, 28]. Similarly, several studies have also reported that ST80 CA-MRSA was spreading in healthcare settings in Tunisia [29], Jordan [30] and Kuwait [31, 32].

In addition to *PVL*, isolates belonging to the European clone (ST80- t044- IVc(2B)) carried *edinB* and SCCmec type IV considered as stable genetic markers for CA-MRSA [26, 33]. These properties suggest the community origin of this clone.

The EDIN coding genes are powerful molecular markers associated with poor wound outcomes, that could

differentiate colonization from infection in DFUs [34, 35]. In our study, *edinB*-positive ST80- IVc(2B) isolates were recovered from different grades of severity (2–4), from both DFUs and the healthy skin, which indicates the lack of association between these virulence markers and the severity of DFUs. These results contrast with data obtained in France [34], where *edin* were found to be highly prevalent in *S. aureus* isolates from high-grade foot ulcers.

The Brazilian clone (ST241-t037- III(3 A)) was the second most prevalent clone in our study. This clone includes ST239, ST240 and ST241 harboring SCCmec-III(A), which differ in mutations in *pta* or *yqiL* genes [36].

Given that isolates belonging to the Brazilian clone (ST241-t037- III(3 A)) carried genes that confer resistance to several classes of antibiotics, corroborates a recent Algerian study performed in the province of Constantine that reported a high prevalence (72.5%) of a worrisome emerging multidrug resistant Brazilian clone (*PVL*-negative ST239/241 SCCmec-III mercury) [37]. Furthermore, this clone has been reported to be the major HA-MRSA clone in hospitals in another Algerian province [38].

Interestingly, another study from Algeria reported that 82.2% of the MRSA isolated from DFIs belonged to ST239 [20]. Furthermore, studies from India suggest that the Brazilian clone has been found to be associated with high biofilm production in DFUs, and positive for *luk-DE* and *icaA-B* [39].

ST672-t3841-IVd(2B) is another MRSA clone found in this study, it was detected among healthy skin and DFU

isolates. ST672 is an emerging MRSA clone in India and Australia [40, 41] and commonly associated with CA-MRSA [42]. In addition, this clone has been reported in DFU patients in India [39]. To the best of our knowledge, this is the first report of this clone in Algeria.

The 5 MSSA isolates belonged to 4 different clones, ST1-t127 (2/5, 40%), ST97-t9432, ST291-t937 and STNF-t037 (1/5 each, 20%). The finding of ST1 among MSSA isolates was consistent with previous European studies [26, 43]. However, in the USA, this clone was reported as CA-MRSA, and was also found associated with DFIs across all healing categories [44].

Interestingly, two of our MSSA clones, ST291-t937 and ST97-t9432, were previously identified as livestock-associated [45]. ST291 was also reported in DFU patients in India [39]. We noted that the ST291-t937 isolate lacked the human innate immune evasion cluster (*IEC*) (*sak*, *chp*, *scn* and *sea*) which confirms its animal origin [46]. In contrast, the ST97-t9432 carried the *IEC*, harboring the *sak* and *scn* genes, which could suggest a human origin of this clone [47].

The phylogenetic analysis revealed that *Staphylococcus/Mammaliococcus* spp. carried a high number of accessory genes which have features characteristic of transferred elements (presence of mobility genes) and may provide selective advantages under particular conditions such as antibiotic resistance, adaptation, colonization and pathogenicity [48].

Despite that certain strains clustered with reference strains, there was a clear distinction between our isolates and those from other countries. The phylogenetic comparison of ST80 with the European (11819-97 and S1475), Egyptian (AA45) and the USA (S0924) strains revealed that the Algerian ST80 strains were quite diverse from all the reference strains and mostly clonal, indicated by the extremely short branches at the tip of each clonal branch.

Both the MRSA- and MSSA-STNF exhibited a close clonality and slight variation in gene content, suggesting that the STNF-MRSA clone emerged following the acquisition of *SCCmec* [26]. In addition, the pan-genome analysis confirmed also that the STNF shared a common ancestor with ST241 and ST239.

S. haemolyticus isolates belonging to the same ST were not clustered together throughout the phylogenetic tree. Hence, STs that are intermingled with another may be a result of recent divergence or recombination of the MLST genes [49].

No statistically significant association was found between the presence of virulence genetic determinants and the severity of DFUs. This result contrasts with the findings of a previous report that suggested that infected DFU markers *sea*, *sei*, *lukE* and *hlyg*, were strongly associated with strains from grades 2–4 DFUs, and that *cap8*

was associated with strains from grade 1 ulcers and MSSA strains [50].

The higher frequency of adhesin-encoding genes among our *S. aureus* isolates suggests that they have a potential to form biofilms, which could contribute to their persistence and chronicity in DFU [39, 51].

Likewise, the higher prevalence of γ -hemolysins, *lukE-lukD* and *cap8* cluster genes among our *S. aureus* isolates was consistent with a previous study which reported high frequency of γ -hemolysin genes in MRSA isolates recovered from DFU specimens and patients nares [30].

The absence of *se/sel* genes in the ST80 clone, is in agreement with previous studies which found that ST80 CA-MRSA did not harbor any enterotoxin genes [29, 52]. However, a study in Kuwait hospitals reported that PVL-positive ST80 CA-MRSA carried *sed*, *sei*, *seg*, *seb*, *seh* and *sea*, suggesting that ST80 isolates arose from SE negative isolates due to the acquisition of SE-carrying bacteriophages [32].

In contrast, a high number of *se/sel* genes was found among ST672 and ST1 isolates. The production of a large number of superantigen exotoxins (Sag) might contribute to the worsening of DFUs by the activation of T cells and the production of proinflammatory cytokines [53].

The *ACME* was detected only in *S. epidermidis* isolates, which is in agreement with a previous study that reported a higher prevalence of *ACME* amongst *S. epidermidis* [54]. *ACME* contributes to the success of bacteria in acidic environments as the acid environment on the skin [55]. In fact, the extensive success of certain *S. aureus* strains, such as USA300 (ST8-MRSA-IVa), the US epidemic CA-MRSA strain, has been partially attributed to the presence of *ACME* which is thought to originate from *S. epidermidis* [56].

We have identified a wide range of antimicrobial resistance genes among our isolates, with varying distribution between species or ST. Genes conferring resistance to tetracycline, fusidic acid and fosfomycin were prevalent only in *S. epidermidis*. The macrolide resistance genes *erm(A)* and *erm(C)* were predominant in *S. aureus* ST241 clone and *S. haemolyticus*, respectively. Aouati et al. (2021) reported that *ermA* and *ermC* were responsible for erythromycin-resistance in multidrug resistant HA-MRSA ST239/241 strains in Algeria [37], which is in perfect agreement with our finding. Noteworthy, the *erm(A)* gene was previously reported as the most prevalent gene in MRSA strains in DFIs in Algeria [20].

Carriage of *AME* genes was mostly associated with *S. haemolyticus* and *S. aureus*, particularly ST80 and ST241 isolates, which proves that the monotherapy with *AME* fails to eradicate DFIs due to these bacteria.

Our data suggest a widespread distribution of resistant genes among *S. epidermidis* and *S. haemolyticus* isolates, the opportunistic pathogens which form part of the

normal commensal flora of humans, whilst it is difficult to eradicate because of their resistance to multiple antibiotics [17]. In addition, *S. epidermidis* and other CoNS can provide a reservoir of genes facilitating MRSA infection such as antibiotic resistance determinants [11]. Thus, it has been suggested that *S. epidermidis* may play an essential role in DFI etiology [21].

The *tet(K)* and *fusB* genes were less abundant among ST80 isolates, which was in contrast with previous studies that demonstrated that Algerian PVL-positive ST80-IV strains were resistant to multiple antibiotics, in particular to these drugs [57–59].

Although our study provided some important information on the population and genetic profile of *Staphylococcus/Mammaliococcus* spp. isolated from DFIs, it suffers from few limitations; (i) small sample size; (ii) lack of phenotypic antibiotic resistance data; and (iii) non-inclusion of a control group of patients who had not received antibiotics.

Conclusions

In conclusion, our pan-genome analysis demonstrated that the Algerian *S. aureus* and CoNS/*Mammaliococcus* isolates were closely related to each other, and presented novel genetic features, with a widespread distribution of virulence factors and antibiotic resistance genes, rendering this pathology more difficult to manage. The detection of the same *S. aureus*/CoNS clone in both DFIs and the healthy skin suggests that the autochthonous skin staphylococci can act as a reservoir for DFIs. To the best of our knowledge, this study represents the first investigation in Algeria, employing WGS and pan-genome analysis to get an insight on the underlying diversity and pathogenicity of *Staphylococcus/Mammaliococcus* in DFIs. Most importantly, this study highlights the importance of WGS in disease surveillance and outbreak investigation, as it allows fine typing and detailed gene profiling of bacterial isolates.

Methods

Study group

Patients aged over 18 years who were hospitalized with infected DFUs at the University Regional Military Hospital and the University Hospital Ben Badis, in the province of Constantine, Algeria, from October to December 2019, were included in this study. 32 patients had a single ulcer and were sampled from both healthy foot skin (contralateral site to the chronic wound) and DFU. Patients who underwent surgical procedure including amputations were excluded from the study.

In addition, 14 strains obtained from the routine diagnostic recovered from 12 hospitalized DFU patients were added, including 2 patients who presented with 2 ulcers on the same foot.

DFUs were classified by clinicians using PEDIS classification (grade 2–4) proposed by the Diseases Society of America (IDSA) and the International Working Group on the Diabetic Foot Classifications of Diabetic Foot Infection (IWGDF) [60]. Patient demographics including age, gender, PEDIS grade, ulcer location and antibiotics taken during the 15 previous days were recorded.

Sample collection

After wound debridement and cleansing with sterile saline solution, pus samples were collected in deep wounds from infected tissues. The healthy skin samples were obtained by swabbing of an intact skin area measuring 50 cm². Swabs were immediately transported to the laboratory of microbiology in 1 ml of sterile saline 0.9% for culture. The strains were isolated on mannitol salt agar after incubation at 37 °C for 24 h.

Whole genome sequencing analysis

Genomic DNA was extracted from 58 non duplicate *Staphylococcus/Mammaliococcus* isolates by lytic treatment using achromopeptidase (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) and then Sodium Dodecyl Sulfate (10%). DNA was purified using Zymo Research kit (Zymoresearch, Irvine, Ca, USA), according to the manufacturer's instructions.

A DNA sequencing library (insert size, 300 to 500 bp) was prepared using a QIAseq FX DNA Library Kits (Qiagen, Germany). WGS was performed using the Illumina NextSeq 500 platform with the 300-cycle NextSeq 500 paired-end read sequencing (2×150-mer).

Bioinformatic analysis

Annotation of the genomes was performed with Prokka [61]. Putative bacterial species were determined using Krona [62].

To characterize isolates, sequencing reads were analyzed *in silico* by multi locus sequence typing (MLST) [63]. *spa* types and *SCCmec* were identified *in silico* with the online tools *spaTyper* and *SCCmecFinder* [64]. Antimicrobial resistance genes were identified by homology searching against the ResFinder database [65].

For pan-genome analysis, 58 isolates from this study and publicly available sequences either at draft or complete genome sequences (a total of 78 strains) [see Additional file 3] was performed using Roary [66]. Tree construction was performed using FastTree and visualized in the online interactive viewer Phandango [67] using the absence and presence matrix of genes and the tree file in the standard Newick tree format generated by Roary.

Statistical analysis

Data were analyzed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS; ver. 26.0). Contingency tables were constructed and Chi-squared tests were used to calculate *p*-value for describing possible associations between species/ST and virulence/resistance genes with PEDIS grades and the source of isolates. *p*-values < 0.05 were considered statistically significant.

Abbreviations

CA-MRSA	Community-acquired MRSA
CoNS	Coagulase-negative <i>Staphylococcus</i>
CoPS	Coagulase-positive <i>Staphylococcus</i>
DFI	Diabetic foot infection
DFU	Diabetic foot ulcer
HA-MRSA	Healthcare-acquired MRSA
MRSA	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensitive <i>S. aureus</i>
MSCoNS	Methicillin-sensitive coagulase negative staphylococci
WGS	Whole genome sequencing

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03087-2>.

Supplementary Material 1

Supplementary Material 2

Supplementary Material 3

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the National Institute of Infectious Diseases of Japan, for providing chemical products for experiments and supported experimental facilities to carry out experiments. We thank also the clinical and support teams at the University Regional Military Hospital and the University Hospital Ben Badis of Constantine, Algeria, for their support in undertaking this study.

Author contributions

MS and MK designed the study and reviewed the manuscript. RT and NF performed the whole genome sequencing. TS and MK performed the bioinformatic analysis. NF isolated bacterial strains, performed *in silico* typing, pan-genome analysis, statistical analysis and wrote the draft manuscript. MS supervised the research and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study was funded by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (DGRSDT/MESRS). This work was supported by the Research Program on Emerging and Reemerging Infectious Diseases of the Japan Agency for Medical Research and Development (grant number: JP23R0108666j0401).

Data Availability

All data generated or analyzed in this study are included within the article and its additional files. The Short Read Archives (SRA) were deposited in NCBI database, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject?LinkName=sra_bioproject&from_uid=26401144] with the accession number PRJDB13730. All complete sequences in this study are available, as shown in the additional file 1.

Declarations

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Ethics approval and consent to participate

All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations, all rules of confidentiality and ethics as prescribed in the Helsinki Declaration have been respected and all experimental protocols were approved by ethics committee of the University Regional Military Hospital and University Hospital Ben Badis of Constantine, Algeria. Informed consent was obtained from all subjects and/or their legal guardians.

Consent for publication

Not applicable.

Laboratory of Molecular Biology, Genomics and Bioinformatics, Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University Hassiba Benbouali, Chief, Algeria

Nerdjes Ferhaoui and Mohammed Sebahia.

Pathogen Genomics Center, National Institute of Infectious Diseases (NIID), Tokyo, Japan

Makoto Kuroda, Tsuyoshi Sekizuka and Rina Tanaka.

Nerdjes Ferhaoui

n.ferhaoui@univ-chlef.dz.

Rina Tanaka. r-tanaka@niid.go.jp.

Tsuyoshi Sekizuka

tsuyoshi.sekizuka@gmail.com.

Makoto Kuroda

makokuro@niid.go.jp.

Author details

¹Laboratory of Molecular Biology, Genomics and Bioinformatics, Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University Hassiba Benbouali, Chief, Algeria

²Pathogen Genomics Center, National Institute of Infectious Diseases (NIID), Tokyo, Japan

Received: 1 February 2023 / Accepted: 24 October 2023

Published online: 16 November 2023

References

1. Kaul K, Tarr JM, Ahmad S, Kohner EM, Chibber R. Introduction to Diabetes Mellitus. In: Ahmad S, editor. Diabetes. New York, NY: Springer; 2012. pp. 1–11. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5441-0_1.
2. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level Diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022;183:109119. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109119>.
3. World Health Organization. Diagnosis and management of type 2 diabetes (HEARTS-D). 2020;1–35.
4. Rodrigues BT, Vangaveti VN, Urkude R, Biros E, Malabu UH. Prevalence and risk factors of lower limb amputations in patients with diabetic foot ulcers: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev.* 2022;16(2):102397. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2022.102397>.
5. Boulton AJM, Armstrong DG, Kirsner RS, Attinger CE, Lavery LA, Lipsky BA, et al. Diagnosis and management of diabetic foot Complications. *ADA Clin Compend.* 2018;2018(2). <https://doi.org/10.2337/db20182-1>.
6. Barshes NR, Sigireddi M, Wrobel JS, Mahankali A, Robbins JM, Kougius P, et al. The system of care for the diabetic foot: objectives, outcomes, and opportunities. *Diabet Foot Ankle.* 2013;4(1):21847. <https://doi.org/10.3402/dfa.v4i0.21847>.
7. Jacqueline ES. Eliminating the Health disparity of the Diabetic Foot: a Continuing Public Health Crisis for African americans and latinos. *Int J Diabetes Clin Res.* 2020;7(2):120. <https://doi.org/10.23937/2377-3634/1410120>.
8. Madhaiyan M, Wirth JS, Saravanan VS. Phylogenomic analyses of the staphylococcaceae family suggest the reclassification of five species within the genus staphylococcus as heterotypic synonyms, the promotion of five

- subspecies to novel species, the taxonomic reassignment of five staphylococci. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020;70(11):5926–36.
- Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):603–61. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>.
 - Moran GJ, Anusha K, Rachel JG, Gregory EF, McDougall LK, Carey RB, et al. Methicillin-Resistant S. Aureus Infections among patients in the Emergency Department. *N Engl J Med*. 2006;355(7):666–74. <https://doi.org/10.1056/NEJMo055356>.
 - Otto M. Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA Infection: staphylococcal commensal species such as Staphylococcus epidermidis are being recognized as important sources of genes promoting MRSA colonization and virulence. *BioEssays*. 2013;35(1):4–11.
 - Lipsky BA, Berendt AR, Comia PB, Pile JC, Peters EJG, Armstrong DG, et al. 2012 Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot Infections. *Clin Infect Dis*. 2012;54(12):132–73.
 - Spidhler A, Hurwitz BL, Armstrong DG, Lipsky BA. Microbiology of diabetic foot Infections: from Louis Pasteur to crime scene investigation. *BMC Med*. 2015;13(1):1–13. <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0232-0>.
 - Dunyach-Remy C, Essebe CN, Sotto A, Lavigne JP. Staphylococcus aureus toxins and diabetic foot ulcers: role in pathogenesis and interest in diagnosis. *Toxins (Basel)*. 2016;8(7):209.
 - Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(4):870–926.
 - Hartemann-Heurtier A, Senneville E. Diabetic foot osteomyelitis. *Diabetes Metab*. 2008;34(2):87–95. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2007.09.005>.
 - Takeuchi F, Watanabe S, Baba T, Yuzawa H, Ito T, Morimoto Y, et al. Whole-genome sequencing of Staphylococcus haemolyticus uncovers the Extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *J Bacteriol*. 2005;187(21):7292–308. <https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7292-7308.2005%0A>.
 - Marincola G, Liang O, Schoen C, Abouelfetouh A, Hamdy A, Wencker FDR, et al. Antimicrobial Resistance profiles of Coagulase-negative Staphylococci in Community-based healthy individuals in Germany. *Front Public Heal*. 2021;9(June):684456.
 - Ertugrul B, Uçkay I, Schöni M, Peter-Riesch B, Lipsky BA. Management of diabetic foot Infections in the light of recent literature and new international guidelines. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2020;18(4):293–305.
 - Djahmi N, Messad N, Nedjai S, Moussaoui A, Mazouz D, Richard JL, et al. Molecular epidemiology of staphylococcus aureus strains isolated from inpatients with infected diabetic foot ulcers in an Algerian University Hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(9):E398–404. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12199>.
 - McManus BA, Daly B, Polyzois I, Wilson P, Brennan GI, Fleming TE, et al. Comparative microbiological and whole-genome analysis of Staphylococcus aureus populations in the oro-nasal cavities, skin and Diabetic Foot ulcers of patients with type 2 Diabetes reveals a possible Oro-Nasal Reservoir for Ulcer Infection. *Front Microbiol*. 2020;11:748.
 - Silva V, Almeida F, Carvalho JA, Castro AP, Ferreira E, Manageiro V, et al. Emergence of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus EMRSA-15 clone as the predominant cause of diabetic foot Ulcer Infections in Portugal. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39(1):79–86.
 - Cervantes-García E, García-González R, Reséndiz-Albor A, Salazar-Schettino PM. Infections of diabetic foot ulcers with methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Int J Low Extrem Wounds*. 2015;14(1):44–9.
 - Mottola C, Semedo-Lemsaddek T, Mendes JJ, Melo-Cristino J, Tavares L, Cavaco-Silva P, et al. Molecular typing, virulence traits and antimicrobial resistance of diabetic foot staphylococci. *J Biomed Sci*. 2016;23(1):1–10. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0250-7>.
 - Rolo J, Miraglia M, Turlej-Rogacka A, Empel J, Bouchami O, Fania NA, et al. High genetic diversity among community-associated staphylococcus aureus in Europe: results from a multicenter study. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e34768.
 - Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, et al. Community-acquired methicillin-resistant staphylococcus aureus carrying panton-valentini leukocidin genes: Worldwide emergence. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(8):978–84. <https://doi.org/10.3201/eid0908.030089>.
 - Bekhoucha SN, Cady A, Gautier P, Itim F, Donnio PY. A portrait of staphylococcus aureus from the other side of the Mediterranean Sea: molecular characteristics of isolates from western Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28(5):553–5. <https://doi.org/10.1007/s10096-008-0660-x>.
 - Antri K, Rouzic N, Dauwalder O, Boubekri I, Bes M, Lina G, et al. High prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clone ST80-IV in hospital and community settings in Algiers. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(4):526–32. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03273.x>.
 - Ben Nejma M, Mastouri M, Bel Hadj Jrad B, Nour M. Characterization of ST80 Panton-Valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus clone in Tunisia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;77(1):20–4. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.02.010>.
 - Al-Bakri AG, Bulatova NR, Younes NA, Othman G, Jaber D, Schleimer N, et al. Characterization of staphylococci sampled from diabetic foot Ulcer of Jordanian patients. *J Appl Microbiol*. 2021;131(5):2552–66. <https://doi.org/10.1111/jam.15096>.
 - Udo EE, O'Brien FG, Al-Sweih N, Noronha B, Matthew B, Grubb WB. Genetic lineages of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Kuwait hospitals. *J Clin Microbiol*. 2008;46(10):3514–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.00966-08>.
 - Udo EE, Sarkhoo E. The dissemination of ST80-SCCmec-IV community-associated methicillin resistant Staphylococcus aureus clone in Kuwait hospitals. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2010;9(1):1–7. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-31>.
 - Paul SK, Ghosh S, Kawaguchiya M, Urushibara N, Hossain MA, Ahmed S, et al. Detection and genetic characterization of PVL-positive ST8-MRSA-IVa and exfoliative toxin d-positive European CA-MRSA-Like ST1931 (CC80) MRSA-IVa strains in Bangladesh. *Microb Drug Resist*. 2014;20(4):325–36. <https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0153>.
 - Messad N, Landraud L, Canivet B, Lina G, Richard JL, Sotto A, et al. Distribution of edin in Staphylococcus aureus isolated from diabetic foot ulcers. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(9):875–80. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12084>.
 - Shettigar K, Murali TS. Virulence factors and clonal diversity of Staphylococcus aureus in colonization and wound Infection with emphasis on diabetic foot Infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39(12):2235–46. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03984-8>.
 - Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M, et al. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *PLoS ONE*. 2011;6(4):e17936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017936>.
 - Aouati H, Hadjadj L, Aouati F, Agabou A, Khedher M, Ben, Boussebouda H, et al. Emergence of methicillin-resistant staphylococcus aureus ST239/241 SCCmec-III mercury in Eastern Algeria. *Pathogens*. 2021;10(11):1503. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111503>.
 - Alioua MA, Labid A, Amoura K, Bertine M, Gacemi-Kirane D, Dekhil M. Emergence of the European ST80 clone of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus as a cause of healthcare-associated Infections in Eastern Algeria. *Med Mal Infect*. 2014;44(4):180–3. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.01.006>.
 - Shettigar K, Jain S, Bhat DV, Acharya R, Ramachandra L, Satyamoorthy K, et al. Virulence determinants in clinical Staphylococcus aureus from monomicrobial and polymicrobial Infections of diabetic foot ulcers. *J Med Microbiol*. 2016;65(12):1392–404. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000370>.
 - Khedkar S, Prabhakara S, Loganathan RM, Chandana S, Gowda M, Arakere G, et al. Draft genome sequence of staphylococcus aureus ST672, an emerging Disease clone from India. *J Bacteriol*. 2012;194(24):6946–7. <https://doi.org/10.1128/JB.01868-12%0A>.
 - Shambat S, Nadig S, Prabhakara S, Bes M, Etienne J, Arakere G. Clonal complexes and virulence factors of Staphylococcus aureus from several cities in India. *BMC Microbiol*. 2012;12(1):1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-64>.
 - Mahalkar C, Padhye D, Nandagawali VR, Takale S, Ahdal J, Jain R. Management of acute bacterial skin and skin structure Infections in India: are we equipped to meet the challenges of the growing menace of methicillin-resistant Staphylococcus aureus? *Int Surg J*. 2020;7(9):3172–9. <https://doi.org/10.18203/2349-2902.isj20203821>.
 - Holden MTG, Feil EJ, Lindsay JA, Peacock SJ, Day NPJ, Enright MC, et al. Complete genomes of two clinical Staphylococcus aureus strains: evidence for the evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(26):9786–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402521101>.
 - Kalan LR, Meisel JS, Loesche MA, Horwinski J, Soaita I, Chen X, et al. Strain- and species-Level Variation in the Microbiome of Diabetic Wounds is Associated with clinical outcomes and therapeutic efficacy. *Cell Host Microbe*. 2019;25(5):641–655e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.03.006>.

45. Van Wamel WJB, Rooijackers SHM, Ruyken M, Van Kessel KPM, Van Strijp JAG. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on β -hemolysin-converting bacteriophages. *J Bacteriol.* 2006;188(4):1310–5. <https://doi.org/10.1128/JB.188.4.1310-1315.2006%0A>.
46. Rohmer C, Wolz C. The role of hlb-converting bacteriophages in *Staphylococcus aureus* host adaptation. *Microb Physiol.* 2021;31(2):109–22. <https://doi.org/10.1159/000516645>.
47. Spoor LE, McAdam PR, Weinert LA, Rambaut A, Hasman H, Aarestrup FM, et al. Livestock origin for a human pandemic clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *MBio.* 2013;4(4):e00356–13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00356-13%0A>.
48. Hacker J, Carniel E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. *EMBO Rep.* 2001;2(5):376–81. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve097>.
49. Smith JT, Amador S, McGonagle CJ, Needle D, Gibson R, Andam CP. Population genomics of *Staphylococcus pseudintermedius* in companion animals in the United States. *Commun Biol.* 2020;3(1):1–11. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1009-y>.
50. Sotto A, Lina G, Combescure C, Bourg G, Vidal L, Jourdan N, et al. Virulence potential of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Diabetic Foot Ulcers: a new paradigm. *Diabetes Care.* 2008;31(12):2318–24. <https://doi.org/10.2337/dc08-1010>.
51. Pouget C, Dunyach-Remy C, Pantel A, Schuldiner S, Sotto A, Lavigne JP. Biofilms in diabetic foot ulcers: significance and clinical relevance. *Microorganisms.* 2020;8(10):1580. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101580>.
52. Tristan A, Bes M, Meugnier H, Lina G, Bozdogan B, Courvalin P, et al. Global distribution of Pantone-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(4):594–600. <https://doi.org/10.3201/eid1304061316>.
53. Vu BG, Stach CS, Salgado-Pabón W, Diekema DJ, Gardner SE, Schlievert PM. Superantigens of *Staphylococcus aureus* from patients with diabetic foot ulcers. *J Infect Dis.* 2014;210(12):1920–7. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu350>.
54. O'Connor AM, McManus BA, Kinnevey PM, Brennan GI, Fleming TE, Cashin PJ, et al. Significant enrichment and diversity of the staphylococcal arginine catabolic mobile element ACME in *Staphylococcus epidermidis* isolates from subgingival peri-implantitis sites and periodontal pockets. *Front Microbiol.* 2018;9:1558. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01558>.
55. Shore AC, Rossney AS, Brennan OM, Kinnevey PM, Humphreys H, Sullivan DJ, et al. Characterization of a Novel Arginine Catabolic Mobile element (ACME) and Staphylococcal Chromosomal Cassette Mec Composite Island with significant homology to *S. Epidermidis* ACME type II in Methicillin-resistant *S. aureus* genotype ST22-MRSA-IV. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(5):1896–905. <https://doi.org/10.1128/AAC.01756-10%0A>.
56. Chatterjee SS, Otto M. Improved understanding of factors driving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic waves. *Clin Epidemiol.* 2013;5(1):205–17. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S37071>.
57. Ramdani-Bouguessa N, Bes M, Meugnier H, Forey F, Reverdy ME, Lina G, et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Pantone-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(3):1083–5. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.3.1083-1085.2006>.
58. Djoudi F, Bonura C, Benallaoua S, Touati A, Touati D, Aleo A, et al. Pantone-Valentine leukocidin positive sequence type 80 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying a staphylococcal cassette chromosome mec type IVc is dominant in neonates and children in an Algiers hospital. *New Microbiol.* 2013;36(1):49–56.
59. Ouchenane Z, Smati F, Rolain JM, Raoult D. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Algeria. *Pathol Biol.* 2011;59(6):e129–32. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.11.004>.
60. Lipsky BA, Senneville É, Abbas ZG, Aragón-Sánchez J, Diggle M, Embil JM, et al. Guidelines on the diagnosis and treatment of foot Infection in persons with Diabetes (IWGDF 2019 update). *Diabetes Metab Res Rev.* 2020;36(Suppl 1):e3280. <https://doi.org/10.1002/dmrr.3280>.
61. Seemann T, Prokka. Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014;30(14):2068–9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
62. Ondov BD, Bergman NH, Phillippy AM. Interactive metagenomic visualization in a web browser. *BMC Bioinformatics.* 2011;12(1):1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385>.
63. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1355–61. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>.
64. Center for Genomic Epidemiology. Accessed. February 2020. [Internet]. <http://www.genomepidemiology.org>.
65. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(11):2640–4. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>.
66. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, et al. Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics.* 2015;31(22):3691–3. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>.
67. Hadfield J, Croucher NJ, Goater RJ, Abudahab K, Aanensen DM, Harris SR. Phandango: an interactive viewer for bacterial population genomics. *Bioinformatics.* 2018;34(2):292–3. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx610>.

Corresponding authors

Correspondence to **Mohammed Sebahia**: m.sebahia@univ-ehf.dz.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.