



**HAL**  
open science

# Etude de la flore bactérienne dans les plaies tumorales du sein : incidence des biofilms bactériens sur l'évolution des plaies et le développement d'odeurs

Isabelle Fromantin

## ► To cite this version:

Isabelle Fromantin. Etude de la flore bactérienne dans les plaies tumorales du sein : incidence des biofilms bactériens sur l'évolution des plaies et le développement d'odeurs. Médecine humaine et pathologie. Université de Cergy Pontoise, 2012. Français. NNT : 2012CERG0605 . tel-00838471

**HAL Id: tel-00838471**

**<https://theses.hal.science/tel-00838471>**

Submitted on 27 Nov 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## ECOLE DOCTORALE SCIENCES ET INGIENERIE

Département Biologie, médecine et santé - Sciences de la vie et de la santé

## THESE

Présentée pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Cergy-Pontoise

# ETUDE DE LA FLORE BACTERIENNE DANS LES PLAIES TUMORALES DU SEIN: INCIDENCE DES BIOFILMS BACTERIENS SUR L'EVOLUTION DES PLAIES ET LE DEVELOPPEMENT D'ODEURS.

Par : **Isabelle Fromantin**

Soutenue le 10 décembre 2012, devant le jury composé de :

<b>Mme Véronique Larreta Garde</b> , Professeur - Université de Cergy-Pontoise	: Directeur
<b>Mr Luc Teot</b> , Docteur, HDR – CHU de Montpellier	: Rapporteur
<b>Mr Thierry Jouenne</b> , Professeur – Université de Rouen	: Rapporteur
<b>Mr Claude Huriet</b> , Professeur – Président de l'Institut Curie	: Examineur
<b>Mr Jacques Auge</b> , Professeur - Université de Cergy-Pontoise	: Examineur
<b>Mr François Doz</b> , Professeur – Institut Curie	: Co-Directeur
<b>Mr Damien Seyer</b> , Docteur – Université de Cergy-Pontoise	: Examineur



## **REMERCIEMENTS**

Mes remerciements vont à ceux qui m'ont soutenu pendant ces trois années de thèse, mais aussi à tout ceux qui m'y ont amené, pendant ces vingt années d'exercice infirmier.

Un grand merci à mes mentors : Véronique Larreta Garde pour mon éducation aux sciences, Luc Teot et Sylvie Meaume pour m'avoir tout appris du traitement des plaies, Claude Huriet pour ses conseils stratégiques et politiques, Roselyne Vasseur et Monique Rothan Tondeur pour m'avoir guidé dans mon parcours d'infirmière. Six personnages bien différents, mais qui ont en commun d'être déterminés, visionnaires, avec une grande dose d'humanité.

Merci à ma petite et fidèle équipe (Aurélie Baffie, Alexandra Rivat, Irène Kriegel) pour avoir si efficacement pallié à mes absences, supporté mes humeurs, partagé mes hypothèses, mes doutes, et avoir aussi réussi dans toutes les situations à me faire rire. J'associe à la bonne humeur de cette équipe, ceux qui en sont membre de cœur : Florence Rollot et Léonor Fasse.

Merci aux patients qui m'ont fait confiance tout au long de mon parcours, m'ont appris, fait évoluer, et donné l'envie de continuer. Je ne m'arrêterai pas là et poursuivrai mon travail, c'est promis.

Merci à ceux qui sont jour après jour l'Institut Curie et m'ont aidé, chacun à leur façon : en m'enseignant (Nathalie Cassoux, Vincent Semetey, Marie Christine Escande), en me conseillant (Jose Rodriguez, Philippe Giraud, Yann de Rycke, Marie Christine Falcou), en soignant (mes collègues infirmières, aides soignantes et auxiliaires), en réalisant des manips (Jacqueline Elard), en m'envoyant des articles (Frederique Berger), en ajoutant aux nôtres leurs compétences chirurgicales (Hélène Charitansky, Virginie Fourchette, Séverine Alran, Remy Salmon) ou en assurant leur fonction de chef (Sylvie Dolbeault, Laure Copel, Pierre Bey, François Doz et plus récemment Pierre Teillac).

Merci au laboratoire ERRMECe de l'Université de Cergy Pontoise de m'avoir accueilli, avec une mention spéciale pour Damien Seyer, ainsi qu'au laboratoire LSABM (ESPCI Paris Tech) de Marie Claire Hennion, avec une attention toute particulière pour José Dugay.

Merci à Christiane et Roland Grappin d'avoir su et surtout pris le temps de répondre aux questions naïves d'une non initiée aux sciences et au monde de l'université, ainsi qu'aux Sebastiens (Giraudier et Perrin)

Merci à tous les réticents, septiques et carriéristes de m'avoir donné une si belle énergie à leur donner tort. Qu'ils se rassurent eux-aussi, je continuerai.

Mais mes remerciements vont également à mes amis, neveux et nièces, ma famille (mes sœurs Anne et Caroline). Ils seraient trop nombreux à nommer mais ils se reconnaîtront. Ils constituent mon équilibre. Je finirai par un merci plein de tendresse à ma compagne : Amandine, et à mon adorable petit garçon : Gaëtan. Il a trois ans .... lui aussi.

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	<b>12</b>
<b>PARTIE 1 : Revue de la littérature et analyse critique</b>	<b>16</b>
1. Définition des plaies tumorales	17
2. Epidémiologie	18
3. Flore bactérienne, risque infectieux et odeurs	19
3.1 La flore : les bactéries aérobies et aéro-anaérobies, les germes anaérobies stricts et le biofilm	20
3.1. A. Les germes aérobies et aéro-anaérobies	21
3.1. B. Les germes anaérobies stricts	23
3.1. C. Le biofilm	26
3.1. D. Une flore mixte et interactive	28
3.2. Le risque infectieux	30
3.3. Les odeurs et composés volatils	32
4. Les traitements	37
4.1 Traitements des plaies tumorales infectées localement	37
4.1. A. Les antiseptiques	38
4.1. B. Les pansements à l'argent	40
4.1. C. Le miel	41
4.1. D. Les antimicrobiens non antiseptiques	41
4.2 Traitement du biofilm	42
4.2. A. Les solutions déjà disponibles	42
4.2. A. a. Les nouvelles solutions de nettoyage et de désinfection	42
4.2. A. b. Les produits à base d'iode et pansements à l'argent	44
4.2. A. c. Le miel	45
4.2. A. d. La détersion	45
4.2. A. e. Le traitement par pression négative (TPN)	47
4.2. A. f. La larvothérapie	48
4.2. A. g. L'électrostimulation (et électricité pulsée)	49
4.2. A. h. Les antibiotiques	50

4.2. B. Des perspectives avec des molécules déjà utilisées en médecine, cosmétologie ou dans l'alimentation	50
4.2. C. Des perspectives plus éloignées de la pratique clinique	54
4.3 Traitements des plaies tumorales malodorantes	57
4.3. A. Les pansements au charbon actif	57
4.3. B. Les antimicrobiens	58
4.3. B. a. Les antibiotiques	58
4.3. B. b. Les antiseptiques	60
4.3. C. L'aromathérapie	60
4.3. D. La détersion	60
4.3. E. Le yaourt	61
4.3. F Le curcuma et la chlorophylle	61
5. Les objectifs de l'étude	62
5.1. Objectif principal	62
5.2. Objectifs secondaires	63
5.3. Perspectives	63
6. Problématiques et hypothèses de recherche	63
<b>PARTIE 2 : Matériels et méthodes</b>	<b>65</b>
1. Présentation des différents partenaires	66
1.1. A l'Institut Curie	66
1.2. Le laboratoire ERRMECe	67
1.3. Le laboratoire LSABM	67
2. Méthodologie	67
2.1. Population concernée par l'étude	68
2.1. A. Critères d'inclusion	68
2.1. B. Critères de non inclusion	68
2.1. C. Evaluation clinique	68
2.1. D. Outils nécessaires à l'évaluation clinique	69
2.2. Méthode d'analyse de la flore bactérienne	70
2.4. Méthode de détection des biofilms	71
2.5 Méthode d'analyse des composés volatils	73
3. Modalités de recueil et d'analyses des données	76

3.1. Recueil des consentements et des données	76
3.2. Analyse statistique	77
3.2. A. Analyse univariée	77
3.2 B. Analyse des résultats des composés volatils	77
4. Enquête de perception sensorielle	78
4.1. Objectifs	78
4.2. Méthode	78
4.2 A. Participants	78
4.2 B. Déroulement de l'enquête	78
4.2. C Analyse statistique	79
5. Schéma de l'étude	80
<b>PARTIE 3 – RESULTATS</b>	<b>81</b>
1. Descriptif de la population, des plaies, des symptômes et des soins	82
1.1. Descriptif de la population	82
1.2. Nombre d'évaluations réalisées	83
1.3. Descriptif des plaies	83
Le jour de l'inclusion (J0)	83
Evolution à J0 et J42	85
1.4. Descriptif des symptômes de la plaie	85
1.4. A. Exsudat	86
1.4. B. Odeurs	86
1.4. C. Saignements spontanés	87
1.4. D. Saignements provoqués par les soins	88
1.4 E. Douleur	89
1.5. Descriptif des soins locaux	91
1.5. A. Le nettoyage	91
1. 5. B. Pansements primaires utilisés	91
1. 5. C. Pansements de recouvrement employés	92
1. 5. D. Antimicrobiens	92
2. Microbiologie	93
2.1. Descriptif des résultats microbiologiques	93
2.2. La mixité de la flore et ses conséquences	96

2.3. La quantité de bactéries, le risque infectieux et les signes d'infection	103
2.4. Pansements et microbiologie	108
2.5. Schéma de l'évolution de la flore bactérienne	110
3. Biofilm	111
3.1 Résultat global	111
3.2 Recherche de facteurs cliniques et microbiologiques	111
3.3 Recherche de facteurs liés aux soins et aux traitements	113
3.3. A. Les soins locaux	113
3.3. B. Les traitements médicaux	115
3.4 L'impact clinique et sur les symptômes	115
3.5 Schéma de l'évolution de la flore bactérienne et du biofilm	118
4. Odeurs et composés volatils (COVs)	118
4.1 Résultats de l'enquête de perception sensorielle	118
4.2 Les composés volatils (COVs)	123
4.2. A. Composés volatils et odeurs	124
4.2. B. Les composés volatils : de potentiels biomarqueurs?	133
4.3 Schémas relatifs aux COVs	136
<b>PARTIE 4 – DISCUSSION DES RESULTATS, CONCLUSION, PERSPECTIVES</b>	<b>138</b>
1. Risque infectieux	139
1.1 Equilibre et diagnostic du microbiote et du biofilm	139
1.1. A. Résultats et analyse des pratiques cliniques	139
1.1. B. Surveillance et diagnostic	142
1.1. C. Adaptation des pratiques cliniques	144
1.2 Gestion du risque	144
1.2. A. Risques lié aux résistances bactériennes	146
1.2. B. Résultats et analyse du risque infectieux lié aux bactéries planctoniques	148
1.2. C. Résultats et analyse du risque infectieux lié au biofilm	151
1.3. Perspectives	152
2. Odeur et composés volatils	153
2.1. Résultats et analyse de l'impact des odeurs	154
2.2. Analyse des pratiques cliniques	156
2.3. Perspectives	157

2.3. A. Evaluation des odeurs, de leurs répercussions psychiques et comportementales	157
2.3 B. Développement de topiques anti-odeurs	157
3. Limites de l'étude	159
4. Conclusion - vers de potentiels biomarqueurs	160
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	163
<b>ANNEXES</b>	176
- Annexe 1 : Poster présentant les résultats des tests réalisés <i>in vitro</i> sur l'efficacité de pansements à l'argent sur le biofilm. Travail soutenu par le laboratoire Urgo.	177
- Annexe 2 : Poster présentant les résultats des tests réalisés <i>in vitro</i> sur l'efficacité de pansements au PHMB sur le biofilm. Travail soutenu par le laboratoire Lohmann et Rausher	178
- Annexe 3 : Lettre d'information aux patients	179
- Annexe 4 : Cahier de recueil de données (CRF) de l'étude	183
- Annexe 5 : Publications	203

## **LISTE DES ABBREVIATIONS**

- BHI : Brain Heart Infusion (bouillon de culture)
- BTS : Bouillon Trypcase Soja (bouillon de culture)
- CAR : Carboxen
- CMC : Carboxyméthylcellulose
- COVs : Composés organiques volatiles
- DNase 1 : Deoxyribonuclease 1
- EBSLE : Entérobactéries productrices de Bêta-lactamases à spectre étendu
- EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique
- GC : Chromatographie en phase gazeuse (Gas Chromatography)
- HBOT : Oxygénothérapie hyperbare
- HS : Espace de tête (Head Space)
- IDE : Infirmière diplômée d'Etat
- MG : Médecin Généraliste
- MS : Spectrométrie de masse (Mass Spectrometry)
- NIST : National Institute of Standards and Technology
- PA : PloyAcrylate
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- PHMB : PolyHexaMéthylène Biguanide
- QS : Quorum Sensing
- RAP : RNA III activating protein
- SARM : Staphylococcus Aureus Résistant à la Méthicilline
- Spé : Médecin spécialiste
- SPME : Microextraction en phase solide (Solid Phase Microextraction)
- TOT : Topical Oxygen Therapy
- TPN : Traitement par Pression Négative
- UB : Ulcère de buruli
- VAC : Vacuum Assisted Closure



## INTRODUCTION

Les plaies tumorales semblent ignorées et mal connues. Elles ont pourtant traversé les siècles et fait l'objet de multiples écrits, questionnements et essais de traitements locaux. Ces lésions ont été considéré au départ comme une forme apparente et normale du cancer du sein, et non comme une conséquence possible de son évolution. Leur prise en charge a évolué à mesure des connaissances acquises sur le cancer, la chirurgie et le traitement des plaies, au carrefour de plusieurs disciplines. Des soignants et médecins qualifient encore aujourd'hui ces plaies « d'historiques » lorsqu'elles se présentent sous une forme évoluée.

Les premières descriptions de cancer du sein ulcéré datent de l'Égypte antique et sont retrouvées dans deux papyrus : le papyrus Eber et celui d'Edwin Smith, du nom des archéologues. Dans ce dernier manuscrit, le cas quarante-cinq décrit une tumeur exophytique dans le sein. L'auteur précise que la tumeur s'est étendue au-delà du sein, froide au toucher, et qu'il n'y a aucun traitement.

C'est lors de la période grecque et romaine que la légende attribue la paternité du terme *carcinoma* à un célèbre médecin : Hippocrate, pour désigner un cancer dont la forme liée à la dilatation des veines autour de la tumeur, lui aurait fait penser aux pattes d'un crabe ou d'une écrevisse.

Plus tard, Aulus Cornelius Celsus (25 BC-50 AC), médecin romain influencé par les médecines grecque et égyptienne, dissocie les formes non ulcérées des plaies tumorales en décrivant dans son ouvrage *De Medicina* les différents degrés dans l'évolution du cancer en s'inspirant des descriptions initiales d'Hippocrate : le premier degré appelé "cacoethes" en grec est suivi par un carcinome sans ulcération et ensuite arrive la lésion exubérante, exophytique, sanglante ou « thymium ». Il pensait que seuls les "cacoethes" pouvaient être traités par excision et déconseillait par contre de traiter les lésions plus avancées (ni onguents, ni cautérisation, ni excision).

Galien de Pergame (130-201 AC) qui vénérât Hippocrate et dont les écrits ont fait autorité sur les médecins pendant 1500 ans, décrit assez précisément les plaies tumorales du sein : « *Maintes fois nous avons vu aux mamelles une tumeur exactement semblable à un crabe. En effet, de même, que chez cet animal il existe des pattes des deux côtés du corps, de même, dans cette affection, les veines étendues sur cette tumeur contre nature présentent une forme semblable à celle d'un crabe.* » Galien Livre II, XII (traduction M. Litré). Il recommande des traitements locaux et pour les tumeurs plus avancées comme une cautérisation de la lésion et des racines, purgations et saignées pour évacuer la

bile noire, puis l'application de diverses préparations à la tutie (oxyde de zinc impur), cuivre pyriteux par exemple. La suppuration des plaies n'était pas considérée comme nuisible mais comme favorable à la cicatrisation. Cette idée qui va perdurer jusqu'à la renaissance.

Au moyen âge (476-1500), sous la direction des différents papes, l'inquisition fait régner la terreur en occident. La dissection des corps est interdite et la diffusion des livres interdits punie par le bucher. La médecine est donc exercée par des barbiers-chirurgiens illettrés sans aucune connaissance médicale ou chirurgicale ou par des moines faisant en général fonction d'apothicaires. Des remèdes les plus farfelus circulent. Il est préféré s'en remettre aux saints et aux miracles pour guérir plutôt qu'à la médecine ignorante et incompétente. L'église interdit l'amputation du sein pour traiter le cancer en raison de Sainte Agathe, Martyre chrétienne dont le supplice a été l'amputation des deux seins et qui deviendra d'ailleurs la sainte patronne des personnes atteintes de cancers du sein.

La médecine arabe sera la plus avancée de son temps et va permettre la création d'universités et d'hôpitaux avec du personnel qualifié. Certains médecins arabes se sont distingués, comme Abdulkassis (1013-1106) qui préconisait de n'opérer que les cancers pouvant être excisés en totalité et de ne pas toucher à un cancer dont on ne pourrait tout enlever sous peine de le voir s'ulcérer. Pour les tumeurs non extirpables, la médecine arabe préconisait l'application de pâte caustique (mélange de chlorure de zinc, stibine et *Sanguinaria canadensis*). L'onguent était appliqué pour induire une nécrose progressive des tissus qui étaient peu à peu détergés manuellement ou à l'aide d'onguents huileux. Puis, des onguents favorisant la granulation étaient appliqués.

A la fin du moyen âge, le pouvoir séculier commence à se libérer de la tutelle de Rome, l'inquisition est affaiblie et la science peut reprendre sa marche vers l'avant. Le Barbier-Chirurgien du roi Philippe le Bel, Henri de Mondeville (1260-1320) va à l'encontre de la notion de l'utilité de la suppuration qui tient lieu de règle depuis 1000 ans. Il préconise un parage des plaies au vin chaud et une suture en un temps. Il décrit le cancer du sein comme une tumeur ulcérée avec des bords épais et une odeur très forte, qui caractérise toujours ces plaies aujourd'hui. Il préconise son exérèse si la tumeur peut être retirée en totalité mais conclut que l'ablation partielle de la tumeur résulte en une plaie qui ne guérit pas. « La puanteur du cancer est l'une des plus horribles et indescriptibles et les personnes expérimentées la reconnaissent avant même d'avoir vu le mal » Ph Icarde mémoire de l'académie nationale de chirurgie 2010, 9 (2) : 11-21

A la Renaissance (16<sup>ème</sup> -18<sup>ème</sup> siècle), l'intérêt pour les sciences permet un nouvel essor de la médecine. La thèse de M. Le Dran, chirurgien, rapporte de nombreuses observations de cancers dont celui du sein. Le cancer de la peau y est décrit et son traitement dépend du stade.

Au stade précoce il peut être détruit par l'application d'un caustique (charpie imbibée d'eau mercurielle) qui induit une escarre. Si le caustique est appliqué sur une lésion trop grosse, la lésion va s'ulcérer mais continuer à évoluer. La plaie bourgeonnante peut être alors détruite par une application large du cautère. Le Dran souligne cependant le caractère très mutilant de l'application de caustique et de la destruction par brûlure. Les caustiques utilisés étaient le mercure, la pierre de vitriol, divers acides, et la brûlure thermique.

Le Dran propose une cure chirurgicale de toutes tumeurs cutanées accessibles. Dans les formes inextirpables, il recommande de ralentir de façon palliative le processus par un lavage de la plaie ulcérée par une décoction de cigüe et de morelle, recouvert d'un emplâtre fait de céruse, de minium et de litharge.

Progressivement, les connaissances en anatomie permettent de réels progrès. Certains chirurgiens prônent l'abstention du fait des mauvais résultats de la mastectomie, d'autres conseillent une chirurgie précoce, seule chance de guérison. Il faut imaginer que les mastectomies sont alors réalisées sans anesthésie (analgésie par un mélange d'opiacés), sans antisepsie, avec des moyens de sutures et de coagulation limités, laissant de vastes plaies en cicatrisation dirigée.

Le 19<sup>ème</sup> siècle (révolution industrielle) représente un tournant dans la médecine et la chirurgie, avec l'arrivée de l'asepsie, puis de l'antisepsie. Alfred Velpeau, dans son traité sur les maladies de la glande mammaire publié en 1854, décrit les différentes formes cliniques de cancer du sein et l'évolution métastatique. Puis, la mise au point du microscope et la découverte de la composition des tissus biologiques par des cellules avec des noyaux (Théodore Schwann 1810-1882) ouvre la voie à l'anatomopathologie et la description de la cellule cancéreuse par Rudolph Virchow en 1858.

Le 20<sup>ème</sup> siècle voit l'évolution du traitement du cancer du sein par la découverte des rayons X (Röntgen en 1895), du radium (Pierre et Marie Curie 1898), de l'influence des hormones (G T Beatson 1848-1933), et le développement important de la chimiothérapie. La plaie tumorale ulcérée devient peu à peu (fort heureusement) une forme plus exceptionnelle du cancer du sein, soit liée à l'évolution de la maladie malgré les traitements, soit secondaire à un retard de prise en charge dans un contexte de négligence.

Cependant, bien que nous soyons aujourd'hui en capacité de donner un diagnostic précis (médical, histologique) des plaies tumorales, le caractère évolutif et mutilant de ces lésions en absence de possibilités chirurgicales ou de réponse du patient aux traitements anti cancéreux, alimente encore de nos jours cette image de plaie vivante, hors norme, potentiellement malodorante et associée à une maladie grave. Les patients comparent souvent ces plaies à des « aliens » (êtres extra-terrestres vivant au dépend de leur hôte et responsables à terme de sa mort). L'image inquiétante, voir répugnante de ces plaies semble proportionnelle à l'impuissance ressentie à contrôler leur évolution et leurs symptômes (exsudats, odeurs, hémorragies, douleurs).

Depuis plus de dix ans, la consultation infirmière Plaies et Cicatrisation de l'Institut Curie s'est spécialisée dans le suivi des malades porteurs de plaies tumorales. Malgré la diversification de l'offre des pansements modernes, l'expertise et l'association de compétences multidisciplinaires, la prise en charge de ces patients est bien souvent mise en difficulté par la persistance des symptômes malgré des soins adaptés et rapprochés. Ce constat semble partagé par tous ceux qui s'intéressent à ce type de plaies.

De plus, la chronicité de ces lésions semble être augmentée par l'efficacité des thérapeutiques anticancéreuses qui, en prolongeant l'espérance de vie des patients, favorisent l'apparition des métastases cutanées et / ou la longévité des plaies déjà en place. Ainsi, même si quelques patients cicatrisent ou décèdent quelques semaines après leur première visite, d'autres sont suivis pendant plusieurs mois ou années.

Ce travail de thèse a été l'opportunité d'aborder la prise en charge locale des plaies tumorales selon une démarche scientifique pour établir des hypothèses, améliorer les soins locaux et imaginer le développement futur de nouvelles solutions thérapeutiques, dans le but de perfectionner la prise en charge symptomatique des patients. L'originalité (et la difficulté) de cette démarche a été de fédérer plusieurs spécialités et métiers complémentaires, autour d'un même thème, afin de proposer des résultats et idées pertinentes. Ainsi, des chercheurs, médecins spécialistes, techniciens, ingénieurs et soignants ont participé à ce travail, apportant chacun leurs compétences. Il en résulte une étude et des réflexions au carrefour de la médecine, de la recherche et du soin infirmier, qui demandent à chacun l'effort d'appréhender les autres disciplines pour en comprendre le processus et la finalité. Il ne s'agit bien sûr que d'une étape vers de nouveaux travaux de recherche, dont certains sont déjà en cours.

## **PARTIE 1**

# **REVUE DES LA LITTERATURE ET ANALYSE CRITIQUE**

## 1. Définition des plaies tumorales

Les plaies tumorales correspondent à une infiltration par des cellules tumorales du tissu cutané, des vaisseaux sanguins et/ou lymphatiques. Elles peuvent être liées à une tumeur localement avancée ou une récurrence (métastase cutanée). [Grocott P. 1999, Charitansky H et Fromantin I 2008]

Elles peuvent se présenter sous des aspects très différents : cavitaires, externalisés, superficiels mais étendus, avec présence de fistule [Charitansky H. 2008]. Elles sont le plus souvent associées à la phase palliative de la maladie (initiale ou non) et responsables de nombreux désagréments pour les patients à type d'odeurs nauséabondes, d'exsudats importants, de saignements (provoqués et / ou spontanés) et de douleurs [McMurray V. 2003 - Langemo DK. 2007]. Elles peuvent exposer les malades à des risques infectieux et hémorragiques parfois sévères, nécessitant une hospitalisation ou une prise en charge par des unités spécialisées comme les Unités de Soins palliatifs.

*Photos 1,2 et 3: plaies tumorales du sein (I. Fromantin)*



Chroniques, les plaies tumorales sont le reflet extérieur de la progression de la maladie cancéreuse et leur évolution est dépendante de la réponse du patient aux traitements anti cancéreux. De ce fait, elles deviennent rapidement insupportables pour ceux qui les portent, bien que ce ressenti soit relativisé par la mise en place de soins locaux et une prise en charge appropriée [Lund-Nielsen B 2005].

A ce jour, en complément des thérapeutiques médicales (ex : chimiothérapie, radiothérapie), la prise en charge des plaies tumorales est essentiellement symptomatique, avec des soins locaux adaptés au cas par cas. Pour ce faire, l'ensemble des pansements disponibles est utilisé (ex : alginate, hydrocellulaire, charbon actif), associé à des techniques de soins appropriées (ex : hydrojet, utilisation de MEOPA), sans pour autant pouvoir garantir un contrôle des symptômes.

Aucun pansement n'a été spécifiquement conçu pour ce type de plaie. Une seule solution locale à base de Miltéfosine est proposée dans le traitement des métastases cutanées des cancers du sein [Adderley

U. 2007]. Son application est généralement limitée à des nodules sous cutanés et / ou des plaies de petite taille (ulcérations).

Peu d'études scientifiques ont été réalisées sur ces lésions, contrairement à d'autres types de plaies chroniques (ex : escarre, ulcère) ou aux phases de cicatrisation (ex : épithélialisation). Les quelques travaux réalisés sur ce thème se concentrent presque exclusivement sur les problèmes de qualité de vie et/ou de descriptions de cas cliniques, sans apporter de solutions nouvelles [Lund-Nielsen B. 2005]. Beaucoup de questions restent donc sans réponse [Collier M. 2000].

## 2. Epidémiologie

Comparativement à l'ensemble des plaies chroniques (ulcères veineux, escarres) présentes dans la population générale, les plaies tumorales sont peu fréquentes. Une enquête nationale de prévalence réalisée en France en 2010 estime que le pourcentage de patients porteurs de plaies tumorales par rapport à l'ensemble des patients porteurs de plaies (aigües ou chroniques) s'élève à 1,7 % en ville (Tableau 1) et 1,6 % à l'hôpital [Meaume S. 2012].

Tableau 1 : résultats de l'enquête nationale de prévalence « Vulnus » (2010) auprès des professionnels de ville.

TYPE DE PLAIE	Médecin	Médecin	Infirmier	Total
	spécialiste	généraliste	libéral	
Ulcère Membre Inférieur	39,6%	16,7%	24,9%	26,3%
Lésion Traumatique	11%	41,2%	15,8%	21,2%
Acte chirurgical	8,5%	9,1%	26,9%	17,8%
Autre type de plaie	6,7%	6,8%	6,5%	6,6%
Escarre	1,5%	5,9%	9%	6,4%
Acte médical	16,7%	2,8%	2,3%	6%
Pied diabétique	6,2%	2,9%	6,7%	5,5%
Brulure	3,8%	6,8%	1,9%	3,6%
Morsure ou griffure	1,8%	5,3%	0,8%	2,2%
<b>Plaies tumorales</b>	<b>2,1%</b>	<b>1%</b>	<b>1,8%</b>	<b>1,7%</b>
Kyste	0,4%	0,6%	2,7%	1,6%
Adénite	1,3%	0,5%	0,4%	0,6%
Radiodermite	0,5%	0,4%	0,4%	0,4%
<b>Total</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

La prévalence des plaies tumorales chez les patients traités pour un cancer, toutes localisations confondues, n'est pas bien documentée. Elle est estimée entre 5% et 10% selon les études [Lookingbill DP 1993, Clark J 2002]. Dans l'étude la plus récente [Probst S. 2009] réalisée en Suisse, la prévalence de patients atteints de cancers métastatiques et développant une plaie tumorale est de 6,6%.

L'atteinte cutanée au niveau du sein est la plus fréquente et estimée de 2 à 5% avant celles de la sphère tête et cou ou les atteintes génitales et du pli de l'aîne [Stotter A 1991, Dowsett C. 2002, Lund-Nielsen B 2005].

L'Institut Curie, Centre de Lutte Contre le Cancer, suit chaque année près de 3500 patients pour des tumeurs du sein. En théorie, 70 à 175 d'entre eux seraient donc porteurs de plaies tumorales.

Parmi ces patients, certains se présentent avec des plaies tumorales dites « négligées ». Il s'agit de personnes qui pour diverses raisons, ont ignoré leur maladie ou choisi de ne pas se traiter pendant des périodes plus ou moins longues (de plusieurs mois à plusieurs années) [Dolbeault S. 2010]. Concernant le cancer du sein pour lequel plusieurs pays ont organisé un dépistage de masse systématique et gratuit, les tumeurs localement avancées représentent un pourcentage non négligeable des tumeurs identifiées dans le cadre d'un dépistage (de 2 à 5 % aux Etats-Unis) [Facione 2002]. En absence de traitement, l'apparition d'une plaie tumorale dans le cancer du sein semble être une évolution naturelle de la maladie. En 1962, après l'analyse de données recueillies entre 1805 et 1933 sur 250 malades non traités pour un cancer du sein et suivis au Middlesex Hospital Charity, Bloom et Al rapportent que 68% d'entre eux présentaient une plaie ulcérée étendue [Bloom HJC. 1962]. En moins d'un siècle, l'évolution des traitements anti-cancéreux a permis de réduire considérablement le nombre de tumeurs primitives ulcérées à la peau (à différencier des métastases cutanées). Malgré cela, nous continuons à accueillir régulièrement des patients avec des plaies tumorales évoluées.

### **3. Flore bactérienne, risque infectieux et odeurs**

Parmi les différents désagréments liés à la présence d'une plaie tumorale (écoulements abondant, saignements, douleur), les odeurs nauséabondes représentent un inconfort majeur pour les malades, leur entourage, et les équipes soignantes. Elles posent des soucis récurrents d'isolement social, de difficultés conjugales et entraînent une impression de dégoût, de pourriture, voire de mort imminente [Lazelle-Ali C. 2007]. Les odeurs semblent être liées à la présence de bactéries (anaérobies) présentes dans la masse tumorale ulcérée à la peau. En effet, l'évolution tumorale peut entraîner une hypoxie

tissulaire, puis la formation de nécrose propice au développement de ce type de bactéries, qui produisent à leur tour des métabolites volatils, eux-mêmes malodorants [Clark L. 1992, Clark J. 2007].

Des odeurs peuvent apparaître également sur des plaies non tumorales nécrotiques ou infectées. Dans ce contexte, elles peuvent être plus rapidement éliminées grâce à une détersion mécanique éventuellement associée à l'application d'antimicrobiens (antiseptiques, Argent, PolyHexaMéthylène Biguanide ou PHMB). Ces deux stratégies thérapeutiques ne sont malheureusement pas adaptées à la plaie tumorale qui ne peut pas être débridée jusqu'en zone saine (inutilité du geste, risque hémorragique) et semble ne réagir que partiellement à l'application d'antimicrobiens si les bactéries ne sont pas présentes en surface, mais dans la masse.

La présence d'odeurs désagréables n'est pas systématique, parfois fluctuante ou supplantée par des problèmes hémorragiques ou de douleurs. Les odeurs restent cependant un des symptômes les plus fréquemment cités et désignés comme incommodants, insupportables ou inquiétants. Elles sont intimement liées à la flore bactérienne et font partie des premiers signes infectieux identifiables par les soignants et les patients. Aussi semble-t-il indispensable d'aborder conjointement les problèmes des odeurs, de la flore bactérienne et du risque infectieux.

### **3.1 La flore : les bactéries aérobies et aéro-anaérobies, les germes anaérobies stricts et le biofilm**

Le microbiote des plaies chroniques se constitue à partir de la flore cutanée, de l'environnement et des flores commensales des cavités avoisinant la lésion. Cette flore est donc mixte, les bactéries aérobies et anaérobies semblant interférer entre elles [Bowler PG 1999, Darbas H 2005] (Tableau 2). La rupture de la barrière cutanée liée aux plaies tumorales, plaies d'évolution chronique et parfois de grande taille, implique une colonisation bactérienne, le plus souvent multi bactérienne, potentiellement responsable de phénomènes inflammatoires et suppuratifs observés régulièrement lors des soins.

Tableau 2 : Etudes avec analyses des bactéries aérobies et anaérobies, et leur répartition, sur les plaies non infectées (Bowler PG 1999)

<i>Author (ref)</i>	<i>Study description (N° of wounds)</i>	<i>N° of microbial isolates (% that were anaerobes)</i>	<i>Predominant isolates</i>
Louie et al. 1976	Microbiology of 20 diabetic ulcers (scrapings of ulcer bed and wound edge)	<b>116(45)</b>	<i>Bacteroides spp, Peptostreptococcus spp, Proteus spp</i>
Brook et al 1981	392 specimens taken from burn sites in 180 children	<b>580 (23)</b>	<i>S. epidermidis, S. aureus, alpha-hemolytic streptococci, Propionibacterium acnes, Peptostreptococcus spp, Bacteroides spp</i>
Sapico et al. 1986	49 specimens from 25 pressure sores	<b>130(24)</b>	<i>Bactéroïdes spp, coliforms, P. aeruginosa</i>
Brook 1987	Aspirates from human and animal bite wounds in 39 children	<b>59 from animal bites (37), 97 from human bites (55)</b>	<i>S. aureus, Peptostreptococcus spp, Bacteroides spp</i> (in both wound groups)
Brook et al 1990	Analysis of 584 wounds from many sites	<b>1,470 (62)</b>	<i>Bacteroides spp, Peptostreptococcus spp, S. aureus, Clostridium spp, Fusobacterium spp</i>
Brook 1991	Analysy of decubitus ulcers in 58 children	<b>132 (40)</b>	<i>S. aureus, Peptostreptococcus spp, B fragilis group, P. aeruginosa</i>
Hansson et al 1995	Analysis of leg ulcers without clinical signs of infection in 58 patients	<b>325 (22)</b>	<i>S. aureus, Enterococcus faecalis, Enterobacter cloacae, Peptostreptococcu magnus</i>
Brook et al 1988	43 swab specimens from chronic leg ulcers in 41 patients	<b>97(34)</b>	<i>S. aureus, Peptostreptococcus spp, B fragilis group</i>
Bowler et al 1999	Swab specimens from 30 noninfected leg ulcers without clinical signs of infection	<b>110(36)</b>	<i>S. aureus, Coliforms, coagulase-negative staphylococci, fecal streptococci, Peptostreptococcus spp</i>

### 3.1.A Les germes aérobies et aéro-anaérobies

La provenance des germes aérobies et aéro-anaérobies est :

ENDOGENE : par une auto-contamination du patient à partir de sa propre flore bactérienne naturelle cutanée (commensale ou transitoire), muqueuse, fécale ou d'une infection concomitante. Cette flore est éventuellement modifiée suite à des traitements antibiotiques antérieurs. Or les métastases cutanées apparaissent le plus souvent lors de la phase avancée d'un cancer, après plusieurs lignes de chimiothérapie et des parcours de soins longs et complexes. Les patients sont donc susceptibles d'avoir reçu des thérapies répétées avec un impact sur la flore naturelle.

Sur l'ensemble des plaies, la flore cutanée commensale est généralement relativement stable et constituée principalement de: staphylocoques à coagulase négative (ex : *Staphylococcus epidermidis*), corynébactéries (ex : *Corynebacterium*) et d'autres micro-organismes. La flore transitoire est formée de germes potentiellement pathogènes provenant du tube digestif, génito-urinaire et buccal : entérobactéries, staphylocoques dorés, streptocoques.

*Staphylococcus aureus*, est très souvent retrouvé dans les narines et au niveau du périnée. Il peut temporairement être présent sur certains autres sites cutanés (creux axillaire, espaces interdigitaux) qu'il colonise à partir de son habitat (fosses nasales, gorge). Il est fréquemment retrouvé dès qu'il y a rupture cutanée et peut devenir extrêmement difficile à gérer en cas d'infection, notamment s'il est ou devient résistant aux antibiotiques (ex : SARM – *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline). Il est considéré comme le germe responsable du plus grand nombre d'infections sur les plaies traumatiques, chirurgicales et les brûlures. Mais sur des plaies chroniques telles que l'ulcère veineux, il a été démontré que *S. aureus* est plus fréquemment retrouvé sur les plaies colonisées sans présence de bactéries anaérobies que sur les plaies infectées [Bowler PG 1999].

Streptocoque du groupe A peut être quant à lui à l'origine de cellulites rapidement extensives, fasciites nécrosantes. Sa présence sur une plaie est donc toujours inquiétante.

EXOGENE : par contamination de bactéries de l'environnement (ex : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*) ou de bactéries hospitalières (ex : SARM). Le plus souvent il s'agit d'une contamination par voie manuportée mais elle peut aussi se faire par voie aérienne ou à partir de vecteurs de l'environnement (eau, objets contaminés). Sur les plaies, *P. aeruginosa* est le type de bactérie pathogène d'origine exogène le plus souvent retrouvé.

Il a été observé ces dernières années à l'Institut Curie quelques cas d'infections locales d'origine animale à *Pasteurella multocida*, sur des plaies tumorales. Dans ces situations, les patients avaient tous des animaux domestiques, des pansements non hermétiques et une immunité altérée.

Le tableau 3 récapitule les principaux germes aérobies et anaérobies facultatifs retrouvés sur les plaies chroniques en oncologie (tumorales ou non), suivies par l'Unité Plaies et Cicatrisation, lors d'un bilan effectué avec le service de microbiologie de l'Institut Curie [Escande MC 2004]. Les prélèvements ont été réalisés par écouvillonnage, après nettoyage préalable des plaies à l'eau ou au sérum physiologique.

Tableau 3: bactéries aérobies et aéro- anaérobies facultatives après prélèvements bactériologiques superficiels de plaies chroniques – Institut Curie 2004

Germes aéro-anaérobies facultatives de la flore fécale	Germes aérobies de la flore cutanée et sphère ORL
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Entérobactéries : <i>Escherichia coli</i>, <i>Klebsiella s</i>, <i>Proteus sp</i>, <i>Enterobacter sp</i>, ...</li> <li>• Entérocoques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>▪ <i>Staphylocoques « blanc »</i></li> <li>▪ <i>Streptocoques</i></li> </ul>
Germes aérobies de environnement	Germes d aéro-anaérobies facultatives'origine animale
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Pseudomonas aeruginosa</i></li> <li>• Autres <i>Pseudomonas</i></li> <li>• <i>Acinetobacter</i></li> <li>• <i>Alcaligenes</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Pasteurelles</i></li> </ul>

### 3.1. B Les germes anaérobies stricts

Les germes anaérobies peuvent quant à eux provenir de l'environnement (sol, eau), mais appartiennent le plus souvent à la flore commensale, endogène normale, de l'homme [Dubreuil L 2003]. Elles sont confinées à certains sites et ne colonisent pas d'autres territoires en temps normal.

- Flore cutanée : *Propionibacterium acnes*, *Peptostreptococcus*
- Flore bucco-pharyngée : *Fusobacterium* (en particulier *F. nucleatum*), *Prevotella*, *Veillonella*, *Actinomyces* et cocci Gram +
- Tractus digestif : principalement *Bacteroides* (groupe *Fragilis*), *Bifidobacterium*, *Clostridium*
- Flore vaginale : sans déséquilibre : *Lactobacillus*, cocci Gram +, bacilles Gram – (*Prevotella disiens*, *P. bibia*), et avec déséquilibre : *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Actinomyces*, *Prevotella bibia*, *Peptostreptococcus*, *Gardnerella vaginalis* (anaérobies facultatives)

Dans des conditions normales les bactéries anaérobies, présentes en grand nombre dans l'organisme, n'ont pas de pouvoir invasif. Leur déplacement vers des tissus voisins peut provoquer leur multiplication et les rendre pathogènes, surtout si elles profitent de circonstances favorables telles qu'une déficience immunitaire ou une ischémie tissulaire, éléments associés à la plaie tumorale. Plus généralement, les

bactéries anaérobies sont retrouvées en plus grand nombre sur les plaies chroniques que sur les plaies aiguës étant donné le faible niveau d'oxygénation des tissus [Landis SJ 2008, Abdul R 2010].

Bowler et al [Bowler PG, 2001] insistent sur le fait que les bactéries anaérobies sont souvent négligées même si nombre d'experts s'accordent à reconnaître leur important degré potentiel de virulence [Botta GA 1994]. Cela serait lié au fait que les bactéries anaérobies ne soient pas reconnues comme pouvant entraver le processus de cicatrisation, et aux difficultés à les isoler en dehors d'un cadre de recherche clinique (analyses chronophages, temps limité d'acheminement, mode de prélèvement spécifique). Pourtant, il a été remarqué que les plaies infectées présentaient un nombre d'espèces d'anaérobies plus élevé que les plaies non infectées [Dabras H 2005, Bowler PG 1999] (Tableau 4)

Tableau 4 : Présentation des études avec analyses des bactéries aérobie et anaérobies et leur répartition, sur les plaies infectées (Bowler PG 1999)

Author (ref)	Study description and no. of wounds	No. of microbial isolates (%) that were anaerobes)	Predominant isolates
Sanderson et al. 1979	Anaerobes in 65 purulent post appendectomy wounds (swab samples)	179 (54)	<i>E.coli</i> , <i>Bacteroides spp</i> , <i>Peptostreptococcus spp</i> .
Brook et al. 1981	Analysis of 209 cutaneous abscesses in children	467(58)	<i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus spp</i> , <i>E. coli</i> , <i>Bacteroides spp</i>
Wheat 1986	Analysis of 131 infected diabetic foot ulcers in 130 patients	538 (21)	<i>Peptostreptococcus spp</i> , <i>Enterococcus spp</i> , <i>Staphylococcus spp</i>
Brook 1989	89 specimens from postsurgical abdominal wound infection	235 (55)	<i>E. coli</i> , <i>Bacteroides spp</i> , <i>Peptostreptococcus spp</i> , <i>Clostridium spp</i>
Brook 1989	Specimens from 74 patients with postthoracotomy sternal wound infections	87(22)	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>coliforms</i> , <i>Peptostreptococcus spp</i>
Brook 1989	Analysis of pus from Bartholin's abscess in 28 patients	67(64)	<i>Bacteroides spp</i> , <i>Peptostreptococcus spp</i> , <i>E. coli</i>
Brook et al 1990	Analysis of 676 cutaneous abscesses	1,702 (65)	<i>Bacteroides spp</i> , <i>Peptostreptococcus spp</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Clostridium spp</i> , <i>Fusobacterium spp</i>
Johnson et al 1995	Swab samples from 43 diabetic foot ulcers (46 infected sites)	285 (36)	<i>Peptostreptococcus spp</i> , <i>Prevotella spp</i> , <i>Bacteroides spp</i> (emphasis on anaerobes)
Brook 1995	Analysis of pus from gastrostomy site wound infections in 22 children	102 (44)	<i>E. coli</i> , <i>Peptostreptococcus spp</i> , <i>Enterococcus spp</i> , <i>Bacteroides spp</i> , <i>S. aureus</i>
Summanen et al 1995	Comparison of the microbiology of soft tissue infection in IVDU* and non – IVDU (160 abscesses sampled)	304 (43) from IVDU ; 222(48) from non-IVDU	<i>S. aureus</i> , « <i>Streptococcus milleri</i> », <i>Peptostreptococcus spp</i> , <i>Prevotella spp</i> , <i>Bacteroides spp</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>
Brook 1996	Microbiology of specimens from 8 children with necrotizing fasciitis	21(62)	<i>Peptostreptococcus spp</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Bacteroides spp</i>
Di Rosa et al. 1996	Role of anaerobes in 300 postoperative wound infections	639 (23)	<i>Clostridium spp</i> , <i>Bacteroides spp</i> , <i>Peptostreptococcus spp</i> , (emphasis on anaerobes)

Moussa 1997	Swab samples of burn wounds from 127 patients	<b>377(31)</b>	<i>P.aeruginosa, S.aureus, Bacteroides spp, Peptostreptococcus spp, klebsiella spp</i>
Brook et al. 1997	Analysis of perirectal abscesses in 44 patients	<b>456(72)</b>	<i>B.fragilis group, Peptostreptococcus spp, Clostridium spp, S. aureus, Prevotella spp</i>
Brook 1998	Analysis of 175 specimens from 166 children with infected traumatic wounds	<b>521(70)</b>	<i>Peptostreptococcus spp, Prevotella spp, Fusobacterium spp, S. aureus, B. fragilis group</i>
Pathare et al 1998	Pus or tissue specimens from 252 diabetic foot infections	<b>775 isolates (29)</b>	<i>Staphylococcus spp, Streptococcus spp, Peptostreptococcus spp</i>
Bowler et al 1999	Swab samples of 44 infected leg ulcers (based on clinical signs)	<b>220 isolated (49)</b>	<i>Peptostreptococcus spp, coliforms, coag-negative staphylococci, pigmented and nonpigmented gram-negative bacteria (anaerobes), fecal streptococci</i>

\* IVDU : intravenous drug user

La présence de bactéries anaérobies sur les plaies tumorales est très fréquemment évoquée, bien que peu d'analyses microbiologiques aient été réalisées et croisées avec des données cliniques autre que la présence d'odeurs.

Finlay et al ont réalisé en 1995 une étude pour évaluer l'efficacité du metronidazole en gel sur les plaies malodorantes [Llora G Finlay 1996]. Des prélèvements ont été réalisés sur 47 patients porteurs de plaies malodorantes ; 20 plaies étaient tumorales, mais la distinction entre les différents types de plaies n'a pas été prise en compte dans l'analyse des résultats.

Les prélèvements par écouvillonnages effectués le jour de l'inclusion (J0) sur les 47 plaies ont permis d'isoler 27 bactéries anaérobies strictes (Tableau 5) et 68 bactéries aérobies et aéro-anaérobies. Quatorze jours après (J14) une seule bactérie anaérobie stricte de la famille des *Bacteroides* a pu être isolée dans un prélèvement. Par contre, le nombre de bactéries aérobies et aéro-anaérobies était resté relativement stables (51 bactéries).

Les résultats de cette étude mettent en évidence l'efficacité du metronidazole en gel à 0,75% sur les bactéries anaérobies strictes, avec une réduction significative des odeurs dès J7 malgré la persistance de bactéries non anaérobies strictes. *S. aureus* et *P. aeruginosa* étaient les 2 bactéries les plus fréquemment isolées dans les prélèvements.

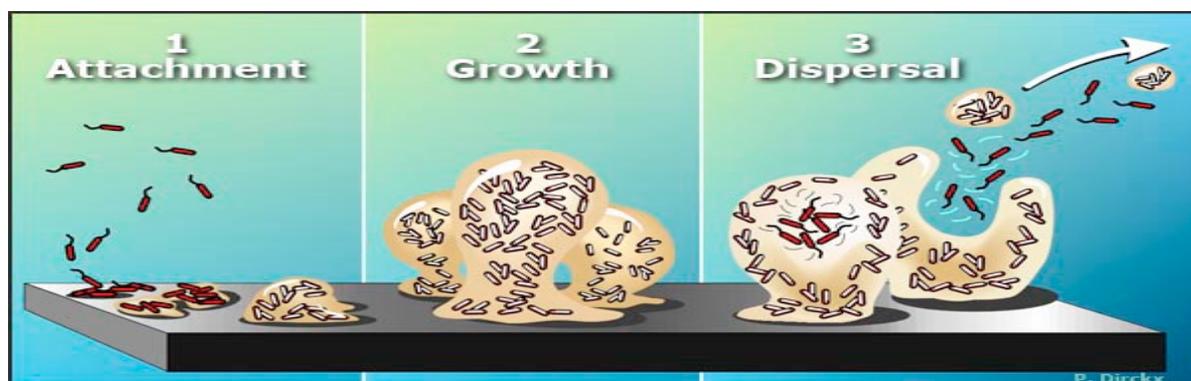
Tableau 5 : nombre de bactéries anaérobies isolées à J0 sur 47 plaies malodorantes, puis après application de métronidazole gel à J14

<b>Bactéries anaérobies strictes</b>	<b>J0</b>	<b>J14</b>
<i>Bacteroides vulgatus</i>	4	-
autres	4	1
<i>Peptostreptococcus anaerobiles</i>	6	-
<i>magnus</i>	2	-
<i>Peptococcus niger et prevotti</i>	5	-
<i>Staphylococcus saprophyticus, saccharolyticus</i>	2	-
<i>Propionibacterium spp</i>	4	-

### 3.1. C. Le biofilm

L'organisation des bactéries en mode biofilm est complexe, mais représente un cas fréquent d'organisation et de développement de bactéries. Au contact d'une interface (air-liquide, air-solide, liquide-solide) les bactéries se structurent en communauté, synthétisent une matrice tri dimensionnelle les protégeant des agressions extérieures (changements de température, force d'écoulement, et dans le domaine de la santé : antiseptiques, antibiotiques). Les biofilms se développent et se fixent sur les surfaces, qu'elles soient inertes (matériau) ou vivantes (plaies, muqueuses). Leur développement s'effectue selon un cycle, en plusieurs phases : l'adhésion, la maturation et le détachement [Black CE 2010] (schéma 1), notamment grâce à un procédé de communication inter-bactérienne appelé Quorum Sensing (QS).

Schéma 1 : cycle de développement du biofilm selon P. Dirckx et D. Davies, 2003



La présence supposée de biofilm qui aurait un impact sur le processus infectieux et / ou sur l'évolution des plaies est de plus en plus évoquée ces dernières années. Elle concernerait plus de 60% des plaies chroniques [James GA 2008] et serait plus occasionnelle sur les plaies aiguës [Black CE 2010]. Le

National Institute of Health (USA) estime que 80% des infections bactériennes seraient liées au biofilm [Ammons CB 2010]. Les travaux réalisés et les hypothèses émises reposent davantage sur des études *in vitro* ou *in vivo* chez l'animal (plaie aigüe) que sur des situations réelles, avec analyses de prélèvements de plaies (aigües et chroniques) de patients. En effet, la mise en évidence et la caractérisation du biofilm ne sont pas réalisables avec les techniques de prélèvements (ex : écouvillonnage) et d'analyses usuelles [Kirketerp-Moller K 2008]. Les travaux expérimentaux, bien qu'utiles, ont une limite majeure : ils ne prennent généralement en compte qu'une seule espèce microbienne alors que dans la réalité clinique, une plaie présente des communautés pluri microbiennes, évoluant dans un contexte dynamique.

Cliniquement, le biofilm n'est pas visible, sauf s'il est très épais. Il est alors souvent décrit comme un enduit visqueux (le slime) à la surface d'une plaie dont le processus de cicatrisation est ralenti, et serait associé à des exsudats abondants et une prolongation de la phase inflammatoire sans signe infectieux franc [Philips P 2008, Black CE 2010]. Certains biofilms pourraient être cliniquement détectés car ils produiraient des pigments uniquement lorsque les bactéries sont organisées en mode biofilm, comme *P. aeruginosa* qui synthétise un pigment bleu, la pyocyanine [Philips P 2008].

Certains auteurs font le lien entre le biofilm et cet entre-deux particulier, lorsque la plaie n'est ni propre, ni réellement infectée, état intermédiaire désigné par le terme « colonisation critique ».

Les bactéries *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, souvent retrouvées sur les plaies (et plaies tumorales) lors de simples prélèvements par écouvillonnage, et mises en cause dans l'apparition d'infections, semblent fréquemment organisées en mode biofilm. Des études *in vitro* ont aussi mis en évidence la présence de bactéries anaérobies dans les biofilms [Sun Y 2009].

Il semblerait qu'un système immunitaire déficient et la présence de tissus ischémiques ou nécrotiques, ainsi qu'un statut nutritionnel altéré soient propices au développement de biofilms [Philips PL 2010].

L'impact du biofilm sur ces plaies, dont la cicatrisation n'est pas toujours attendue, n'est pas connu. Tout laisse à penser qu'il pourrait accroître le risque infectieux (ex : fragmentation brutale du biofilm, récurrences des épisodes infectieux). Dans certaines situations, le biofilm pourrait avoir un effet protecteur. En effet, sur certains sites comme au niveau vaginal, les biofilms seraient protecteurs en prévenant la colonisation de germes pathogènes exogènes [Wilson M 2001, Seven L 2004]. Plusieurs

auteurs s'accordent ainsi sur le fait que le biofilm puisse être protecteur ou pathogène selon les situations.

Wolcott et al ont décrit des signes cliniques et symptômes liés à la présence de biofilm, après observations et analyses de différentes plaies (Tableau 6). Ils ont par ailleurs démontré, sur une série de plus de 60 patients, que le biofilm se développait plus fréquemment sur les plaies chroniques que sur les plaies aiguës, sans être pour autant retrouvé de façon systématique [James GA 2008, Wolcott RD 2010].

Tableau 6 : signes cliniques et symptômes liés à la présence de biofilm, selon Wolcott RD et al.

Signes cliniques	Commentaires
Présence de matériel invasif, séquestre osseux, nécrose	Surfaces propres au développement du biofilm
Présence d'une infection > 30j. Il est important de noter qu'un biofilm mature peut se former en 24h	Des infections de moins de 30j peuvent déjà être liées à un biofilm mature. Par contre, il est peu probable qu'une bactérie circulante persiste au-delà de 30j.
Episodes infectieux répétés	Les symptômes d'une infection chronique
Signes secondaires d'infection (majoration des exsudats, ralentissement du processus de cicatrisation, etc)	Signes infectieux moins importants qu'avec une infection liée au biofilm
Réponse aux corticostéroïdes et TNF alpha inhibiteurs	Il semble contre indiqué de supprimer la réponse de l'hôte. Cependant, les dérivés d'inflammation sont la source nutritive du biofilm. Aussi, une bonne réponse à ces traitements immunosuppresseurs suggère que le biofilm est présent.
Incomplète réponse aux antibiotiques avec réémergence de l'infection à l'arrêt du traitement antibiotique	Les antibiotiques semblent capables de supprimer mais non d'éradiquer le biofilm
Accumulation d'infections sur site (escarre, valve, rhino sinusite chronique, etc)	Le biofilm est capable de se reconstituer lui-même, en utilisant les ressources de l'hôte.

### 3.1. D. Une flore mixte et interactive

En mode libre et circulant, le développement des bactéries anaérobies strictes est le plus souvent lié à la présence de bactéries aéro-anaérobies facultatives qui réduisent localement le potentiel

d'oxydoréduction (potentiel Redox) et créent les conditions favorables au développement des germes anaérobies commensaux présents sur le site. De même, si le biofilm se développe et s'épaissit, des germes anaérobies stricts peuvent survivre et se propager car la diffusion de l'oxygène est alors difficile en raison de la densité du biofilm et de la consommation de l'oxygène par les autres bactéries.

Une étude réalisée par Rotimi VO et Durosinmi-Etti FA (1984) sur 30 plaies tumorales du sein met en évidence la présence d'une colonisation bactérienne importante (Tableau 7) sur ce type de plaie [Rotimi VO 1984].

Tableau 7 : colonisation bactérienne (bactéries aérobies et anaérobies) de 30 plaies tumorales du sein (Rotimi and Durosinmi-Etti)

<b>Bactéries anaérobies</b>	<b>Nombre</b>
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	19
<i>Peptostreptococci</i>	16
<i>Bacteroides fragilis</i>	12
<i>Bacteroides asaccharolyticus</i>	23
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	13
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	7
<i>Bacteroides ovatus</i>	6
<i>Bacteroides spp</i>	7
<i>Eubacterium spp</i>	8
<b>Bactéries aérobies</b>	
<i>Escherichia coli</i>	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
<i>Proteus spp</i>	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	5
<i>Staphylococci epidermidis</i>	7
<i>Group. A/G streptococci</i>	7
<i>Klebsiella aerogenes</i>	3
<i>Acinetobacter</i>	2

Ces résultats sont cependant sujets à discussion car ils ont été réalisés sur un faible nombre de patients et les plaies ont été prélevées par écouvillonnage. En effet, si nous comparons ces résultats à ceux de 30 plaies similaires (tumorales, du sein) prélevées à l'Institut Curie en 2010 (bactéries aérobies ou aéro-anaérobies uniquement), nous observons des chiffres relativement différents (Tableau 8).

Tableau 8 : colonisation bactérienne (bactéries aérobies et aéro anaérobies facultatives) de 30 plaies tumorales du sein, Rotimi 1984 / Institut Curie 2010

Bactéries aérobies et aéro-anaérobies facultatives (nombre)	Rotimi, Durosini	I. Curie
<i>Escherichia coli</i>	11	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	5
<i>Proteus spp</i>	9	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	24
<i>Staphylococci epidermidis</i>	7	0
Group. A/G streptococci	7	2
<i>Klebsiella aerogenes</i>	3	0

Plusieurs de ces bactéries aérobies sont connues pour leurs capacités à s'organiser en mode biofilm comme *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus spp*.

La colonisation, l'adhérence, la formation de biofilm et le développement des bactéries aérobies et anaérobies sur les plaies chroniques semblent constituer un processus dynamique et évolutif, entraînant des phénomènes de coopération et de synergie entre les bactéries, elles-mêmes étant sensibles aux variations de leur environnement. La flore bactérienne est donc susceptible de se modifier et de générer une infection ou des symptômes tels que les odeurs si l'équilibre entre l'hôte et les micro-organismes est rompu par des facteurs environnementaux, chimiques (ex : antibiotiques) ou encore de modification de la résistance de l'hôte (ex : immunodéficience, diabète, dénutrition), facteurs de risques fréquents en oncologie.

### 3.2 Le risque infectieux

Sur les plaies tumorales, poser le diagnostic d'infection locale n'est pas toujours simple, en particulier lorsque le patient est en cours de chimiothérapie. En effet, La chimiothérapie représente un vrai paradoxe dans la gestion des plaies en oncologie: elle peut favoriser la cicatrisation des plaies tumorales, ou tout du moins tenter d'en limiter l'évolution; mais elle majore le risque infectieux en abaissant les défenses immunitaires et ralentit le processus de cicatrisation par son action neutropénisante généralement transitoire (aplasie).

Le pus est principalement composé de globules blancs, aussi la plaie peut-elle être infectée sans présence d'écoulement purulent en cas d'aplasie. De même, la cicatrisation est ralentie voire stoppée

par les traitements, les écoulements de pus et l'arrêt de la cicatrisation ne peuvent donc pas être retenus comme critères d'infection. Aussi est-il nécessaire d'être vigilant face à toute modification inexplicable et brutale de l'aspect de la plaie, une majoration de la douleur sans rapport avec la maladie cancéreuse, un aspect inflammatoire aussi minime soit-il, une majoration brutale des odeurs nauséabondes ou des exsudats.

Le diagnostic d'infection est d'autant plus difficile qu'une plaie tumorale est souvent malodorante - même non infectée, parfois nécrotique, très exsudative et inflammatoire en périphérie à cause de la masse sous-jacente. La distinction entre la colonisation et l'infection de ce type de plaie est difficile ce qui explique certaines prescriptions abusives d'antibiotiques avec un risque de pression de sélection de germes et l'émergence de Bactéries Multi Résistantes (BMR) localement et à distance.

Dans cette situation, l'évaluation par le clinicien est importante; les analyses microbiologiques ou les examens sanguins (marqueurs inflammatoires comme la CRéactiveProtéine ou Procalcitonine) ne pouvant à eux seuls, déterminer le statut infecté ou non de la plaie. En pratique courante, seule la présence des germes aérobies est analysée par les laboratoires de microbiologie (le plus souvent après des prélèvements par écouvillonnages), sans quantification. L'infection, définie comme un taux de bactéries excédant  $10^5$  /g de tissu ne peut être donc être retenue comme un critère de suivi des plaies, hors contexte de recherche clinique.

Les risques infectieux liés à la présence d'une plaie tumorale colonisée sont :

- Le passage d'un état non pathologique : la colonisation bactérienne, à un état pathologique : l'infection locale ou générale (septicémie, sepsis sévère)
- La contamination, puis l'infection de dispositifs médicaux invasifs (ex : cathéter central) situés à proximité des plaies, à partir de la flore bactérienne de ces plaies. Dans ce cas, la plaie est initialement colonisée (absence de signes infectieux), puis s'infecte et / ou fait le lit d'une infection sur des matériaux très sensibles à la contamination, avec un risque de généralisation de l'infection.
- Des risques épidémiologiques de transmission aux autres patients, particulièrement élevés dans les services d'oncologie (patients immunodéprimés), risques encore majorés par le caractère exsudatif de ces plaies (risque de fuite d'exsudats).

En clinique, peu d'infections avérées (fièvre, écoulements purulents, épisode inflammatoire aigu) sur plaies tumorales sont observées et documentées, même si les plaies sont parfois délabrantes, avec exposition osseuse ou encore fistulisées à d'autres organes. Un équilibre presque insolite semble

pouvoir se former entre la lésion et l'hôte (Photo 4) sur des périodes variables. Cet équilibre pourrait être lié au caractère chronique et aux spécificités de ce type de plaie ; le biofilm pourrait aussi participer à cet équilibre.



Photo 4 : plaie tumorale avec fistule pleurale. Patient apyrétique.

Néanmoins, les risques liés à la présence de biofilm sur la plaie semblent nombreux :

- Quand le biofilm se rompt, des bactéries sont libérées et peuvent créer (ou recréer) une infection.
- Le biofilm rend les antimicrobiens (antiseptiques, antibiotiques) inactifs, même lorsqu'ils sont efficaces sur les mêmes bactéries libres, dites planctoniques.
- La matrice polymère du biofilm (polysaccharides, protéines, glycoprotéines,) protège les bactéries du système immunitaire (ex : macrophages, leucocytes) qui régule normalement la prolifération bactérienne, d'où une réaction inflammatoire locale, prolongée, potentiellement délétère à l'évolution de la cicatrisation.
- Le biofilm serait impliqué dans la virulence des bactéries pathogènes [Wagner et al. 2004, 2007]
- Le biofilm inhiberait la migration des kératinocytes. [Black CE 2010]

### 3.3 Les odeurs et composés volatils

L'odeur est une perception, l'impression que produisent sur l'organe de l'odorat les émanations volatiles de certains composés. Pour devenir une odeur, le composé odorant doit être capté par le système olfactif qui le transforme en un message perceptible par le cerveau. Les odeurs sont transmises du nez (épithélium olfactif au niveau du toit de la cavité nasale) au rhinencéphale (« nez du cerveau » – qui assure le sens de l'odorat) via un système nerveux olfactif extrêmement sensible et complexe (activation combinée d'un ensemble de récepteurs). Ces informations olfactives sont complétées par celles du système trigéminal (véhiculant des informations non olfactives mais complémentaires : sensations irritatives par exemple).

Pour que l'odeur soit perçue, elle doit être suffisamment concentrée. En fonction de la concentration, on définit le seuil de détection (*detection threshold*) lorsque le sujet signale la présence de l'odeur sans toutefois l'identifier et le seuil de reconnaissance (*recognition threshold*), plus élevé, lorsque le sujet peut identifier l'odeur. La capacité à percevoir des odeurs varie d'un individu à l'autre. Ces différences sont imputables à différents paramètres comme l'âge, le sexe ou la consommation de tabac.

L'odeur peut être source d'émotions agréables ou désagréables. Le caractère agréable ou désagréable (voire aversif) d'une odeur peut être inné ou acquis, ou pour partie culturel car associé à des souvenirs. Chréa et al ont mené une étude afin d'évaluer l'effet de la culture sur les processus cognitifs mis en jeu dans la structuration des catégories d'odeurs. Ils suggèrent « *qu'il existe un double ancrage perceptif dans l'organisation des catégories olfactives : 1) un ancrage universel qui pourrait être lié à la saillance de certaines odeurs, 2) un ancrage culturel lié quant à lui à la spécificité de certaines odeurs rencontrées seulement dans une culture donnée* » [Chrea C. 2005]

L'évaluation des odeurs n'est pas sans poser problème dans la pratique clinique et la réalisation d'études étant donnée l'absence d'unités de mesures objectives et standardisées. Normalement, les paramètres caractérisant une odeur sont quantitatifs (intensité), qualitatifs (description) et temporels (évolution dans le temps). L'olfactométrie est certes utilisée dans d'autres disciplines (environnement, cosmétologie) par des jurys de nez ou avec des nez électroniques récemment développés. Mais ces méthodes n'ont pas été utilisées dans l'évaluation des plaies et jusqu'à ce jour, les évaluations ne prennent donc en compte que l'aspect quantitatif des odeurs, potentiellement biaisé par l'adaptation ou l'habituation (après une stimulation qui dure un certain temps).

Plusieurs échelles d'évaluation des odeurs des plaies ont été proposées, celles de Haughton and Young et de L. Van Rijswijk cotées chacune sur 4 niveaux, et celle de Grocott (échelle Teler) cotée sur 6 niveaux et spécifique aux plaies tumorales (Treatment Evaluation by a Le Roux's Method) [Haughton W. 1995, Van Rijswijk L 1996, Grocott P. 2001] (Tableau 9)

Tableau 9 : présentation des différentes échelles d'évaluation des odeurs des plaies

Echelle Teler®	Classification de L. Van Rijswijk	Classification de Haugton
5. Absence d'odeurs	Pas d'odeurs près de la plaie	Pas d'odeurs : pas d'odeurs, même à proximité du patient quand le pansement est ôté
4. Odeurs lors de la réfection du pansement	Odeurs près de la plaie	Faible : odeur évidente à proximité du patient, quand le pansement est ôté
3. Odeur perceptible au dessus du pansement en place	-	-
2. Odeur perceptible à une distance d'un bras	-	-
1. Odeur perceptible lors de l'entrée dans la pièce	Odeurs modérées dans la chambre	Modérée : odeur évidente en entrant dans la chambre (2 à 3 m du patient) avec le pansement ouvert
0. Odeur perceptible à l'entrée dans la maison, la salle ou le service	Odeurs fortes dans la chambre	Forte : odeur évidente en entrant dans la chambre (2 à 3 m du patient) avec le pansement en place

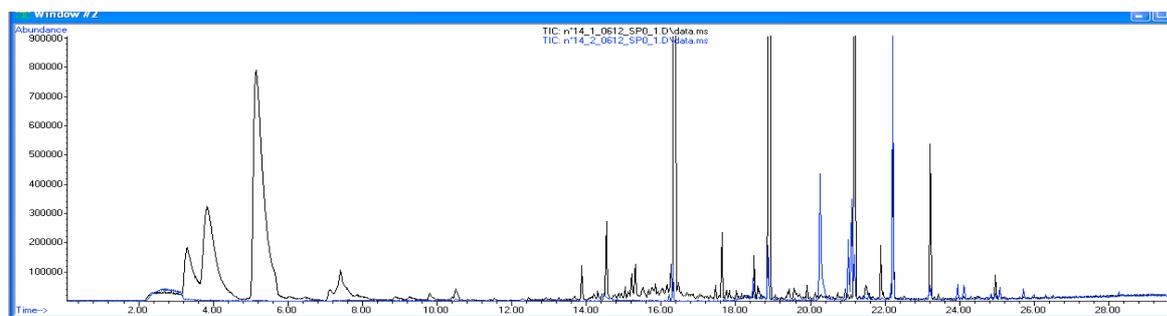
Plus fréquemment, pour la réalisation d'études, des cotations chiffrées ont été utilisées, avec des résultats concordant inter-évaluateurs. Par exemple, dans une étude évaluant l'efficacité du metronidazole, les odeurs ont été évaluées par les médecins, les infirmières et les patients selon une cotation de 0 à 4 (0 = pas d'odeur, 4 = odeur intolérable). Les résultats ont mis en évidence la concordance entre les scores des médecins (median 3, moyenne 3,15) et des infirmières (median 3, moyenne 2,98). Par contre, les scores des patients étaient sensiblement plus bas (median 2, moyenne 2,32) (lié à l'habitude ?)[Ashford RFU, 1980]. Bower et al ont, quant à eux, sur le même thème, utilisé une échelle de 0 à 10 comme outil d'évaluation [Bower M. 1992].

Quoiqu'il en soit, alors que l'ensemble des cliniciens s'accorde sur le caractère volontiers malodorant des plaies tumorales, peu de travaux scientifiques ont été réalisés sur l'identification des composés volatils émanant de ces plaies.

Les organismes vivants (dont les bactéries) produisent une grande quantité de composés organiques volatils (COV) potentiellement odorants pendant leurs processus métaboliques. De tout temps, les médecins se sont servis de leur sens de l'odorat pour orienter le diagnostic de certaines maladies. Il est rapporté qu'Hippocrate utilisait son odorat lors de l'expiration des patients, pour compléter son évaluation et diagnostic clinique [Whittle C.L. 2007]. Ce n'est que dans la deuxième partie du 20<sup>ème</sup>

siècle que le développement d'outils d'analyse comme la chromatographie en phase gazeuse, combinée par la suite avec des spectromètres de masse, a permis de séparer et d'identifier les composés volatils et leur structure. (Figure 1)

Figure 1: analyse d'un pansement usager en chromatographie SPME et identification des composés. Injection en mode splitless avec 2 fibres d'extraction différentes.



**Fibre CAR PDMS 2 (noire)**

Temps de rétention (min)	Composé	Formule chimique	Probabilité	Aire de pics en SP0 (x 10 <sup>6</sup> )
14.534	Heptane, 2,2,4,6,6-pentamethyl-	<chem>CC(C)(C)CC(C)(C)C</chem>	52 %	6.38
22.215	Butylated Hydroxytoluene	<chem>CC(C)(C)c1ccc(O)c(C(C)(C)C)c1</chem>	75 %	11.35

**Fibre PA (bleue)**

Temps de rétention (min)	Composé	Formule chimique	Probabilité	Aire de pics en SP0 (x 10 <sup>6</sup> )
20.260	Benzene, 2,4-diisocyanato-1-methyl-	<chem>CC1=CC=C(C=C1)N=C=O</chem>	85 %	14.11
21.103	2H-Benzimidazol-2-one, 1,3-dihydro-5-methyl-	<chem>CC1=CC=C2C(=O)NCC2=C1</chem>	41 %	8.55
22.210	Butylated Hydroxytoluene	<chem>CC(C)(C)c1ccc(O)c(C(C)(C)C)c1</chem>	80 %	17.02

Une seule publication décrit les COV issus de trois plaies tumorales du sein et deux plaies tumorales de cancer ORL malodorantes (Shirasu M. 2009). Les cinq patients ont définis l'odeur comme soufrée, 2 l'ont associé également à une odeur de fromage et 3 à une odeur de poisson pourri. Les COV ont été extraits de compresses posées sur leurs plaies pendant 6 à 12h et analysés par chromatographie en phase gazeuse par micro extraction en phase solide (SPME), couplé à un spectromètre de masse et un olfactomètre.

L'auteur conclut que : 1) l'odeur de soufre qui semble la plus omniprésente sur les plaies tumorales serait causée par le diméthyle trisulfure (DMTS). Le DMTS est produit par des bactéries aérobies comme *P aeruginosa*. 2) d'autres structures de composés volatils ont été identifiées. Elles peuvent être associées à des odeurs telles que l'acide acétique / odeur aigre, l'acide isobutyrique / odeur de fromage, l'acide butyrique / odeur de fromage et vomit, et l'acide isovalérique / odeur de fromage et de pieds. 3) l'ensemble de ces COV peut être produit par des bactéries anaérobies d'où l'efficacité du métronidazole sur les odeurs, qui en agissant sur ces bactéries, réduit les COV.

D'autres publications se rapportent à des odeurs produites par les tissus cancéreux de différentes localisations (ex : sein, ovaire, poumon). Elles ont été conduites à visée diagnostique, en étudiant la capacité de chiens dressés à détecter par l'odeur la présence de cellules malignes dans différents prélèvements, sur différents sites. Les résultats de ces études montrent une bonne sensibilité (> 88%) et spécificité (> 91%) si les chiens sont correctement dressés. Elles sont donc en faveur du développement possible de futurs outils diagnostiques (biomarqueurs) [McCulloch M. 2006, Gordon T. 2008, Horvath G. 2008].

Les chiens différencient les odeurs des tissus normaux des odeurs directement ou indirectement liées au cancer (ex : inflammation, nécrose, infection). La première référence au sujet de cette capacité des chiens à détecter des tissus malins a été publiée dans le Lancet en 1989 : une femme était venue consulter car son chien s'intéressait à une lésion qu'elle avait sur la peau s'avérant être un mélanome [Williams H. 1989]. Certaines localisations semblent dégager des odeurs très spécifiques puisque les chiens sont par exemple capables de détecter et différencier des carcinomes ovariens (et leurs grades) de carcinomes vulvaires [Horvath G. 2008]. Par contre, dans le cas de lésions ulcérées à la peau, ils ne semblent pas en capacité de différencier un mélanome d'un autre cancer cutané. Certains auteurs émettent l'hypothèse que les odeurs émises par les carcinomes seraient organe – dépendants.

Des COV ont par ailleurs été identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse pour le diagnostic du cancer du sein et des poumons tels que des alcanes, alcanes méthylés, des composants aromatiques et des dérivés de benzène. Mais les concentrations

étaient trop différentes d'un prélèvement à l'autre pour que cette technique soit retenue comme outil diagnostic [McCulloch M. 2006]. Ces résultats restent intéressants pour l'identification des COV sur les plaies tumorales du cancer du sein, car il est possible d'imaginer que les COV de ces plaies diffèrent de celles d'autres plaies malodorantes, étant produits par les bactéries et par la tumeur elle-même.

D'autre part, des études sur l'analyse des COV de l'air expiré ont été publiées car ces travaux pourraient permettre à terme de réaliser des diagnostics précoces et non invasifs de pathologies systémiques (ex : cancer du poumon). La réflexion sur les composés volatils s'est également intéressée au domaine de l'infectiologie avec l'idée d'identifier les composés volatils produits par les bactéries pathogènes, dans le but de développer des outils diagnostiques de microbiologie rapides et précis [Zechman J.M 1986, Edson R.S 1982].

Mais les COVs ne se limitent pas à induire des odeurs ou fournir des informations potentiellement utilisables, certains évoquent qu'ils participent au système de communication inter-bactérienne, susceptible d'influencer la formation de biofilm [Ryan RP 2008, Kai M 2009, Schulz S 2007]. Par ailleurs, les interactions entre le biofilm et les COVs sont utilisées dans l'environnement, avec les biofiltres pour le traitement de polluants, qui sont des matériaux recouverts de biofilm dans lesquels les composés volatils sont absorbés et oxydés.

Les bactéries circulantes, le biofilm et les composés volatils semblent interagir entre eux, en fonction de l'hôte et de son environnement, en créant une dynamique complexe exposant le patient au risque d'infection et d'inconfort.

#### **4. Les traitements**

Certains traitements locaux sont communs aux traitements des odeurs, de l'infection ou du biofilm. Leurs modalités d'administration (mode, durée) peuvent différer selon l'indication pour laquelle ils sont prescrits.

##### **4.1. Traitements des plaies tumorales infectées localement**

En clinique, l'application d'un antibactérien peut être envisagé :

- si le patient présente des signes locaux d'infection, sans signes généraux qui nécessiteraient la mise en place d'un traitement antibiotique par voie générale et rendrait donc inutile l'application simultanée d'antimicrobien.
- si le traitement général ne semble pas suffisant ou efficace (ex : mauvaise diffusion du produit à la surface de la plaie, liée à l'ischémie tissulaire)
- plus rarement, si la colonisation de la plaie génère un risque infectieux élevé par contiguïté. Dans ce cas, la colonisation peut être traitée afin de réduire les risques de contamination de matériaux ou lésions à proximité de la plaie.

#### 4.1. A. Les antiseptiques

L'usage des antiseptiques dans le traitement des plaies chroniques infectées n'a fait la preuve ni de son efficacité, ni de son inefficacité. Ils doivent être utilisés avec précaution étant donné : le caractère cytotoxique de certains d'entre eux lorsqu'ils sont appliqués sur une trop longue période, la diminution ou l'absence d'activité antimicrobienne en présence de matières organiques (ex : pus, protéines, sérum), et le risque de sensibilisation (eczéma de contact, allergie) [Barbaud A 2009]. Etant donné le large éventail de produits antibactériens, le faible niveau de preuves de leur efficacité *in vivo* [HAS 2007] et la complexité de la situation ; il semble nécessaire d'adopter une démarche pragmatique en présence de signes infectieux avérés et d'amorcer une réflexion autour de quatre paramètres :

- le spectre des produits (ex : dérivé iodé, biguanides), leurs contre-indications,
- leur forme galénique (ex : gel, solution) ou le pansement à laquelle la substance active est associée (ex : alginate, hydrocellulaire, compresse),
- les antécédents d'allergie du malade,
- le bénéfice attendu.

Antiseptiques majeurs (bactéricides et à large spectre) :

Halogénés	dérivés iodés ( <b>Bétadine®</b> , <b>PVPi®</b> ), dérivés chlorés ( <b>Dakin®</b> )	Activité létale forte sur les Gram + et les Gram -
Biguanides et ses dérivés	chlorexidine ( <b>Hibitane®</b> ), association d'antiseptiques ( <b>Biseptine®</b> ), PolyHexaMéthylène Biguanide ( <b>Suprasorb® X PHMB</b> ), polyhexanidine ( <b>Lavasept®</b> )	Activité létale forte sur les Gram + et moyenne sur les Gram -
Alcools	alcool éthylique à 90°, ou dénaturé à 70° NB : Leur usage est déconseillé sur peau lésée, mais indiqué pour les désinfections de la peau saine.	Activité létale moyenne sur les Gram + et les Gram -

Argent (Ag) – sauf nitrate	Pansements avec ions Ag (Urgotul® Ag, Aquacel® Ag), Nanocristaux d'Ag (Acticoat®), Sulfadiazine Argentique (S.Ag - Flammazine®), S.Ag et nitrate de cerium (Flammacerium®)	Produits non présentés habituellement avec les antiseptiques malgré leur activité antimicrobienne à large spectre
Miel	Leptospermum (manuka et jellybush)	

#### Antiseptiques intermédiaires (bactéricides à spectre étroit) :

Ammonium quaternaires	(Sterlane®, Cetavlon®)	Activité létale forte sur les Gram + et faible sur les Gram -
-----------------------	------------------------	---

#### Antiseptiques mineurs (bactériostatiques et à spectre étroit) :

Carbanilides	Triclocarban (Solubacter®, Septivon®, Nobacter®)	Activité létale moyenne sur les Gram +, et faible ou nulle sur les Gram -
Diamidines	Hexamidine (Hexomedine®)	Activité létale faible sur les Gram + et nulle sur les Gram -
Acides	acide borique (préparation, solution aqueuse à 3%), acide salicylique (Dermacide®)	Activité sur les bactéries Gram -, essentiellement le <i>Ps. aeruginosa</i>
Dérivés métalliques	nitrate d'Ag, sulfate de cuivre, sulfate de zinc	Activité létale faible ou nulle sur les Gram + et les Gram -

#### Produits considérés à tort comme antiseptiques (aussi appelés « faux antiseptiques ») :

Dérivés mercuriels	Mercurescéine Gifrer®	Activité létale faible sur les Gram + et les Gram -
Peroxyde d'hydrogène	eau oxygénée Action hémostatique précèdent l'utilisation d'un antiseptique	Activité létale faible sur les Gram + et moyenne sur les Gram – et anaérobies
Les colorants	éosine aqueuse 2%, solution de Millian, violet de gentiane Effet asséchant +/- tannant	Activité létale faible ou nulle sur les Gram + et les Gram –

En pratique clinique, sur les plaies chroniques, les antiseptiques sont rarement utilisés s'ils ne sont pas associés à un pansement, d'où l'intérêt pour les pansements à l'argent qui sera détaillé dans le paragraphe suivant. Sous forme de solution, leur action très transitoire limite leur intérêt. Etant donné l'absence de preuve de leur efficacité, il est souvent recommandé de privilégier un nettoyage abondant de la plaie à l'eau ou au sérum physiologique, associé à un drainage efficace (ex : avec un pansement

type alginate, traitement par pression négatif) dès l'apparition de signes infectieux locaux, au lieu d'appliquer un antiseptique [Fromantin I. 2011]

De nouveaux antimicrobiens, présentés comme des solutions de nettoyage ou des antiseptiques, ont fait leur apparition depuis quelques années (Prontosan®, Octeniline®). Leur objectif principal étant le traitement du biofilm, ils seront développés dans le chapitre inhérent à cette problématique.

#### 4.1. B. Les pansements à l'argent

L'argent est un bactéricide avec un spectre large et est disponible sous différentes formes (métallique, sels d'Ag, Sulfadiazine argentique, structure nanocristalline).

Associé à un pansement, l'argent est libéré lorsqu'il rentre en contact avec les exsudats, ce qui implique que la plaie ne soit pas sèche et / ou que le pansement soit préalablement humidifié. Une grande variété de pansements à l'Ag est proposée. Ils se différencient par la quantité d'Ag libérée, la rapidité de relargage de cet Ag, et le support auquel ils sont associés (alginate, hydrocellulaire, fibre de carboxyméthylcellulose, charbon). Ces différences et le fait que l'Ag soit associé à des pansements favorisant eux-mêmes la cicatrisation rend l'évaluation de leur efficacité difficile, et ne permet pas de généraliser leurs bénéfices en une même classe de produits.

Leur activité antimicrobienne *in vitro* a été démontrée, mais leur efficacité sur la plaie pourrait être compromise par les exsudats et le sang qui interféreraient avec les ions Ag [Gupta A 1998, Ip M 2006]. A ce jour et faute de preuves cliniques, ils ne sont pas indiqués en traitement de la plaie infectée en France par la Haute Autorité de Santé (HAS) à l'exception des produits de la gamme Urgo pris en charge sur 4 semaines, pour les ulcères de jambe inflammatoires présentant au moins 3 des 5 signes suivants : douleur entre deux changements de pansement, érythème péri-lésionnel, œdème, odeurs, exsudat abondant [CCLIN Sud-Ouest 2004, Vermeulen H 2007, HAS 2009]. L'interface Urgotul® Ag a en effet fait l'objet d'une étude clinique démontrant son efficacité sur l'ulcère veineux inflammatoire. [Lazareth I. 2006].

Une résistance des entérobactéries (*Enterobacter cloacae*) à l'argent est par ailleurs évoquée, mais sujette à controverse [Fraser JF 2004, Landsdown AB 2007, Percival SL 2008], ainsi qu'une potentielle toxicité sur les kératinocytes lorsque l'argent est fortement concentré [Poon VK 2004]. Malgré tout, ces pansements imprégnés sont très largement utilisés dès l'apparition des premiers signes cliniques d'infection.

Les crèmes à la Sulfadiazine argentique (S.Ag) sont indiquées pour le traitement des brûlures (Flammazine®, laluset® Plus), qui sont donc des plaies aiguës. Un produit à base de S.Ag se différencie des autres dans ces indications car associé à du nitrate de cérium : le Flammacerium®. Cette combinaison semble renforcer son efficacité antibactérienne et permet de former une croûte protectrice sur la plaie. Aussi, même si cette crème était initialement proposée dans le traitement des brûlures, ses indications se sont élargies aux plaies chroniques car ce produit semble permettre de stabiliser les nécroses sur les plaies qui ne cicatrisent pas et dont le débridement est contre indiqué (ex : plaie artérielle ou tumorale). Une étude clinique est actuellement en cours, mais les résultats d'observations cliniques sont d'ores et déjà encourageants [Signe-Picard C. 2010].

#### 4.1. C. Le miel

Tous les miels ne sont pas adaptés au traitement de plaies, leur efficacité (bactéricide) étant dépendante de leur source florale. Aussi est-il conseillé d'utiliser les deux espèces de *Leptospermum* (manuka et jellybush) de Nouvelle-Zélande et d'Australie. Par ailleurs, le miel peut contenir des spores de *Clostridium botulinum*. Il doit donc être préalablement stérilisé et traité par gamma-irradiation avant d'être appliqué sur peau lésée, ce qui écarte les possibilités d'utilisation du miel alimentaire [Molan PC. 1999]. Rapidement inefficace si les exsudats sont abondants (réduction de l'effet osmotique), son application doit être répétée si la plaie est très exsudative (3 fois par jour), ce qui semble en limiter l'utilisation sur les plaies tumorales. Une récente étude comparant l'efficacité du miel (Activon® tulle) versus pansement à l'argent (Acticoat® absorbent) sur 70 patients porteurs de plaies tumorales de localisations différentes a conclu à une absence de différence significative entre les deux produits sur les bactéries présentes sur les plaies, après 4 semaines d'applications [B. Lund-Nielsen 2011].

#### 4.1. D Les antimicrobiens non antiseptiques

De nouveaux produits non antiseptiques sont proposés sur l'indication de plaie infectée et / ou à risque infectieux tels que le Sorbact® (Annexe 1) qui éliminerait les bactéries sans principe actif. Le laboratoire indique que grâce aux propriétés hydrophobes du pansement, les micro-organismes adhèrent aux fibres du pansement (adsorption) et sont éliminés lorsque le pansement est changé [Powel 2009]. Notre expérience de ce produit (observationnelle, série de 10 patients) pendant l'année 2012, a été globalement positive, avec des changements de pansements n'excédant pas 24h. Une étude clinique permettrait de définir les bénéfices du pansement versus interface neutre.

## 4.2. Traitement du biofilm

Le traitement du biofilm pose à ce jour plusieurs problèmes : 1) de diagnostic, 2) de connaissances sur la prévalence et l'impact du biofilm sur les plaies (et les plaies tumorales) qui permettraient d'orienter plus facilement les choix thérapeutiques, 3) d'efficacité de traitements locaux, 4) d'interactions entre les éventuelles solutions anti-biofilm (techniques, produits) et les recommandations de prise en charge des plaies chroniques colonisées qui tendent à contre indiquer les antimicrobiens en absence de signes infectieux. Or à ce jour, l'association de détersion mécanique (perturbation de la matrice) et d'antimicrobiens, répétée quotidiennement, est la solution anti-biofilm la plus souvent mise en avant.

Le biofilm rend les antimicrobiens (antiseptiques, antibiotiques) inactifs, même lorsqu'ils sont efficaces sur les mêmes bactéries libres, dites planctoniques. La matrice n'étant pas une barrière complètement imperméable aux antimicrobiens, elle ne peut à elle seule expliquer cette capacité à rendre les antiseptiques et antibiotiques inactifs.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène : 1) le micro environnement créé par le biofilm et les phénomènes d'adaptation des bactéries sous l'influence du Quorum Sensing (QS) réduirait l'efficacité des antimicrobiens. 2) en mode biofilm, les bactéries, particulièrement celles situées au milieu du biofilm peuvent produire des protéines capables de neutraliser les antibiotiques [Seyer D 2012], 3) au sein du biofilm, dans des zones privées de nutriments et d'oxygène, la croissance des bactéries est stationnaire et ces bactéries deviennent donc résistantes aux antibiotiques qui agissent lorsque les bactéries sont en division (ex : bêta-lactamines), 4) en mode biofilm, les bactéries peuvent subir des modifications génétiques qui les rendraient plus résistantes aux antimicrobiens comparativement à leur mode planctonique [Ammons CB 2010].

Des solutions anti-biofilm sont déjà proposées en pratique clinique. D'autres sont à l'étude, en amont (recherche fondamentale) ou au stade de projet plus avancé.

### 4.2. A Les solutions déjà disponibles

#### 4.2. A. a. *Les nouvelles solutions de nettoyage et de désinfection*

De nouvelles solutions de lavage et/ou antiseptiques sont disponibles en France depuis quelques années. Elles ont en commun de se positionner sur une phase précoce de la préparation du lit de la

plaie : le lavage, d'associer un tensio-actif à une molécule anti bactérienne (même faiblement dosée) et de mettre en avant leur activité anti biofilm. Ces produits, couramment utilisés dans des pays voisins (ex : Allemagne) sont encore peu utilisés en France, par méconnaissance de la notion de biofilm, l'absence d'études cliniques, leur non remboursement et la réticence des cliniciens à appliquer des antimicrobiens sur les plaies chroniques.

Le Protonsan® est un produit de lavage des plaies à base de Polihexanide 0.1%, Betaine 0.1%. Il est disponible sous forme de solution ou gel (BBraun). Son efficacité a été démontrée *in vitro* sur un biofilm à *P. aeruginosa*, comparativement à une solution de Ringer, au sérum physiologique et à la chlorexidine [Hübner NO. 2010]. Il est aussi proposé comme solution de lavage capable de perturber la formation du biofilm, en complément d'un débridement [Andriessen AE. 2008, Kaerhn K. 2009]. Le surfactant contenu dans ce produit (amidopropyl bétaine - bétaine) permettrait physiquement l'élimination du biofilm.

Le même laboratoire commercialise un autre produit (Lavasept®) également à base de PHMB, mais avec adjonction de Macrogol (polyéthylène-glycol 4000), ce qui permettrait d'optimiser la mouillabilité des plaies par réduction de la tension superficielle. Cette solution est utilisée en rinçage antiseptique ou pansement antiseptique et doit être appliquée après dilution de 0,2 mg/ml à 0,4 mg/ml du concentré.

Deux autres laboratoires (Schülke, Hartmann) ont développé des produits à base d'octenidine (dichlorhydrate d'octenidine, antiseptique de la famille des bispyridines). L'Octenilin® et le Stellisan® sont disponibles en solution ou gel et présentés comme des produits de lavage et de désinfection.

Une étude réalisée sur l'animal par Kramer et al (2004) étudiant la prolifération des fibroblastes et la cytotoxicité, conclut que les produits à base d'octenidine retardent la cicatrisation, à l'inverse de ceux contenant du PHMB. Cependant, la concentration d'octenidine contenue dans les produits commercialisés pour le traitement des plaies ne semble pas suffisante pour retarder la cicatrisation. L'efficacité du PHMB sur le biofilm a, quant à lui, fait l'objet de plusieurs travaux, tant autour de ses applications dans l'environnement (ex : désinfection des eaux) que sur l'homme (pansement). Sur la plaie, son efficacité anti biofilm n'est pas clairement établie [Gilbert P. 2001].

Ces produits sont souvent comparés et cités par rapport à leur action anti biofilm [Andriessen AE. 2008, Kaerhn K. 2009]. Mais les travaux réalisés *in vitro*, sur des biofilms mono bactériens (*P. aeruginosa*) et dans les services de recherche et développement des fabricants (non publiés) ne permettent pas de déterminer leur supériorité ou non infériorité sur le biofilm et dans une situation clinique, sur le malade.

#### 4.2. A. b. Les produits à base d'iode et pansements à l'argent

Les produits iodés sont des antimicrobiens très largement utilisés en France dans l'antisepsie des plaies aiguës (ex : Bétadine®) mais leur usage est limité sur les plaies chroniques, tel qu'évoqué dans le traitement des plaies infectées. Leur efficacité sur le biofilm a néanmoins fait l'objet de quelques travaux, seuls ou en comparaison à d'autres agents antimicrobiens comme l'Argent.

Un pansement à base d'iode semble se démarquer des autres produits iodés par rapport à son activité anti-biofilm : Le Iodoflex®. Ce pansement, laissé en place 2 à 3 jours sur les plaies, a la particularité d'absorber les fluides et de relarguer progressivement l'iode, grâce à la réaction entre ses trois composants : le dextran (colloïde), l'épichlorhydrine et l'iode. La combinaison de ces deux propriétés permettrait d'altérer la matrice (en abaissant le taux d'humidité) et d'augmenter ainsi l'efficacité de l'iode sur les bactéries du biofilm.

Dans une étude comparant l'efficacité de différents topiques antibactériens sur un biofilm à *P. aeruginosa*, Philips et al (2010) concluent que la solution iodée type Iodoflex® est active sur le biofilm mature, et que l'ensemble des autres produits au PHMB, argent, nanocristaux d'Ag ou à base d'alginate sont partiellement ou totalement inefficaces. Ce produit a aussi fait l'objet d'une autre étude sur des biofilms à *S. aureus*, avec des résultats également concluants [Akiyama H. 2004].

Le Iodoflex® est à ce jour non disponible en France, à l'inverse des autres dérivés iodés (ex : Bétadine® ou povidone iodée) à priori moins efficaces sur les biofilms, mais finalement très peu étudiés. Une seule étude *in vitro* démontre leur efficacité sur le *S. epidermidis* [Presterl E. 2007].

Concernant les pansements à l'argent, Percival et al. ont réalisé une étude *in vitro*, avec le soutien du laboratoire Convatec (qui commercialise un topique argentique) comparant l'efficacité du pansement en fibre de CMC imprégné d'ions argent (Aquacel® Ag) versus un pansement aux nanocristaux d'argent (Acticoat®) sur des biofilms de différentes souches bactériennes [Percival S.L. 2007]. L'Aquacel® Ag s'est révélé plus efficace que l'Acticoat®, sans pour autant détruire le biofilm. Les auteurs s'interrogent sur une possible action du pansement lui-même, l'Aquacel® étant un pansement drainant et qui se gélifie (fibres de carboxyméthylcellulose de sodium), alors que l'Acticoat® est composé de polyéthylène et polyester.

Une autre étude conduite par Lipp et al a comparé l'efficacité de plusieurs pansements antimicrobiens (à l'argent et au PHMB) et de pansements neutres (compresse, fibres de CMC) sur des colonies et biofilms modèles à SARM et *P. aeruginosa* [Lipp C. 2010]. Si les antimicrobiens ont réduit significativement le nombre de bactéries en mode planctonique, les auteurs concluent à leur inefficacité sur la formation de biofilm.

Des laboratoires (Urigo, Lohmann et Rosher) ont soutenu des travaux visant à démontrer l'efficacité de leurs topiques sur le biofilm. Ces études ont fait l'objet de posters présentés lors de congrès de Plaies et Cicatrisation (Annexes 1 et 2). Sur la base d'une étude réalisée sur les biofilms modèles à *S. aureus* et *P. aeruginosa*, l'interface argentique (Urgotul® Ag) aurait une efficacité supérieure à 97% sur ces deux types de biofilm après 24h d'application. Sur la base d'observation clinique de plaies (présence visible de slime), le pansement Suprasorb® X PHMB, (biocellulose imprégné de polihexanide) serait également actif sur le biofilm. Ces premiers travaux demandent bien sûr à être confirmés par d'autres études étant donnée la différence entre ces résultats et ceux retrouvés dans la littérature.

#### 4.2. A. c. Le miel

Le miel a été appliqué sur les plaies de tout temps en raison ses vertus anti-bactériennes et fait l'objet d'un lobbying important de la part des producteurs. Il semble particulièrement apprécié ces dernières années, notamment par l'image qu'il véhicule, celle d'un produit naturel.

En 2008, une étude a été menée *in vitro*, comparant les effets du Medihoney® versus un miel norvégien propre à la consommation sur différentes souches bactériennes, en mode planctonique et en mode biofilm en formation et à maturité [Merckoll P. 2009]. Les miels se révèlent efficace sur les bactéries en mode planctonique (circulantes) et de ce fait, préviennent la formation des biofilms. Leur effet sur le biofilm mature est par contre plus inégal, selon les souches bactériennes et la concentration de miel. Sur l'ensemble des expérimentations, le Medihoney® (*Leptospermum*) s'avère plus efficace que le miel norvégien, et à efficacité égale avec un miel du Yemen (Sidr honey). Les mécanismes d'action du miel sur le contrôle du biofilm ne sont pas clairement définis [Molan PC. 2006, Alandejani T. 2009, Ammons CB. 2010].

Rapidement inefficace si les exsudats sont abondants, son application doit être répétée si la plaie est très exsudative, ce qui semble en limiter l'utilisation sur les plaies tumorales et exsudatives.

#### 4.2. A. d. La détersion

La détersion mécanique contribuerait à l'élimination du biofilm. Le principe est de rompre le biofilm pour en éliminer une grande partie. Les bactéries restantes sont alors capables de reconstituer un biofilm, mais qui présentera une plus grande sensibilité aux antibactériens en début de formation [Fromantin I. 2010, Wolcott RD 2010]. Si la présence de biofilm est suspectée, il semble donc conseillé de débrider la plaie même en absence de nécrose ou de fibrine, et même si ce geste est potentiellement douloureux

et traumatique. Cette détersion peut être superficielle mais doit être répétée dans le temps car un biofilm peut se reformer en quelques heures seulement. Elle doit être associée à l'application d'un antimicrobien.

Une étude réalisée *in vitro* par Wolcott et al [Wolcott R.D. 2010], après des prélèvements effectués à la curette sur des plaies de souris, d'hommes et de cochons, démontre que la détersion mécanique d'une plaie permet de rendre le biofilm sensible à l'action des antimicrobiens (fenêtre thérapeutique) pendant une courte période de 24 à 48h. Le biofilm à *P. aeruginosa* semble redevenir plus rapidement mature que celui à *S. aureus*.

La détersion mécanique d'une plaie peut être envisagée de différentes façons :

- à la curette, qui paraît être la technique la plus appropriée car elle permet de « racler » la surface de la plaie de façon presque homogène, en limitant au maximum le traumatisme du lit de la plaie.

- au bistouri froid et / ou débridement chirurgical. Cette technique est bien sur efficace mais traumatique (saignement, douleur) en absence de tissus nécrotiques ou fibrineux. Si le geste est superficiel, il doit être homogène sur toute la surface de la plaie, ce qui le rend techniquement délicat. S'il s'agit d'une exérèse plus profonde, elle devrait normalement permettre d'éliminer le biofilm en totalité puisqu'il ne se dépose qu'en surface.

La détersion mécanique sur un lit de plaie bourgeonnant (sans nécrose) et inflammatoire implique sauf exception (ex : neuropathie sensitive) une gestion de l'antalgie et de l'hémostase qui ne semble pas pouvoir permettre que cette technique soit retenue comme un traitement anti biofilm en pratique courante (ex : à domicile)

- avec des hydrojets. Les hydrojets regroupent une grande diversité de produits, de pressions différentes. Le lavage pulsé a été évalué inefficace sur les biofilms de l'environnement par Banin et al [Banin E. 2006], et sur des séries de cas relativement limitées par J. Hurlow et Ph Bowler (2009). On peut donc supposer que les hydrojets à basse pression (< 30 bars) types Jetox® ou JAC® initialement destinés à un lavage avec ou sans détersion des plaies, sont peu / moyennement efficaces sur le biofilm en absence de ré-aspiration et à faible pression. Ils présentent aussi un risque potentiel de dispersion des bactéries.

Par contre, l'hydro-chirurgie (Versajet®) à une puissance de 800 bars, associée à une ré aspiration immédiate (effet venturi) semble efficace sur le biofilm, à l'instar de l'exérèse chirurgicale mentionnée plus tôt [Rhonda S. 2010]. Cette technique implique là encore un cadre adapté (antalgie, hémostase) ce qui semble en limiter l'utilisation, mais présente l'avantage de préserver au mieux les tissus sains avec

un bon contrôle du geste opératoire (homogénéité, profondeur) grâce au confort d'une pièce à main adaptée.

Quel que soit le mode de détersion choisi, des cliniciens proposent de recouvrir la plaie de bleu de méthylène afin de colorer le lit de la plaie et s'assurer ainsi que l'ensemble du tissu superficiel a été débridé en fin de geste [Rhonda S. 2010].

D'autres modes de détersion sont employés, comme l'application de produits destinés à lyser ou ramollir les dépôts de fibrine et nécroses sur la plaie :

- La détersion autolytique qui a pour but de ramollir une nécrose afin d'en faciliter le retrait par un apport élevé d'humidité (ex : pansement hydrogel, hydrocolloïde). De ce fait, elle n'agit que sur les tissus nécrosés en renforçant un processus naturel. Elle ne semble pas avoir un intérêt par rapport à l'éventuelle présence d'un biofilm [Black CE. 2010].

- La détersion enzymatique qui consiste en l'application quotidienne de crème (ex : Elase<sup>®</sup>, Trypsine<sup>®</sup>) composée d'enzymes protéolytiques capables de dissocier les tissus sains et nécrosés. Ces produits ont de moins en moins été utilisés dans le traitement des plaies car ils provoquaient des douleurs, et étaient agressifs pour la peau péri lésionnelle et les tissus. Ils n'ont donc pas fait l'objet de travaux sur le biofilm. Cependant, un produit plus récent (Debrase<sup>®</sup>) composée d'une enzyme extraite de l'ananas (bromélaïne) a fait l'objet d'études cliniques sur les brûlures profondes avec de bons résultats en termes de qualité et rapidité de débridement, avec une action sélective sur les tissus sains. Il serait intéressant d'en étudier l'intérêt sur le biofilm.

#### 4.2. A. e. Le traitement par pression négative (TPN)

Le TPN est positionné sur des plaies préalablement débridées et crée une dépression de 50 à 150 mmHg (jusqu' 200mmHg) afin d'accélérer la phase de bourgeonnement. Pour ce faire, une mousse (ou compresse) est appliquée sur la plaie, recouverte d'un film semi occlusif de polyuréthane, et raccordée à un moteur via une tubulure. Les exsudats sont recueillis dans un réservoir. La pression négative peut être continue ou intermittente, mais reste en place 24h/24h pendant toute la durée de la thérapie (<1 mois)

Une seule étude *in vitro* a tenté de démontrer l'efficacité mécanique de la pression négative sur un biofilm modèle [Ngo Q.D 2011]. La transposition des résultats dans une réalité clinique reste cependant difficile pour un clinicien. Le concept de possibilité de formation ou fragmentation d'un biofilm sous une

pression négative élevée reste néanmoins intéressant, et davantage encore depuis la mise sur le marché d'un nouveau système (VAC Ulta®) capable d'injecter / réaspirer sur la plaie des solutions liquides, à heures régulières et programmées. L'utilisation de la solution à base de Polihexanide 0.1%, Betaine 0.1% a été retenue sur cette indication afin d'être active tant sur les bactéries planctoniques qu'en mode biofilm, et assurer ainsi un lavage plus efficace.

La TPN, contre indiquée à ses débuts sur la plaie infectée est à présent estimée bénéfique sur ces mêmes plaies grâce à un drainage continu, puis à cette nouvelle fonction de lavage/ré-aspiration. Elle reste cependant contre indiquée sur la plaie tumorale car elle favorise le développement des cellules cancéreuses.

#### 4.2. A. f. La larvothérapie

Seules les larves de *Lucilia Seritica* (mouche verte) sont utilisées pour le traitement des plaies car elles provoquent une myase uniquement sur les tissus morts et nécrotiques. Les larves peuvent être conditionnées dans des flacons (sous forme « libre »), mais en pratique courante, elles sont le plus souvent utilisées dans un conditionnement en sachet de gaze synthétique et fermé (« biobag ») ne nécessitant pas de manipulation directe. En contact avec la plaie, les larves sécrètent différentes enzymes protéolytiques qui entraînent une liquéfaction de la nécrose, et permettent ainsi son ingestion par la larve.

L'action antimicrobienne de la larvothérapie est reconnue et documentée [Jaklic D. 2008, Margolin L, 2010], notamment sur *S. aureus* (y compris SARM), *E. coli* et *Proteus*, même si tous les mécanismes de cette activité antimicrobienne n'ont pas été identifiés. Elle serait liée aux enzymes excrétées / secrétées par les larves, et associée à une action bactériophage.

Plusieurs études *in vitro*, ont montré l'efficacité des excréments / sécrétions (ES) des larves de *Lucilia Seritica* sur des biofilms à Staphylocoques avec une efficacité variable sur les biofilms à *P. aeruginosa* [Van der Plas MJ. 2008, Harris LG. 2009, Van der Plas MJ. 2010].

L'utilisation de la larvothérapie en anti biofilm ne semble pas pouvoir être retenue étant données :

1. son utilisation spécifique sur les plaies nécrotiques ; la présence de biofilm n'impliquant pas de facto la présence de nécrose. Aussi, si le biofilm recouvre des tissus vivants ou dépourvus de nécrose, les larves ne seront théoriquement pas actives.
2. son acceptabilité par les patients et soignants : l'application de larves sur les plaies tumorales, même sous un conditionnement en « biobag » pourrait être psychologiquement mal supportée par les patients qui qualifient déjà fréquemment leur plaie de « vivante », en la comparant le plus souvent à un crabe.

3. les contraintes de développement de cette technique du fait qu'il s'agit d'organismes vivants nécessitant un insectarium avec élevage des larves stériles (n'existe pas en France)

Cependant, l'utilisation des ES des larves de *Lucilia Seritica* en anti biofilm pourrait faire l'objet de nouveaux travaux. Des prototypes de pansements imprégnés d'ES de larves ont déjà été imaginés.

#### 4.2. A. g. L'électrostimulation (et électricité pulsée)

L'électrostimulation est utilisée pour le traitement des plaies chroniques dont le processus de cicatrisation semble ralenti ou stoppé. Cette thérapie (ex : Woundel®) stimulerait la migration des macrophages, des leucocytes et des fibroblastes. Elle consiste à administrer des impulsions électriques contrôlées de courant continu par l'intermédiaire de pansement-électrodes posés sur la plaie et reliés à une console. La polarité de ces électrodes peut être négative ou positive. Peu de données scientifiques sont publiées sur cette thérapie, en dehors de séries de cas cliniques ou études sur de petites cohortes de patients [Feedar J. 1991, Jünger M. 2008]. Cependant, l'observation des photos (ulcères, escarres) de ces séries de cas, du lit de la plaie (présence d'enduit visqueux) et la description des situations cliniques (ex : chronicité, ischémie associée) laisse supposer la présence de biofilm.

L'activité antibactérienne (bactéries planctoniques) de l'électrostimulation a été démontrée *in vitro* sur plusieurs types de bactéries (ex : *S. aureus*, *S. Epidermidis*, *P. aeruginosa*) [Daeschlein G. 2007]. Une polarité positive serait plus efficace [Merriman HL 2004]. Par ailleurs, plusieurs travaux sur les effets du courant électrique sur différents types de biofilm ont été réalisés *in vitro*, ou *in vivo* chez l'animal, avec des résultats intéressants. [Wellman N. 1996, Del Pozo JL 2009].

Le mécanisme d'action du courant électrique sur le biofilm reste cependant inconnu. Plusieurs hypothèses sont formulées telles que la production de biocides par électrolyse, une modification du pH, ou une production d'oxygène libre. Une modification de la structure protectrice de la matrice du biofilm (EPS – Extracellular Polymeric Matrix) par le courant électrique pourrait aussi expliquer l'effet synergique observé lorsque ce courant électrique (ou radio fréquence électrique) est utilisé conjointement à un antibiotique type Tobramycine ou Gentamycine (aminosides) [Caubet R. 2004], comme cela a aussi été observé avec les ultrasons [Ammons MC 2010].

L'efficacité de l'électrostimulation ou des ultrasons, seul ou en association avec un antimicrobien pourrait faire l'objet d'une évaluation *in vivo* avec les thérapies disponibles ; les conditions d'expérimentation, ainsi que l'intensité du courant utilisé en laboratoire étant très différents de la réalité clinique (efficacité moindre car intensité faible ?). Par ailleurs, l'efficacité ou le type de thérapie seront

peut-être différents selon la polarité de la matrice, essentiellement cationique pour les bactéries Gram positif, et neutre ou polyanionique pour les bactéries Gram négatif.

Image et photo d'électrostimulation (Woundel®):



DTF medical

Couche médiane : interface conductrice carbone / argent

Couche interne : plaque d'hydrogel assurant la conduction

Couche externe : hydrocellulaire mince adhésif



#### 4.2. A. h. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont les médicaments prescrits dans le traitement de la plaie infectée avec apparition de signes généraux. Ils sont donc utilisés si la fragmentation du biofilm provoque une infection (libération de bactéries circulantes) mais semblent par contre inefficaces sur les bactéries en mode biofilm. Indépendamment de la notion de biofilm, leur application locale est prohibée par l'ensemble des praticiens en raison du risque de pression de sélection des bactéries aux antibiotiques qui peut exposer le malade à des risques en réduisant les possibilités thérapeutiques en cas d'infection.

Il était cependant intéressant de connaître l'efficacité de ces molécules sur le biofilm, en application locale. Des travaux réalisés *in vitro* proposent d'associer un antibiofilm ou une action mécanique anti-biofilm (déterSION) à un antibiotique (ATB), tels que la gentamicine ou les sulfamides. Dans une réalité clinique, le rapport bénéfice / risque pour la plaie et le patient semble critiquable.

#### 4.2. B. Des perspectives avec des molécules déjà utilisées en médecine, cosmétologie ou dans l'alimentation

Les solutions anti-biofilm actuellement proposées semblent aux mieux partiellement efficaces et nécessitent le plus souvent d'être associées. Le développement de nouvelles solutions thérapeutiques est donc souhaitable. L'utilisation de molécules déjà utilisées sur l'homme et / ou en médecine faciliterait le temps de conception de ces produits. Une revue de la littérature nous montre que quelques

molécules semblent avoir des propriétés anti-biofilm potentiellement intéressantes et exploitables telles que :

- Le Gallium, déjà utilisé en médecine par voie générale pour traiter l'hypercalcémie (mais peu prescrit car néphrotoxique) ainsi qu'en imagerie. Il aurait une activité antimicrobienne (sur les bactéries planctoniques) et inhiberait le développement du biofilm. Des brevets de produits contenant du Gallium, destinés à la prévention ou traitement de biofilms (oraux, pansement) ont été récemment déposés [Ammons CB. 2010]

Le Gallium (Ga) est un métal de transition qui interfère avec le métabolisme cellulaire du Fe qui est nécessaire à la croissance de pratiquement toutes les bactéries (excepté lactobacilles et *Borrelia burgdorferi*). Or l'organisme n'est pas / peu capable de distinguer le  $Ga^{3+}$  du  $Fe^{3+}$ . L'administration de Ga permettrait donc de perturber le processus dépendant du Fe essentiel au développement des bactéries et du biofilm afin d'augmenter la résistance de l'hôte aux infections.

- La lactoferrine qui se lie au fer et a des effets bactériostatiques et bactéricides. Elle stimule naturellement l'immunité et est notamment présente dans le lait de vache comme dans le lait maternel. Elle bloquerait la formation du biofilm en stimulant la mobilité cellulaire, peu propice à la formation du biofilm, en séquestrant le Fe libre [Singh PK. 2002], sans agir sur les bactéries libres. Par ailleurs, il est prouvé, mais là encore seulement avec *P. aeruginosa*, que la lactoferrine est capable de pénétrer la matrice du biofilm [Ammons MC. 2009]. Des produits à base de lactoferrine d'origine bovine sont d'ailleurs commercialisés sous forme topique (Bioferrin® 5000) et indiqués dans le traitement des plaies. Des brevets ont été déposés [Ammons MC. 2010]. L'utilisation de produits d'origine animale reste cependant délicate (ex : prions) et semble freiner les possibilités d'application.

- La Conalbumine (ovotransferrine) : protéine retrouvée dans le blanc d'œuf de poule, pourrait avoir une activité anti biofilm proche de celle de la lactoferrine. Son utilisation ne semble cependant pas raisonnable étant donné son caractère très allergisant. Il est possible de s'interroger sur le fait que son activité bactéricide et anti-biofilm soit liée à une enzyme : le lysozyme, qui est également un composé du blanc d'oeuf, et qui pourrait être active même si elle n'est présente qu'à l'état d'impureté dans la conalbumine.

- L'EDTA (Acide éthylène diamine tétra acétique) qui est déjà utilisé entre autres dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie. Il semblerait avoir une efficacité partielle sur le biofilm en participant au détachement des bactéries (interférence avec le Fe) et en augmentant la perméabilité cellulaire. Son

efficacité serait potentialisée en association avec d'autres agents anti - biofilm tel que la gentamicine [Donelli G 2007]. Des études ont démontré l'efficacité anti biofilm du tetrasodium EDTA, *in vivo*, sur des cathéters d'hémodialyse [Kite P. 2004] et celle *in vitro* du Disodium EDTA pour inhiber la formation du biofilm à *S. epidermidis* également sur les cathéters [Ammons CB. 2010].

Un topique en gel à base d'EDTA (RescuDerm™) est déjà commercialisé et indiqué pour les brûlures mineures (effet antalgique et prévention des complications). Il a fait l'objet d'une étude *in vitro* sur son activité antibiofilm à *P aeruginosa* et antibactérienne [Martineau L. 2007]. L'EDTA est aussi un puissant inhibiteur des MMP dont le rôle est bien connu dans l'évolution de la cicatrisation des plaies chroniques.

- Le Xylitol qui est utilisé dans la composition de certains chewing-gums pour prévenir la formation des caries (sujet à controverse), ou en substitut au sucre dans l'alimentation. Il est plus souvent extrait de l'écorce du bouleau. Son activité antibactérienne est faible, mais prouvée. Il a fait l'objet de travaux sur les biofilms de la plaque dentaire, avec une activité anti biofilm prouvée sur les bactéries spécifiques de ce site [Badet C 2008]

Ammons et al ont évalué *in vitro* l'efficacité du xylitol associé à la lactoferrine sur les biofilms à *P. aeruginosa* (Bioferrin®). Cette association s'est avérée plus efficace qu'en appliquant isolément la lactoferrine ou le Xylitol, avec un effet synergique. En effet, cette association semble inhiber l'activité bactérienne en perturbant la structure du biofilm et en rendant perméable la membrane des bactéries présentes dans le biofilm. D'autres travaux ont démontré son efficacité en prévention de la formation des biofilms à *S. aureus* [Katsuyama M, 2005]

Il est à noter que la consommation de xylitol seule peut, à long terme, faire émerger des résistances [Trahan L. 1987] ce qui rendrait son utilisation impropre au traitement des plaies, à moins qu'une utilisation en association réduise ce risque.

- Le Delmopinol qui est un alcool aminé utilisé en odontologie (ex : Decapinol®). Ce produit n'a pas d'effet bactéricide mais pourrait prévenir la formation du biofilm. Les travaux réalisés reposent uniquement sur les bactéries présent dans la cavité buccale (ex : *Streptococcus sanguinis*) [Burgemeister S. 2001].

- Le Sélénium, Oligo-élément et anti-oxydant retrouvé dans les aliments et l'environnement. Un apport minimum de sélénium est d'ailleurs indispensable pour se maintenir en bonne santé (ex : contribue au maintien des muscles squelettiques et cardiaques). Le sélénium (Se) serait actif sur l'adhérence, la formation et la maturation du biofilm. En 2009, un prototype de pansement à base de cellulose

imprégnée de 0,2% de sélénium a d'ailleurs prouvé son efficacité *in vitro* sur des biofilms à *P. aeruginosa* et *S. aureus* [Tran PL. 2009].

- Le Farnesol qui est un parfum (alcool sesquiterpène acyclique) incorporé dans de nombreux produits cosmétiques (déodorant) et ménagers. Ses propriétés antibactériennes sont reconnues. Par ailleurs, plusieurs études ont démontré son efficacité sur des biofilms à *S. aureus*, *S. epidermidis* et *C. albicans* [Gomes FI. 2009, Unnanuntana A. 2009, Deveau A. 2011]. Cependant, il appartient à la liste des 26 substances parfumantes les plus sensibilisantes. Son important potentiel allergisant semble le rendre incompatible au développement de produits destinés au traitement des plaies.

- La DNase 1 (Deoxyribonuclease 1) qui est déjà utilisée en thérapeutique pour traiter les encombrements bronchiques et / ou chez les patients atteints de mucoviscidose, avec le Pulmozyme® (protéine humaine glycosylée et phosphorylée produite dans une lignée cellulaire d'ovaire d'hamster chinois). La DNase 1 est une enzyme qui inhibe la formation de biofilms de bactéries Gram + et Gram - par des mécanismes encore inconnus. Elle peut aussi détacher le biofilm selon son degré de maturité, ce qui laisse supposer que le biofilm pourrait produire des bactéries résistantes à la DNase 1 ou que des molécules interfèrent avec son activité. Par ailleurs, la DNase 1 augmenterait l'efficacité des antibiotiques et antibactériens sur le biofilm [Kaplan JB 2006].

- La combinaison de bismuth et de thiols (BTS) permettrait d'obtenir un biocide à large spectre, actif sur plusieurs types de biofilm (ex : Staphylococoques, Pseudomonas) (Domenico P 2001). Le bismuth a très longtemps été utilisé en médecine pour soigner notamment diverses pathologies digestives (ex : ulcère gastrique) ou cutanées, avant de se voir imposer une utilisation très restrictive en raison de sa toxicité. Différentes préparations de Bismuth thiols (bismuth-2,3-dimercaptopropanol - BisBAL, bismuth-1,3-propanedithiol/bismuth-2-mercaptopyridine N-oxide - BisBDT/PYR) semblent être actives sur les bactéries en modes planctoniques et biofilm, et compatibles avec un usage médical [Folsom JP 2011]. Un produit anti-biofilm a d'ailleurs été breveté aux Etats Unis en 2008 (inventeurs : Brian L. Bates, Michael C. Hiles, Chad E. Johnson), mais aucune étude clinique n'a été publiée à ce jour.

- Des médicaments comme le sulfathiazole (antibiotique de la famille des sulfamides) et le fluorouracil (anti cancéreux) qui inhiberaient l'activité du c-di-GMP et sont donc susceptibles d'être efficaces sur la formation du biofilm [Ueda A. 2009, Antoniani D. 2010]. Le c-di-GMP (monophosphate cyclique diguanilique) est une molécule de signalisation secondaire (médiateur) qui régule le biofilm (morphologie, quantité de bactéries). Il fait partie de la cascade de réactions conduisant à la formation et maturation

du biofilm. Fournir à la bactérie du c-di-GMP synthétique pourrait perturber son cycle interne et donc la formation du biofilm.

Cependant, bien qu'il soit important de réfléchir à des solutions efficaces sur le biofilm, il semble aussi primordial d'évaluer le rapport bénéfice-risque-effets secondaires de l'application de ces produits dans une réalité clinique, ce qui semble exclure leur utilisation sur l'indication anti-biofilm (sauf exception).

#### 4.2. C. Des perspectives plus éloignées de la pratique clinique

Des solutions pour l'instant *a priori* plus éloignées de la pratique clinique sont elles aussi envisagées. Ces travaux fondamentaux sont des étapes indispensables pour faire progresser les réflexions et les connaissances autour de la problématique du biofilm en vue d'applications sur l'homme. Une revue de la littérature permet là encore de mieux cerner les études en cours et / ou réalisées ces dernières décennies.

- Les inhibiteurs du Quorum Sensing (QS) qui est le système de communication permettant aux bactéries de s'organiser en biofilm, de produire la matrice du biofilm constituée majoritairement d'exopolysaccharides (EPS). C'est un processus de régulation complexe, qui diffère selon le type de bactéries, voire de souches. Les inhibiteurs du QS sont donc envisagés différemment selon le type de bactéries

1) Sur les bactéries Gram négatif, la furanone halogéné a fait l'objet de travaux. Il s'agit d'un composé chimique d'une algue rouge (*Delisea pulchra*) découverte au large de la côte australienne. La furanone hallogénée empêcherait *P. aeruginosa* de s'organiser en mode biofilm en inhibant le QS, sans pour autant interférer sur son développement lorsqu'il n'est pas en biofilm [Hentzer M 2002]. Ses effets toxiques et cancérogènes limiteraient son utilisation [Hentzer M 2003]. Des antibiotiques tels que les quinolones et l'azithromycine (macrolide) seraient également inhibiteurs du QS.

2) Sur les bactéries Gram positif, différentes études ont été réalisées sur l'hamamelitannine, extraite de l'écorce d'hamamélis de Virginie (café du diable, noisetier des sorcières - nom botanique : *Hamamelis virginiana*) et déjà utilisée en médecine traditionnelle pour ses capacités astringente et faiblement antibactériennes [Lauk L. 2003]; mais aussi sur la RNA III activating protein (RAP) (une des molécules nécessaires au développement du biofilm sous l'influence du QS, comme le sont TRAP (target of RAP) ou l'agr) par un effet d'inhibition.

En effet, le mécanisme d'action de l'hamamelitannine est analogue à celle des inhibiteurs de RNA III (RIP) dont l'efficacité a été démontrée *in vivo*, sur des modèles animaux (souris, chien) avec des plaies infectées à *S. aureus* sensible et résistant à la méticilline. Dans cette étude, le RIP a été appliqué en association avec un pansement hydrocellulaire (Allevyn®) [Kiran MD. 2008].

Le développement d'inhibiteurs est une approche possible. A ce jour, hamamelitannine et RIP semblent prévenir la formation de biofilm ou traiter les infections à *S. aureus*, et pourraient selon les premières études être appliqués localement, sans effets toxiques.

- La Dispersin B (DspB ou  $\beta$ -N- acetylglucosamidase) qui est une enzyme bactérienne, produite par *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Gram -) et potentiellement exploitable pour son activité antibiofilm car non toxique pour les cellules humaines [Donelli G. 2007]. Elle agit sur le poly-N-acetylglucosamine (PNAG), polysaccharide produit par les bactéries telles que *S. aureus* ou *S. epidermidis*, et principal composant de la matrice de leurs biofilms. Par conséquent, la DspB n'aurait une activité anti-biofilm que sur les bactéries produisant du PNAG et organisées en biofilm [Kaplan JB. 2006]. Elle permettrait le détachement et la dispersion du biofilm mature. Etant donné qu'elle n'agit que sur la matrice et la désorganisation du biofilm, sans tuer les bactéries, il semble nécessaire de l'associer avec un antimicrobien afin de compléter son efficacité par une action bactéricide.

Une étude réalisée *in vitro* démontre son effet synergique avec la Céfamandole, antibiotique de la famille des céphalosporines de la 2ème génération, indiquée dans la prophylaxie des infections post opératoires [Donelli G. 2007]. Les bactéries fréquemment rencontrées dans les plaies type SARM, *Pseudomonas* et Bactéroïdes sont résistantes à la Céfamandole comme à la DspB.

La DspB et DNase 1 auraient un effet synergique.

- L'alginate Lyase qui est une enzyme susceptible de dégrader l'alginate, essentiel au développement (adhérence et maturation) du biofilm, notamment à *P. aeruginosa*. L'alginate lyase permettrait en effet le détachement des bactéries [Boyd A. 1994], d'où une utilisation en association avec un agent antimicrobien. Elle aurait un effet synergique lorsqu'elle est utilisée avec des antibiotiques type gentamicine [Alkawash MA. 2006]. Son efficacité ciblée sur *P. aeruginosa* en limite cependant l'intérêt pour le traitement des plaies.

- Les bactériophages avec l'utilisation de virus qui permettraient d'infecter et dégrader la matrice du biofilm. Plusieurs études réalisées *in vitro* ont démontré leur efficacité, telles que celle de Doolittle et al.

(1996) sur *P. aeruginosa* et *E. coli* avec des phages T4 et E79, ou celle de Hughes et al (1998) sur des biofilms de bactéries de l'environnement (*Enterobacter agglomerans* et *Serratia marcescens*). Hughes et al concluent cependant au regard de leur étude et des autres travaux réalisés qu'il semble improbable que les bactériophages soient adaptés à des biofilms de communautés pluri microbiennes. Cette hypothèse les rendrait impropres au contrôle des biofilms retrouvés sur les plaies.

- L'approche probiotique qui consiste à étudier l'effet anti-biofilm de bactéries. *Lactobacillus* ou *Escherichia coli* souche Nissle 1917 ont été évalués sur des biofilms oraux, de la flore gastro intestinale et vaginale [Hancock V. 2010, Söderling EM. 2010]. L'effet probiotique pourrait agir sur l'adhérence nécessaire à la formation du biofilm ou sur le QS [Reid G. 2008]. Mais les travaux réalisés semblent très ciblés sur des interactions étroites entre une souche de bactérie probiotique et un type de bactérie (planctonique ou en mode biofilm). En 2010, Sadowska et al. ont démontré *in vitro* que *Lactobacillus acidophilus* perturbe l'adhésion de *S. aureus*, ce qui pourrait être potentiellement intéressant pour le traitement des plaies où cette bactérie est très fréquemment isolée

- La nisine (E234) qui est une bactériocine autorisée comme additif alimentaire. Les additifs alimentaires conservateurs sont utilisés pour inhiber les espèces pathogènes (ex : *Clostridium botulinum*) et assurer la stabilité microbiologique des aliments. La nisine est un métabolite secondaire synthétisé naturellement par les souches de *Lactococcus lactis* spp *lactis* (*Streptococcus lactis*, *Lancefield* groupe N). On la retrouve dans le lait cru. Elle est active sur les espèces sporogènes. Sur les bactéries, elle provoque une altération membranaire et une perte de la force motrice.

Klaenhammer (1988) définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram +. Aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques avec une activité contre des bactéries Gram - n'a été décrite. Son spectre d'action cible certaines souches des genres *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Bacillus* et *Clostridium* ce qui semble restrictif par rapport à la colonisation plurimicrobienne d'une plaie [Champak C. 2005].

Dans une étude *in vitro* comparant l'efficacité de la nisine, du chlore, d'un ammonium quaternaire et du glutaraldehyde sur *S. epidermidis* en mode planctonique et biofilm, Davison et al. concluent que la nisine est active sur les bactéries présentes dans le biofilm, sans agir pour autant sur la matrice du biofilm (Davison W.M. 2010). Une autre étude a évalué *in vitro* l'efficacité de la nisine sur trois bactéries Gram + (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*) en mode planctonique et biofilm et conclut à une

efficacité tant en mode circulant que biofilm, dépendante de la concentration de la nisine [Nostro A 2010].

Au-delà de l'efficacité de la nisine elle-même, le concept de prévenir ou traiter le biofilm avec des agents naturels type peptide est une alternative particulièrement intéressante, à l'instar des enzymes ou des inhibiteurs du QS [Glinel K 2012].

Sur les plaies, l'enjeu de la prochaine décennie semble d'être en capacité : 1) d'évaluer cliniquement le risque lié à la présence de biofilm (prévalence, conséquences), 2) de développer des solutions efficaces sur le biofilm, sans déséquilibrer la flore bactérienne circulante, 2) de permettre le diagnostic de biofilm (outils ou signes cliniques), 3) de contrôler efficacement les symptômes (douleurs, écoulements, odeurs) ou risques (ex : infection) liés à la présence de biofilm

### **4.3 Traitements des plaies tumorales malodorantes**

Différentes stratégies médicamenteuses (antibiotiques), topiques (pansements adsorbants, antibactériens) ou présentées comme « naturelles » (miel, curcumin, huiles essentielles) ont été développées, seule ou en association, pour lutter contre les odeurs, avec des résultats variables en termes d'efficacité.

#### 4.3. A. Les pansements au charbon actif

Ils font fonction de filtre d'odeur sans être pour autant efficaces sur l'étiologie [Williams C. 2000] excepté s'ils sont aussi imprégnés d'un bactéricide. Le charbon actif est très peu sélectif et adsorbe les gaz volatils. Il peut par contre être saturé si les odeurs sont trop importantes.

Différents pansements au charbon sont actuellement disponibles sur le marché français (Carbonet®, Carbosorb®, Actisorb®, Vliwaktiv® et Carboflex®). Ils sont très largement utilisés car représentent une solution simple et sans effets secondaires sur les plaies malodorantes. Ces dispositifs sont d'ailleurs recommandés sur cette indication par la Haute Autorité de Santé [HAS 2007].

Peu de données sont disponibles sur le type de charbon utilisé pour la fabrication de ces pansements, tant dans la littérature qu'après demande d'informations techniques auprès des différents fabricants. Dans un article récent [Kerihuel JC. 2010] Kerihuel explique que les charbons actifs ont une surface spécifique d'adsorption de plus de 5m<sup>2</sup>/g, sans préciser à quel pansement il se réfère précisément.

L'adsorption, est un phénomène de surface par lequel des molécules de gaz ou de liquides se fixent sur les surfaces solides des adsorbants, ou dans la masse par diffusion. La superposition de plusieurs

pansements au charbon augmente la surface spécifique d'adsorption, et donc l'efficacité du produit sur une plaie très malodorante.

#### 4.1. B. Les antimicrobiens

Les antimicrobiens sont présentés comme pouvant réduire les odeurs par leur action bactéricide. Leur efficacité est discutable, particulièrement sur ce type de plaie [Hampton S. 2008] car les bactéries à l'origine d'odeurs ne sont pas forcément sur le lit de la plaie, mais dans l'épaisseur de la masse (ou de la nécrose tumorale), ce qui les rendraient peu sensibles à l'action d'antimicrobiens en surface.

Le terme d'antimicrobiens regroupe les désinfectants, les antibiotiques et les antiseptiques. Les désinfectants ne peuvent être utilisés pour le traitement des plaies puisqu'ils sont destinés à éliminer ou tuer les micro-organismes sur les milieux inertes selon les normes de l'AFNOR (Association Française de NORmalisation).

#### 4.3. B. a. *Les antibiotiques*

Les antibiotiques sont prohibés en application locale car ils exercent une pression de sélection importante, avec un risque d'émergence de bactéries résistantes sur la plaie, d'autant plus si elle est chronique (résistance acquise). Par voie générale, ils ne sont indiqués qu'en cas d'infection avérée, accompagnée de signes généraux d'infection (ex : fièvre).

Exceptionnellement, ils peuvent être utilisés sans être associés à des signes infectieux et même localement dans le but de contrôler l'odeur. Cet usage particulier a été principalement développé pour les patients en fin de vie, notamment par les services de soins palliatifs.

Le metronidazole (Flagyl®, Tiberall®) est l'antibiotique le plus utilisé pour traiter les plaies malodorantes, liées à la présence de bactéries anaérobies. Il est donc le plus documenté sur cette indication toute particulière. D'autres antibiotiques de spectre plus large pourraient être prescrits, mais il semble plus raisonnable en raison du risque de pression de sélection et des effets secondaires, de les réserver au traitement de l'infection (Amoxicilline / acide clavulanique (Augmentin®), Piperacilline / tazobactan (Tazocilline®) et Ticarcilline / acide clavulanique (Claventin®)).

Le metronidazole est un antibiotique actif uniquement sur les bactéries anaérobies. Les publications montrent des résultats globalement positifs sur les odeurs. La prescription fréquente de cet antibiotique

sur les plaies malodorantes reste cependant empirique et sujette à interrogations sur les conséquences d'une utilisation prolongée [Clark J 2002]. En effet, même si elle est difficilement évaluable, la résistance des bactéries au metronidazole semble augmenter de façon constante depuis que le premier cas de *Bacteroides* résistants a été reporté en 1978. En 1998, en Angleterre, la résistance à cet antibiotique a été évaluée à 7,5% sur les *Bacteroides* du groupe *fragilis*, ce qui pourrait expliquer au moins partiellement les échecs parfois observés lors de traitements [Löfmark S. 2010].

Le metronidazole s'avère très bactéricide sur les bacilles Gram - anaérobies et les *Clostridium*, mais il est inactif sur quelques anaérobies Gram + tels que les *Actinomyces* et *Propionibacterium* [Dubreuil L. 2003]. Une étude réalisée *in vitro* démontre que l'administration de metronidazole élimine non seulement les bactéries anaérobies, mais agit aussi indirectement sur les bactéries anaérobies facultatives en perturbant leur régulation par phagocytose [Ingham HR. 1977], ce qui pourrait déséquilibrer l'écosystème bactérien qui colonise naturellement la plaie chronique. Il est donc recommandé de le prescrire sur des périodes courtes (7 à 10 jours).

Sur les plaies tumorales malodorantes, cet antibiotique est couramment prescrit sous différentes formes et voies d'administration, et sur des durées variables de traitement.

Par voie générale : le Flagyl® (voie orale) et le Tiberall® (voie intra veineuse) sont prescrits sur cette indication à des doses variables (chez l'adulte): 600mg/j. [Ashford RFU. 1980], 1g /j, ou 1,5g /j. Il leur est reproché de provoquer d'éventuelles nausées et de contre indiquer la consommation d'alcool pendant la durée du traitement. Une administration prolongée peut exposer les malades à des neuropathies centrales ou périphériques [Dictionnaire Vidal 2012]. Ces effets secondaires, variables d'un individu à l'autre, ne semblent pas toujours acceptables dans le cadre d'une prise en charge palliative.

Par ailleurs, certains cliniciens s'interrogent sur la diffusion et l'efficacité de ce produit lorsque la masse tumorale est épaisse et nécrotique. Mais la masse tumorale a la particularité de pouvoir être nécrotique et vascularisée en même temps, notamment lors de la progression tumorale (angiogénèse), d'où la friabilité des bourgeons et les problèmes hémorragiques. De ce fait, il semble possible que les antibiotiques soient efficaces par voie générale, ce qui est d'ailleurs fréquemment observé.

En application locale : là encore, les pratiques et concentrations de metronidazole sont variables. Les topiques commercialisés contiennent 0,75% de metronidazole et sont disponibles sous forme de gel (MetroGel® Topical Gel), émulsion ou crème (Rosex®). Des préparations ont été réalisées à des concentrations de 0,5% ou 10% [Seaman 2006]

En pratique courante, les formes injectables (réservées à l'usage hospitalier) sont parfois utilisées en administration locale, sans contrôle réel de la dilution. Dans ce cas, la peau péri-lésionnelle est protégée afin d'éviter l'apparition d'irritations cutanées douloureuses.

#### 4.3. B. b. *Les antiseptiques*

Des antiseptiques sont proposés pour traiter l'odeur qu'ils réduiraient par leur action antimicrobienne locale, ce qui suppose : 1) que ces antiseptiques soient actifs sur les bactéries qui génèrent ces odeurs, 2) qu'ils n'aient pas qu'une action transitoire. Notons aussi que les odeurs peuvent être un problème chronique ou récurrent, or, les applications répétées d'antiseptiques sur une longue période peuvent être cytotoxiques et pourraient donc être plus délétères que bénéfiques [Wilson JR. 2005]. Leur utilité sur cette indication est donc discutable et demande à être confirmée par des études cliniques.

L'action des antiseptiques sur les plaies sera détaillée dans « le traitement des plaies infectées localement ».

#### 4.3. C. L'aromathérapie (huiles essentielles)

De 2003 à 2005 en Australie, les odeurs nauséabondes de 13 patients porteurs de plaies tumorales ont été traitées avec succès par aromathérapie [Mercier D 2005]. L'huile essentielle choisie par le patient (ex : lavande, patchouli) était mélangée avec une quantité égale d'huile d'arbre à thé (*Melaleuca alternifolia*) reconnue pour ses propriétés bactéricides (y compris sur *Staphylococcus aureus* Résistant à la Methicilline - SARM), anti virales et anti fongiques [Carson CF. 1998]. Ces huiles étaient diluées de 2,5% à 5% dans une crème émolliente.

Etant donné le peu d'expériences et de travaux publiés, on peut s'interroger sur le risque allergique lié au limonène contenu dans l'huile essentielle de l'arbre à thé et la cytotoxicité (fibroblastes, cellules épithéliales) du *Melaleuca alternifolia* [Mercier D. 2005]. Des reports d'expériences cliniques et empiriques décrivent l'application de ces huiles sur peau saine, sans contact avec les lésions ulcérées. Ces techniques pourraient s'apparenter à une solution désodorisante.

#### 4.3. D. La détersion

Le débridement mécanique de la nécrose est limité sur la plaie tumorale en raison du risque hémorragique. Elle est le plus souvent inefficace (reformation immédiate de la nécrose) en particulier sur les plaies extériorisées [Charitansky H. 2006]

Photos 5 à 8 : évolution d'une plaie tumorale après détersion par hydrochirurgie. Ré-apparition de la nécrose



J-1j.

J0

J1j.

J3j.

#### 4.3. E. Le yaourt

Des alternatives thérapeutiques telles que l'application de yaourt, de beurre ou de sucre glace sont évoquées dans plusieurs publications [Hampson JP. 1996]. L'application de yaourt est la plus documentée. Elle repose sur le fait que les *Lactobacillus* (bactéries à gram positif, anaérobies facultatives) présents dans ces produits laitiers (à forte dose) limitent par compétition la croissance des bactéries anaérobies et de ce fait, agiraient sur les odeurs.

Des infirmières spécialisées telles que Welch préconisent ainsi d'appliquer 3 à 4 fois/jour du yaourt sur les plaies malodorantes après nettoyage, en précisant que cette technique est uniquement basée sur l'observation de cas cliniques [Welch LB 1982]. Schulte propose quant à elle l'application de yaourt pendant 10mn, suivie de l'application de metronidazole, le tout associé à une prescription d'antibiotique par voie générale [Schulte MJ. 1993]

Outre l'absence de preuves scientifiques, on peut s'interroger sur les véritables bénéfices en termes de qualité de vie si les soins doivent être répétés de nombreuses fois dans la journée. De plus, rien ne prouve l'innocuité d'un traitement probiotique chez des patients immunodéprimés.

#### 4.3. F. Le curcuma et la chlorophylle

Ces deux produits sont eux même odorants. Leurs effets sur les plaies malodorantes sont cités mais n'ont pas fait l'objet de publications sur cette indication.

Les traitements locaux à base de chlorophylle ont été développés pendant la 2<sup>ème</sup> guerre mondiale, pour leur propriétés bactériostatiques et cicatrisantes, associées à une absence de toxicité et/ou réaction allergique [Carpenter B. 1949, Chernomorsky S. 1988]. L'application locale de chlorophylle permettrait de réduire les odeurs, visiblement par son action antibactérienne. Par contre, elle décolore le lit de la plaie en vert [Merz T. 2011]. Les produits à base de chlorophylle sont disponibles en gélules (peuvent être ouvertes sur la plaie) ou en crème (ex : Chlorophyll Complex Ointment®).

Le curcuma a quant à lui des propriétés antiseptique, antalgique et anti-inflammatoire. Son utilisation est très répandue dans certaines cultures comme en Inde (peau, alimentation). Son effet sur le processus de cicatrisation est documenté [Heng MC 2011, Recio MC 2012]. Une étude a été réalisée en Inde [Kuttan R, 1987] sur 62 patients porteurs de lésions tumorales (localisations ORL > 50%) avec une efficacité sur les odeurs rapportée dans > 90% des cas.

La variété des traitements anti-odeurs (conventionnels ou alternatifs) souligne la grande difficulté à prendre en charge ce symptôme intimement lié à la présence de bactéries. La gestion de l'odeur reste à ce jour un problème complexe sans solution universelle ou unique.

La mise en place d'un projet translationnel (recherche expérimentale), réunissant les compétences de cliniciens (infirmières, médecins) et de chercheurs académiques, a paru être la solution la plus efficace pour étudier la flore bactérienne et l'incidence des biofilms bactériens sur l'évolution des plaies tumorales du sein et le développement d'odeurs.

## **5. Les objectifs de l'étude**

Les plaies tumorales, l'analyse bactériologique des plaies et la présence de biofilm ont déjà fait l'objet de publications, mais ces sujets ont été traités séparément, de façon binaire (ex : bactéries planctoniques / odeurs), ou réfléchi à partir de biofilms modèles. L'originalité de ce projet est d'aborder cette problématique de manière globale, dynamique et interactive ; À partir de prélèvements de plaies, en tenant compte du contexte clinique du malade (traitement, évolution) et des symptômes locaux de la plaie.

### **5.1 Objectif principal**

Caractériser la flore microbienne, la présence de biofilm et les composés volatils sur les plaies tumorales du sein, sur une période de 42 jours.

### **5.2 Objectifs secondaires**

- Observer s'il existe des interactions entre l'équilibre des flores aérobies et anaérobies
- Caractériser le biofilm (bactéries et matrice polysaccharidique) afin d'étudier la relation entre le biofilm et les bactéries dans le processus infectieux.
- Corréler les résultats des prélèvements (microbiologiques, biofilm, composés volatils bactériens) à l'évolution clinique des plaies et leurs symptômes.
- Etudier les interactions entre l'évolution des plaies et les protocoles de soins mis en place

### **5. 3 Perspectives**

Ce travail devrait permettre de :

- élaborer des hypothèses afin de trouver à terme des solutions nouvelles pour contrôler la flore bactérienne (réduction du risque infectieux) et résoudre le problème des odeurs, en collaboration avec des équipes de recherche.
- améliorer les pratiques de soins
- mettre au point une méthodologie reproductible à d'autres types de plaies (ex : escarres, ulcères, brûlures) sur lesquelles il semble nécessaire de collecter des données, notamment par rapport au biofilm et à son impact sur le processus de cicatrisation.
- déterminer des marqueurs permettant de prévoir (et/ou prévenir) l'évolution des plaies tumorales d'un point de vue infectieux et symptomatique (ex : odeurs, écoulements),

## **6. Problématiques et hypothèses de recherche**

Cette recherche a un caractère exploratoire de par les différentes analyses pratiquées, l'étude des résultats selon l'évolution clinique des plaies, et le choix particulier du type de plaie étudié. Elle s'est articulée autour de trois étapes:

- La réunion des compétences nécessaire à l'élaboration de l'ensemble des analyses (faisabilité, techniques, méthode)
- L'élaboration d'un fichier interactif recensant les données recueillies lors des consultations plaies et cicatrisation (ex : aspect de la plaie, évolution), les soins, et les résultats des différentes analyses des prélèvements (plaie, pansement usager)
- L'analyse de la flore bactérienne (bactéries aérobies et anaérobies pour 25 patients), la recherche et caractérisation de biofilm, ainsi que l'analyse de composés volatils responsables d'odeurs (32 patientes)

Afin de faciliter l'analyse des composés volatils, une enquête de perception sensorielle des odeurs des bactéries les plus fréquemment retrouvées sur les plaies tumorales du sein, a été mise en place en cours d'étude.

Ce type de travail, soutenu par des financements publics (Programme Hospitalier de Recherche Infirmière - PHRI), a aussi pour ambition de faire progresser la qualité des soins de plaies par une démarche scientifique, dans un contexte économique difficile qui impose d'être efficace et d'apporter des niveaux de preuves suffisant pour que les malades puissent être soignés de façon optimum et dans de bonnes conditions (ex : produits pris en charge par l'assurance maladie). Il met aussi en avant l'intérêt de mener des recherches en vue d'améliorer les soins palliatifs et soins de supports.

## **PARTIE 2**

### **MATERIELS ET METHODES**

## 1. Présentation des différents partenaires

Cette recherche translationnelle a été rendue possible grâce à la collaboration (directe ou indirecte) de plusieurs équipes : le laboratoire ERRMECe de l'Université de Cergy-Pontoise, les services de microbiologie, de biostatistique et l'Unité Plaies et Cicatrisation de l'Institut Curie (section médicale), l'équipe de l'UMR 168 de l'Institut Curie (section recherche), et le laboratoire LSABM de l'ESPCI. Elle a été financée par chaque structure, le Département de Transfert de l'Institut Curie et un PHRI (Projet Hospitalier de Recherche Infirmière 2010).

### 1.1. A l'institut Curie

L'Institut Curie est un centre de lutte contre le cancer et un centre de recherche. Différentes équipes ont collaboré à la réalisation de cette étude :

- L'équipe des plaies et cicatrisation (P&C) spécialisée dans le traitement des plaies chroniques ou liées aux traitements anti-cancéreux, composée de 3 infirmières (A. Baffie, A. Rivat, I. Fromantin) et de médecins référents dans chaque discipline. Son activité est centrée autour de trois missions : 1) l'activité clinique (consultation, en transversal), 2) la recherche clinique, 3) l'enseignement du traitement des plaies.
- Le service de microbiologie qui remplit deux missions à l'hôpital: 1) le diagnostic et le traitement des infections, 2) le recueil prospectif ou rétrospectif de données épidémiologiques concernant des infections. Le médecin chef (Dr MC. Escande) a accepté de prendre la responsabilité des prélèvements effectués pour l'étude (investigateur principal) et un temps partiel de technicienne (J. Elard) a été dédié à l'analyse des bactéries.
- Le service de biostatistique qui assure les aspects logistiques des projets de recherche clinique de l'hôpital. Son activité s'exerce dans les domaines de : 1) l'évaluation thérapeutique 2) l'évaluation des méthodes de diagnostic et de suivi thérapeutique 3) l'étude des facteurs pronostiques et prédictifs de la réponse thérapeutique. Il a également pour mission de participer au développement de nouvelles méthodologies adaptées à la cancérologie. Un ingénieur (Y De Rycke) et une attachée d'étude clinique (MC Falcou) ont été chargés du suivi méthodologique de l'étude.
- Un chercheur de l'UMR 168 (V. Semetey) dont l'équipe est engagée dans différents aspects de l'interface entre la chimie des matériaux et la chimie physique, de la recherche fondamentale jusqu'à la recherche appliquée. Son implication dans le projet a été indirecte : échanges, accompagnement lors des premières réunions avec le LSABM, lecture critique du projet.

## **1.2. Le laboratoire ERRMECe**

Le laboratoire Errmece (équipe de recherche sur les relations matrice extracellulaires - cellules) de l'Université de Cergy-Pontoise étudie sous des angles moléculaires, supramoléculaires, cellulaires, mais aussi théoriques et physicochimiques, les interactions entre des cellules et leur environnement. Cette équipe est multidisciplinaire puisqu'elle regroupe des biochimistes, biologistes cellulaires, microbiologistes et physico-chimistes dans le but de réunir les compétences de chacun autour d'un thème unique : les interactions entre protéines et/ou cellules dans le cadre de pathologies. L'unité est composée de 5 Professeurs, 9 Maîtres de Conférence, 1 Ingénieur de recherche, 1 Ingénieur d'Etude, 1 Technicienne, 1 Secrétaire, 6 post docs/ATER et 6 thésards.

Dès sa conception, ce projet a été discuté avec le Pr V. Larreta Garde qui a donné l'impulsion (faisabilité, encadrement) au travail. Le suivi de la recherche a été réalisé par D. Seyer, avec la participation d'un étudiant de Master 2 recherche BioMIC (M. Fall)

## **1.3. Le laboratoire LSABM**

L'ESPCI ParisTech est une grande école d'ingénieurs et un centre de recherche. Le laboratoire de sciences analytiques, bioanalytiques et miniaturisation appartient à l'UMR PECSA 7195 (CNRS - UPMC - ESPCI). Ses recherches sont orientées vers la conception et l'étude de nouvelles stratégies analytiques et bioanalytiques pour répondre aux demandes sociétales (analyses rapides, à faibles coûts, faciles à utiliser sur le terrain, à partir d'échantillons complexes). Les applications s'étendent aux domaines de la Santé, de l'environnement, de la sécurité alimentaire et des personnes. L'unité est composée de 13 chercheurs et enseignants-chercheurs, 12 doctorants, 2 post-doctorants et 5 autres personnes ingénieurs, administratifs et techniques.

Différents échanges avec le Pr MC Hennion et V. Pichon ont été nécessaires pour définir le cadre, les possibilités et les objectifs d'une collaboration. L'étude a été par la suite suivie et réalisée avec J. Dugay, M. Cohen, ainsi que deux étudiants de Master 2 de sciences et technologie (Y. Makaadi, Z. Jemmali).

## **2. Méthodologie**

## 2.1 Population concernée et mise en place de l'étude

Les patients auxquels la participation à l'étude a été proposée évoluaient tous dans un contexte de maladie extrêmement grave, avec un pronostic vital engagé à plus ou moins brève échéance. Etre volontaire dans une étude et subir des prélèvements supplémentaires (même non traumatiques) est un effort de plus à fournir. De ce fait, cette étude n'a pas été proposée à tous les patients répondant aux critères d'inclusions, ont été exclus ceux qui semblaient trop fragiles, anxieux ou épuisés.

### 2.1. A. Critères d'inclusion

Toutes les conditions suivantes devaient être remplies :

- Homme ou femme traité(e) porteur de plaie tumorale > 10cm<sup>2</sup>
- Homme ou femme âgé(e) de 18 ans ou plus.
- Consentement éclairé et écrit du patient.

### 2.1. B. Critères de non inclusion

- Patients ne bénéficiant pas d'un suivi régulier ou étant en impossibilité de se soumettre au suivi médical de l'étude pour des raisons géographiques, sociales ou psychiques.
- Patients en phase agonique
- Critères de sorties prématurées de l'essai
- Souhait exprimé par le patient
- Perdu de vue
- Décès
- Hospitalisation en Unité de Soins Palliatifs

### 2.1. C. Evaluation clinique

Les informations ont été consignées sur un fichier de recueil de données identifiable par le numéro d'étude. Ces observations ont été recueillies lors de consultation Plaies et Cicatrisation à l'Institut Curie (en suivi externe ou lors d'une hospitalisation)

- Type de plaie
  - Cancer primitif ulcéré à la peau ou métastase cutanée.
  - Histologie.
- Site de la plaie
- Evolutivité et ancienneté de la plaie
- Aspect de la plaie et prise de photographie numérique

- Cavitaire, extériorisée, fistulisée, superficielle
- Dimensions avec prise de mesures centimétriques (l X L)
- Quantification de la présence de nécrose, fibrine, bourgeons, épiderme en pourcentage
- Traitement
  - Protocole de soins
  - Traitement médical susceptible d'interagir avec la plaie : antibiothérapie, corticothérapie, chimiothérapie, radiothérapie, thérapeutique ciblée, hormonothérapie, autre
- Symptômes de la plaie: évaluation des symptômes et de l'efficacité des soins locaux
  - Odeurs
  - Ecoulements
  - Saignements (spontanés et provoqués)
  - Douleur avant et pendant le soin (EVS)
- Evaluation des risques et complications
  - Evaluation de risque vital
  - Evaluation du risque infectieux: colonisation / infection, risque d'infection par contigüité, exposition d'organes nobles, traitement provoquant des neutropénies, autres
- En cas de survenue d'une infection
  - Signes locaux : inflammation, majoration des exsudats, majoration de la douleur, majoration des odeurs, écoulement purulent, modification inexplicée du lit de la plaie
  - Signes généraux : fièvre, frissons, asthénie
  - Examens biologiques: NFS - Numération Formule Sanguine, CRP - C-réactive protéine, PCT – Procalcitonine

#### 2.1. D. Outils nécessaires à l'évaluation clinique

- EVS - Echelle Verbale Simple : échelle d'auto-évaluation, sensible, reproductible, fiable et validée ; En 5 items : douleur absente, modérée, moyenne, forte, insoutenable
- Photo numérique : la prise de photo est standardisée : sans flash, perpendiculairement à la plaie, à une distance moyenne de 50cm à 1m
- Evaluation des odeurs en auto-évaluation, en 4 niveaux : absence, faible, modéré, intense
- Critères définissant la colonisation de l'infection :  
Colonisation : présence de germes sur la plaie sans réponse inflammatoire et signes d'infection.  
Infection : multiplication des germes sur la plaie avec présence de signes infectieux, locaux et/ou généraux.
- Examens biologiques, marqueurs de l'infection :

- NFS – Numération Formule Sanguine : recherche d'une hyperleucocytose (> 10 000)
- CRP - C-réactive protéine : recherche d'une augmentation de la CRP (dont la valeur usuelle et physiologique est < 10 mg/l.)
- PCT – Procalcitonine : recherche d'une augmentation de la PCT (existence d'une infection bactérienne probable si > 0,2 ng/ml) [12]

## 2.2. Méthode d'analyse de la flore bactérienne

La recherche des bactéries aérobies, aéro-anaérobies et anaérobies strictes a été faite de façon quantitative sur 25 patients. Par la suite, en raison de problèmes organisationnels (réduction de personnel, changement de locaux), seule l'analyse des bactéries aérobies a été assurée pour les 7 patients suivant, selon les procédures usuelles du laboratoire (résultats qualitatifs) du laboratoire.

Les prélèvements ont été réalisés à la curette à usage unique (de Volkman, 50mm), sur la zone la plus profonde et / ou nécrotique, et acheminés immédiatement au laboratoire. Chaque prélèvement était accompagné des informations nécessaires (site de la plaie, statut infectieux, antibiotique en cours) permettant à la technicienne de travailler avec toutes les informations nécessaires [Fromantin I. 2009]. En cas de saignement consécutif au prélèvement, un pansement hémostatique (alginate) était mis en place pendant 24h. En cas de douleur (exprimée ou pressentie) de l'Emla® pouvait être appliqué 45mn avant le prélèvement, ou du MEOPA (Kalinox®) était proposé au patient lors du geste (avec accord médical).

A l'arrivée au laboratoire le contenu de la curette calibrée à usage unique a été mis immédiatement en bouillon BHI, puis dilué au 1/10 et/ou 1/100 en BHI en fonction du contexte clinique. Puis ensemencement d'1µl de chaque bouillon sur différents milieux gélosés :

- 1 gélose Chocolat incubée sous CO<sub>2</sub>
- 2 géloses Columbia ANC : 1 incubée en anaérobiose et 1 sous CO<sub>2</sub>
- 1 gélose Drigalski incubée en aérobiose
- 1 gélose CPS incubée en aérobiose
- 1 gélose Chapman incubée en aérobiose
- 1 gélose Pseudomonas incubée en aérobiose
- 1 gélose SAID incubée en aérobiose
- 1 tube Sabouraud Genta Chloramphenicol
- 1 gélose Schaedler incubée en anaérobiose

- 1 gélose Shaedler NeoVanco incubée en anaérobiose

Les géloses ont été mises à incuber de 1 à 5 jours à 37°C. Toutes les boîtes ont été analysées et toutes les bactéries ont été identifiées et énumérées : flore aérobie, anaérobie stricte et aéro anaérobie. L'ensemencement sur des milieux sélectifs dès le premier jour a permis d'orienter l'identification des bactéries. Cette identification a été affinée avec des galeries d'identification et en utilisant les caractères biochimiques des bactéries. Les dilutions en BHI au 1/10<sup>ème</sup> et 1/100<sup>ème</sup> ont permis de repérer davantage de colonies différentes et d'effectuer des numérations jusqu'à 10<sup>7</sup> en prenant en compte qu'1 colonie représente 10<sup>3</sup> cfu/ml, 10 colonies 10<sup>4</sup> cfu/ml, 100 colonies 10<sup>5</sup>cfu/ml (...).

### **2.3. Méthode de détection des biofilms**

Les prélèvements ( $Vol = 2/3\pi \times 8mm \times 5mm \times 2mm = 167mm^3$ ) étaient réalisés dans le même temps et les mêmes conditions que les prélèvements microbiologiques. Dès les premiers échantillons, les marquages se sont avérés être une étape délicate en raison d'une consistance variée des prélèvements, parfois épais et / ou dur (nécrose tumorale). Il a donc été nécessaire d'adapter les techniques de marquage afin que les échantillons puissent être exploités. Ainsi, certains prélèvements ont été gardés presque une semaine en chambre humide, à température ambiante, dans le but de les ramollir entre les étapes de fixation et de marquage. Dans la grande majorité des cas, il a été nécessaire de les découper, à l'aide de pinces et lames de bistouris, afin qu'ils puissent être correctement disposés entre les lames, sans sécher.

Ces adaptations ont permis d'éviter d'avoir recours à un microtome, ce qui aurait encore alourdi la procédure de traitement des échantillons, assurée en même temps que l'activité clinique hospitalière.

Après prélèvement chez le patient, les échantillons étaient fixés avec du paraformaldéhyde 4% (PFA). Après fixation, les échantillons étaient rincés deux fois à l'eau distillée stérile, incubés 20 minutes à température ambiante dans l'obscurité en présence d'une solution contenant un couple de lectines couplées à des fluorophores (100 µg/mL en eau stérile pour chaque lectine). Une lectine couplée avec du Tetramethyl Rhodamine Iso Thio Cyanate (TRITC) était mélangée avec une lectine couplée avec de l'Isothiocyanate de Fluoresceine (FITC) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France et CliniSciences, Nanterre, France). Les lectines permettent de reconnaître des motifs saccharidiques particuliers et différents couples de lectines ont été testés afin d'optimiser la visualisation de la présence d'une matrice extracellulaire produite par les bactéries.

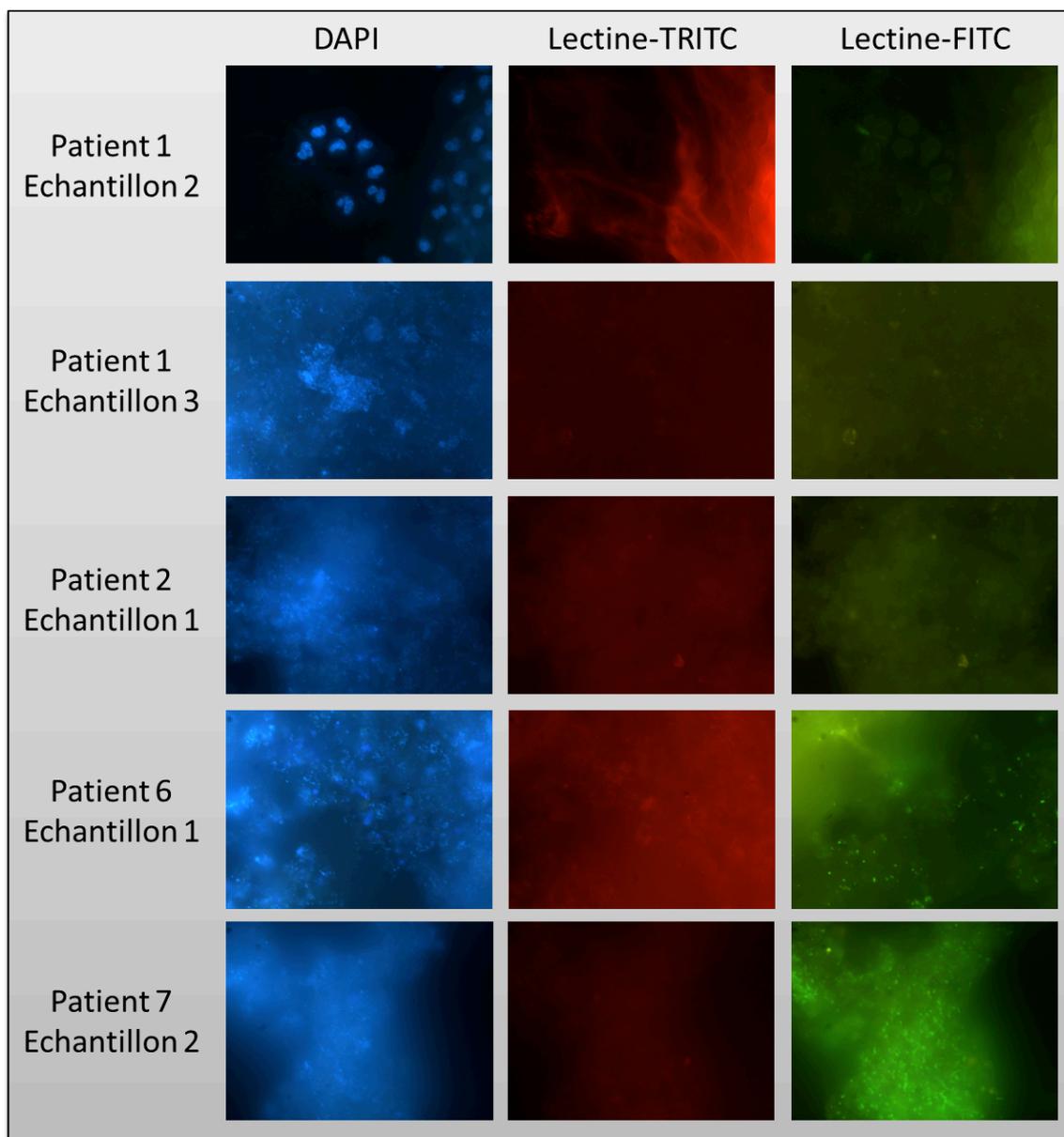
Description des différentes lectines utilisées et leurs motifs saccharidiques spécifiquement reconnus :

Lectines	Fluorophore conjugué	Motifs marqués
<i>Arachis hypogaea</i> (AH)	TRITC (Rouge)	N-acetyl- $\beta$ -galactosamines ( $\beta$ -gal(1- $\rightarrow$ 3)galNAc)
<i>Triticum vulgare</i> (TV)	FITC (Vert)	N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamines ((glcNAc) <sub>2</sub> )
<i>Bandeiraea simplicifolia</i> (BS)	TRITC (Rouge)	$\beta$ -galactoses et N-acetyl- $\beta$ -galactosamines ( $\beta$ -gal et $\beta$ -galNAc)
<i>Concanavalline A</i> (CA)	FITC (Vert)	$\alpha$ -D-mannoses et $\alpha$ -D-glucoses ( $\alpha$ -D-man et $\alpha$ -D-glc)
<i>Ulex europaeus</i> (UE)	TRITC (Rouge)	$\beta$ -L-fucose ( $\beta$ -L-fuc)
<i>Lycopersicon esculentum</i> (LE)	FITC (Vert)	N-acetyl-glucosamines ((glcNAc) <sub>3</sub> )

Les échantillons étaient ensuite lavés à deux reprises avec de l'eau distillée stérile et incubés 20 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière dans une solution de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) à une concentration de 1  $\mu$ g/ml. Les échantillons étaient de nouveau rincés deux fois à l'eau distillée stérile et fixés entre lames et lamelles avec du Mowiol (Calbiochem, Meudon, France). Après une nuit de séchage à température ambiante, les montages étaient ensuite conservés à l'obscurité à 4°C.

Les échantillons étaient par la suite regroupés et acheminés vers le laboratoire ERRMECe (Cergy Pontoise) pour l'analyse des biofilms :

Les échantillons ainsi marqués étaient ensuite observés au microscope à épifluorescence (modèle DMLB, Leica, Nanterre, France) qui est équipé d'une lampe à arc pour la fluorescence. Des filtres d'excitation permettent de choisir la longueur d'onde incidente et des filtres d'émission (ou d'arrêt) permettent de sélectionner les radiations émises par l'objet excité. Un microscope équipé en épifluorescence est pourvu de plusieurs jeux de filtres correspondant aux fluorochromes TRITC et FITC couplés aux lectines et au DAPI qui émettent respectivement dans le rouge, le vert et le bleu (FITC : longueur d'onde d'excitation 494 nm longueur d'onde d'émission 520 nm, DAPI : longueur d'onde d'excitation 364 nm (complexé à l'ADN) longueur d'onde d'émission 454 nm (complexé à l'ADN), TRIC : longueur d'onde d'excitation 550 nm longueur d'onde d'émission 570 nm).



**Observation d'un prélèvement de plaie tumorale après marquage fluorescent.** Tous les échantillons sont marqués avec du DAPI, les échantillons des patients 1 et 2 avec les lectines *Arachis hypogaea*-TRITC (reconnaissant le motif  $\beta$ -gal(1 $\rightarrow$ 3)galNAc et fluorescence rouge), et *Triticum vulgaris*-FITC, (reconnaissant les motifs (glcNAc)<sub>2</sub> et fluorescence verte) et les échantillons des patients 6 et 7 avec les lectines *Ulex europaeus*-TRITC (reconnaissant le motif  $\beta$ -L-fucose et fluorescence rouge) et *Lycopersicon esculentum*-FITC (reconnaissant le motif (glcNAc)<sub>3</sub> et fluorescence verte). Les observations sont faites au microscope à épifluorescence (Grossissement \*1000).

## 2.4. Méthode d'analyse des composés volatils

L'identification des composés volatils a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (Agilent 7890A) avec une double détection : détecteur à ionisation de flamme (Agilent 6890FID) et spectromètre de masse (Agilent 5975C inert XL MSD), avec un passeur d'échantillon (Gerstel MPS - MultiPurpose

Sampler) disposant de 3 modes d'injection : injection liquide, espace de tête (HS) et microextraction en phase solide (SPME).

*Chromatographe en phase gazeuse à double détection*



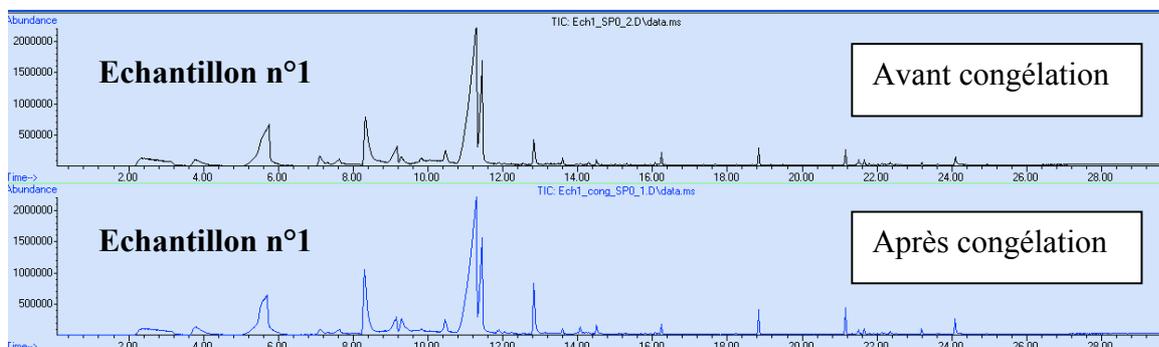
Le logiciel de retraitement des chromatogrammes expérimentaux de ce type est associé à une banque de données (bibliothèque de spectres de masse obtenus en chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse (GC-MS) du National Institute of standards and technology (NIST)), qui permet de proposer une identifications des pics par comparaison des spectres de la bibliothèque à ceux observés.

Un travail initial a été effectué par le laboratoire LSABM afin d'étudier l'influence du rapport de split (injection avec division) au niveau de l'injecteur GC et l'influence de la nature de la fibre. Pour ce faire, des tests ont été réalisés sur un mélange de six alcools possédant des volatilités variables, en faisant varier le split. Ainsi, pour l'étude, il a été décidé de travailler systématiquement, pour chaque échantillon, une fois en splitless et une fois en split de 5 de façon à recueillir une information correcte tant sur les composés les plus volatils que sur les moins volatils.

Une série de tests sur des pansements stériles et usagés a été également réalisée afin de définir et d'optimiser les paramètres d'extraction (ex : type de fibre, temps et mode d'extraction) et les paramètres chromatographiques (ex : mode d'injection, température). Deux types de fibres ont été choisis et utilisés pour chaque échantillon : une fibre Carboxen-PDMS (CAR-PDMS, épaisseur 75 $\mu$ g) permettant l'extraction d'analytes non polaires et polaires, et une fibre de polyacrylate (PA, épaisseur 85 $\mu$ g) qui favorise l'extraction des composés polaires.

L'étude préalable des conditions réelles a tenu compte des impératifs techniques de chacun (cliniciens, chercheurs) et notamment du conditionnement des échantillons et d'un stockage à -80°, en s'assurant qu'aucune de ces étapes n'altérerait la qualité des résultats (Figure 3).

Figure 3 : Comparaison d'un échantillon de pansement usagé avant et après passage au congélateur en mode splitless



Les échantillons de pansements primaires usagés étaient initialement conservés dans des sachets hermétiques. Pour des raisons pratiques (sécuritaire, facilité d'extraction) ces échantillons ont finalement été directement déposés dans des flacons hermétiques SPME (Solid Phase Micro Extraction) stockés à -80°. Ils n'étaient sortis du congélateur que 2h avant leur analyse.

Photo 11: Conditionnement de pansements usagés dans des flacons de SPME



Protocole – conditions d'analyse

<b>Injecteur</b>	Mode d'injection	Splitless ou Split de 5
	Température	240°C
<b>Colonne</b>	Type	DB5-MS
	Dimension (longueur x diamètre x épaisseur de film)	30m x 0,25mm x 1µm

	Débit	1mL/min
<b>Programmation four</b>		40°C pendant 3 min
	Température	10°C/min jusqu'à 280°C
		280°C pendant 3 min
<b>Détecteur FID</b>	Température	300°C
<b>Détecteur de masse</b>	Température source	230°C
	Température quadripôle	150°C
	Température ligne de transfert	250°C
	Scan	30 à 300 uma
<b>SPME</b>	Mode d'extraction	Espace de tête
	Nature de la fibre	CAR-PDMS ou PA
	Température incubation - extraction	50°C
	Durée d'incubation	10mn
	Durée d'extraction	30mn
	Durée de désorption	10mn

#### Flacon échantillon de 20mL

Etant donné le grand nombre de composés susceptibles d'être identifiés par cette technique et le peu de références bibliographiques, il a été décidé : 1) de compléter ces analyses par une enquête de perception sensorielle des bactéries malodorantes des patients inclus dans l'étude, 2) d'analyser les composés volatils des trois bactéries identifiées isolément comme responsables d'odeurs dans l'étude (*P. mirabilis*, *P. magnus*, *C. striatum*), des bactéries retrouvées fréquemment et identifiée comme particulièrement malodorante lors de l'enquête de perception (*F. necrophorum*, *S. lugdunensis*), ainsi qu'une association de deux (*P. mirabilis* et *F. necrophorum*) et quatre bactéries afin de reproduire une flore mixte, 3) de comparer les composés émis par une même bactérie, mais sur des souches différentes (3 souches de *P. mirabilis*). Pour ce faire, les bactéries ont été mises en culture dans des bouillons (BHI, BTS).

### **3. Modalités de recueil et d'analyse des données recueillies**

#### **3.1. Recueil des consentements et des données**

Etant donné le caractère exploratoire de la recherche et le peu de références sur la population concernée, il était difficile de prévoir à priori le nombre de sujets. Etant donnée la fréquence estimée d'apparition des plaies tumorales du sein (2 à 5% des cancers métastatiques), le recrutement de l'Unité P&C à l'Institut Curie et les résultats d'une étude pilote menée en 2007-08, le recueil des données de 40 patients porteurs de plaies avait été initialement retenu. L'étude pilote avait par ailleurs démontré qu'une période d'évaluation trop longue risquait de compromettre l'étude par un nombre trop important de sorties prématurées de l'essai. De ce fait, la durée des évaluations a été fixée à 42 jours (J0, J21 et J42) afin de respecter au mieux le rythme des cycles de chimiothérapie dont bénéficient la plupart de ces patients, sur une période raisonnable compte tenu du contexte. Malgré ces précautions, seuls 33 patients /40 ont pu être inclus sur la période fixée (2 ans).

Une fois le patient déclaré éligible, il était informé des conditions de cet essai (Annexe 3: lettre d'information) et signait un consentement éclairé écrit, avec un délai de réflexion de 48h. Un numéro d'étude lui était alors attribué. L'ensemble des données et résultats (cliniques, microbiologiques, de caractérisation du biofilm) était réuni et consigné dans un fichier unique (Annexe 4: CRF biofilm), saisi et analysé avec l'aide du service de biostatistique de l'Institut Curie.

Les composés volatils n'ont pas pu être traités dans le même temps, tel que prévu initialement. Les analyses ont été en effet différées pour des raisons: 1) liées à l'étude: période test plus longue que prévue afin de définir les paramètres optimaux pour l'analyse d'un maximum de COV (composé organique volatil), 2) inhérente à l'organisation du laboratoire procédant aux analyses: disponibilité des appareils et accueil d'étudiants.

Cette étude a bien sûr été conduite en respect de l'éthique et des lois en vigueur. Le protocole a donc été soumis et accepté par le Comité de la Protection des Personnes (CPP Ile de France III) qui a rendu un avis favorable, ainsi qu'à l'AFSSAPS qui a également donné son autorisation.

### **3.2 Analyse statistique**

Pour l'analyse des données cliniques, microbiologiques et du biofilm, les variables qualitatives ont été décrites en pourcentage et les variables quantitatives en moyenne, écart-type, gamme, médiane et IQR (interquartile range). La distribution des variables quantitatives a été étudiée.

#### **3.2. A. Analyse univariée**

Le croisement des variables a été réalisé avec différents tests statistiques : un Khi2, une analyse de variance ou un coefficient de Pearson selon le type des variables à croiser. Une version non-paramétrique de ces tests a été utilisée dès que nécessaire: Fisher, Kruskal-Wallis et coefficient de Spearman. Les tests ont été fait en bilatéral à 5%.

Les variables cliniques de la plaie ont été croisées avec les résultats microbiologiques et le biofilm (présence ou non). Les bactéries ont été considérées par type de germes, présence (oui/non), ou groupes (ex :  $\leq 10^5$  et  $> 10^5$ ).

Etant donné le faible nombre de sujets pour un nombre important d'informations cliniques et microbiologiques, les résultats doivent être interprétés avec précaution en raison du risque de faux positif.

### 3.2 B. Analyse des résultats des composés volatils

L'identification des composés volatils a été faite de façon groupée et décalée par rapport au reste de l'étude. Au vu des résultats, il a semblé plus pertinent de :

- se limiter dans un premier temps à un descriptif, en explorant quelques hypothèses (ex : COV / intensité d'odeurs)
- réunir dans un deuxième temps l'ensemble des partenaires de cette étude pour réfléchir à une analyse plus ambitieuse, étudiant non seulement les relations entre les COV, l'odeur et les différentes bactéries, mais aussi leur éventuel impact sur le biofilm, puisqu'il semble qu'un lien ait été établi dans la littérature [Ryan R. 2008, Kai M. 2009]

## **4. Enquête de perception sensorielle**

L'enquête a été réalisée sur une seule journée. Afin de garantir la sécurité des volontaires participant à l'enquête, ce travail avait été présenté au CLIN (Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales) et un avis avait été demandé au laboratoire 3M, spécialisé entre autres dans les matériaux de sécurité et protection (ex : masque)

### **4.1 Objectifs**

- Identifier les bactéries perçues comme les plus malodorantes
- Qualifier les odeurs
- Evaluer la typicité de ces odeurs par rapport aux plaies (groupe soignant uniquement)

## 4.2 Méthode

### 4.2 A. Participants

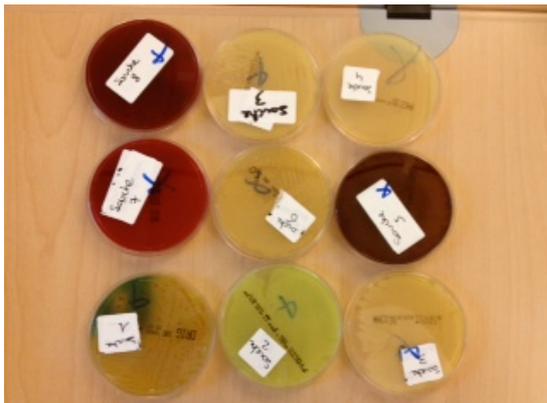
Un appel à volontaires a été effectué (mailing) auprès des soignants et médecins de l'Institut Curie. L'objectif était d'obtenir la participation de  $\geq 25$  personnes, ne présentant pas de problèmes olfactifs majeurs (ex : rhinite aigüe ou chronique, obstruction des voies respiratoires). Les 33 volontaires qui se sont proposés ont été répartis sur 6 groupes, dans la même journée (1h30 / groupe), en tenant compte des impératifs professionnels de chacun.

### 4.2 B. Déroulement de l'enquête

Les techniciennes du laboratoire de microbiologie ont sélectionné et mis en culture 8 bactéries considérées comme les plus odorantes (aérobies ou anaérobies) à partir de souches de prélèvements de plaies des patients inclus dans l'étude (Photo 12).

Les cultures ont été disposées dans des inhalateurs achetés pour l'enquête, et les gélules rehaussées afin que l'odeur soit davantage perceptible (Photo 13). Les orifices des inhalateurs ont été occlus avec du film afin que l'odeur ne s'échappe pas. Les cultures de bactéries anaérobies ont été renouvelées pendant la journée.

*Photos 12 et 13 : cultures des 8 bactéries sélectionnées pour l'enquête – préparation des inhalateurs*



L'unité P&C a assuré l'accueil des groupes, puis une présence permanente afin d'expliquer le déroulement du test, répondre aux éventuelles questions et s'assurer du remplissage des questionnaires anonymes. Les participants ont été prévenus du caractère désagréable des odeurs des

bactéries testées afin d'éviter un effet de surprise ou de retenue, et maintenir ainsi une inhalation constante. Les échantillons ont été présentés dans des ordres différents à chaque groupe.

Un questionnaire anonyme a été remis à chaque volontaire, contenant :

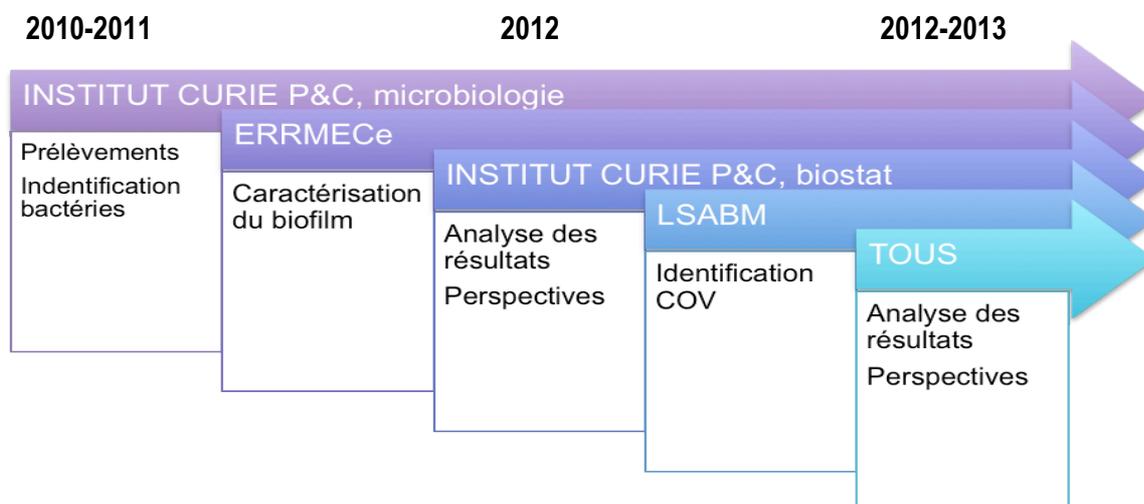
- des informations générales : âge, sexe, fonction, consommation de tabac.
- L'évaluation de l'intensité de l'odeur (en 7 niveaux)
- L'évaluation qualitative par :
  - Le choix d'adjectifs représentant l'odeur sur une liste indicative (cadavérique, putride, urineuse, excrémentielle, végétale, pestilentielle - réponse multiple possible)
  - Une description libre de l'évocation de chaque odeur par les volontaires (adjectifs). Afin de préciser la pensée des participants, il sera proposé d'expliciter l'adjectif choisi par un exemple.
  - L'évaluation de la typicité, qui consiste à demander aux volontaires si l'odeur leur semble typique d'une odeur de plaie tumorale nécrotique.

#### 4.2. C Analyse statistique

Dans ce type d'étude, le nombre de participants n'est pas fondé sur la puissance (car pas de données précises à quantifier). Le choix du nombre de volontaires s'est donc basé sur le nombre minimum requis dans les études du même type, à savoir 20 à 25 personnes.

L'analyse statistique a été réalisée avec l'aide du Pr C. Dacremont, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, CNRS – INRA- Université de Bourgogne – AgroSup Dijon.

### 5. Schéma des participations à l'étude



## **PARTIE 3**

# **ANALYSE DES RESULTATS**

## **1. Descriptif de la population, des plaies, des symptômes et des soins**

### **1.1 Descriptif de la population**

Trente deux patientes, toutes des femmes, ont été incluses dans cette étude, de mai 2010 à janvier 2011, d'un âge moyen de 60 ans [range : 30 - 96]. Toutes étaient atteintes d'un cancer du sein, principalement des carcinomes canaux infiltrants. Neuf d'entre elles (28 %) étaient porteuses de plaies tumorales primitives négligées, et 23 (72%) de métastases cutanées. La moyenne de l'ancienneté des plaies était de 13 mois à l'inclusion [range : 1 – 64]. Les lésions tumorales étaient situées sur le thorax à 96% et au niveau axillaire chez une seule patiente, soit 4%.

L'évolution locale de la plaie, définie comme une progression possible vers la cicatrisation le jour de l'inclusion, a été estimée par le clinicien comme défavorable chez 81% des patientes et favorable chez 19%. Cette estimation était basée sur la réponse du patient aux traitements anti-cancéreux à la lecture du dossier médical. Cette estimation initiale est globalement exacte puisque 13% des patientes n'ont pu être prélevées trois fois en raison d'une épithélialisation partielle ou totale, et d'autres se sont améliorées après la fin de l'évaluation.

Le jour de l'inclusion, 60% des patientes étaient en cours de chimiothérapie par voie générale, 9% sous hormonothérapie et 31% des patientes ne recevaient aucun traitement anti-cancéreux mais uniquement un traitement palliatif. Une seule malade bénéficiait d'un traitement local de chimiothérapie par Miltex® (3%), et 2 d'une radiothérapie ciblée sur leur plaie (6%). Rappelons qu'une radiothérapie peut être réalisée sur une plaie tumorale dans le but de la traiter, ou à visée symptomatique afin de réduire le volume des exsudats et provoquer une hémostase.

Cinq patientes (16%) bénéficiaient d'une corticothérapie et six patientes (19%) étaient traitées par antibiotique soit pour une infection autre que liée à la plaie, soit pour en diminuer l'odeur:

- Amoxicilline et acide clavulanique - Augmentin® (2 patientes)
- Pristinamycine – Pyostacine® (1 patiente)
- Ciprofloxacine – Ciflox® (1 patiente)
- Amoxicilline – ClamoxyI® (1 patiente)

## 1.2. Nombre d'évaluations réalisées

56% (18) des patientes ont collaboré à 3 évaluations successives à 21 jours d'intervalle comme prévu par le protocole, 31% (10) ont eu 2 évaluations et 13% (4) n'en ont eu qu'une seule.

Parmi les patientes sorties de l'étude, 3 patientes sont décédées (9%), une a été transférée en Unité de Soins Palliatifs (3%), et 4 ne se sont pas rendu à un des rendez-vous pour des raisons psycho-sociales (12%). De plus, 4 plaies se sont améliorées avec une épithélialisation partielle (13%), ce qui n'a pas permis de réaliser les prélèvements qui auraient été traumatiques et délétères à la poursuite de l'évolution de la plaie.

Le contexte particulier de la prise en charge de ces patientes traitées en oncologie, en situation palliative pour la plupart, a rendu les évaluations au cours de suivi difficiles. L'étude se base donc sur 78 évaluations (clinique, photographique) avec caractérisation du biofilm et analyse de bactéries aérobies et aéro-anaérobies. Les bactéries anaérobies strictes ont également été recherchées chez les 25 premières patientes (soit 61 évaluations).

## 1.3 Descriptif des plaies

### 1.3. A. Le jour de l'inclusion (J0)

Les plaies ont été mesurées de façon centimétrique, en prenant en compte leurs plus grandes longueurs et largeurs, perpendiculairement. La longueur moyenne des plaies était de 12 cm [range : 2 ; 35 cm] et la largeur moyenne était de 8 cm [range : 2 ; 26 cm]. Toutes les plaies avaient une surface  $\geq$  à 10 cm<sup>2</sup> conformément aux critères d'inclusions.

L'aspect des plaies tumorales peut différer d'une plaie à l'autre (Photos 13, 14, 15), ou sur une même plaie en différentes zones (aspect mixte). Dans cette étude, 32% des plaies étaient cavitaires, 40% extériorisées et 56% superficielles. Aucune présence de fistule n'a été observée.

Exemples :



Photo 13 : patiente 7 - plaie cavitaire, Photo 14 : patiente 20 - plaie extériorisée, Photo 15 : patiente 10 - plaie superficielle

L'aspect du lit de la plaie a été évalué avec une échelle colorielle en 4 couleurs. Ce type d'échelle est fréquemment utilisé pour évaluer l'aspect des plaies chroniques, chaque couleur représentant la nécrose, la fibrine, le tissu de bourgeonnement ou l'épiderme récemment constitué sur la plaie (Photos 16):

- Noire : nécrose sèche
- Jaune : dépôts de fibrine ou nécrose molle et tumorale
- Rouge : bourgeonnement, le plus souvent anormal (excessif, friable) puisqu'également tumoral
- Rose : épiderme récemment constitué

Exemple d'évaluation colorielle, photo 16 - patiente 17 :



- 80% rouge (bourgeons tumoraux)
- 15% jaune (nécrose et fibrine jaune)
- 5% noir (nécrose)

Il est difficile de présenter synthétiquement les résultats de l'échelle colorielle. Nous avons donc choisi de présenter les valeurs les plus intéressantes et pertinentes :

- 75% des plaies n'avaient pas de noir
- 50% des plaies avaient  $\geq 40\%$  de jaune et de rouge
- 94% des plaies n'avaient pas de rose

La peau péri-lésionnelle était inflammatoire dans 52% des cas, ce qui est très représentatif de ce type de plaie ; l'inflammation étant liée à la masse sous jacente. Cette inflammation ne doit pas être confondue avec un signe infectieux, même s'il est parfois difficile de les différencier. Un eczéma de

contact a été observé dans 12% des cas et des irritations dans 4%. 32% patients avaient une peau péri lésionnelle saine.

### 1.3 B. Evolution à J0 et J42

La surface des plaies est globalement stable, avec une longueur moyenne de 12cm à J42, et une largeur de 9cm. Par contre, on peut noter une évolution générale vers un aspect cavitaire (Tableau 10).

Tableau 10 : évolution de l'aspect des plaies sur la durée d'observation, de J0 à J42. Une plaie peut être à la fois cavitaire et extériorisée (sur des zones différentes).

	<b>cavitaire</b>	<b>superficielle</b>	<b>extériorisée</b>
<b>J0</b>	<b>34% (11)</b>	50% (16)	41% (13)
<b>J21</b>	<b>54% (14)</b>	46% (12)	34% (9)
<b>J42</b>	<b>65% (13)</b>	35% (7)	25% (5)

La répartition colorielle est relativement stable avec une constante prédominance du jaune (fibrine et nécrose tumorale) et du rouge (bourgeons tumoraux) (Tableau 11).

Tableau 11 : résultats les plus représentatifs de l'échelle colorielle :

% de plaie avec absence de noir et rose, et % de plaie dont  $\geq 40\%$  de la surface est jaune ou rouge

	<b>Noir = 0</b>	<b>Rose = 0</b>	<b>Rouge <math>\geq 40\%</math></b>	<b>Jaune <math>\geq 40\%</math></b>
<b>J0</b>	75% (24)	94% (30)	50% (16)	50% (16)
<b>J21</b>	65% (17)	92% (24)	62% (17)	35% (11)
<b>J42</b>	65% (13)	85% (17)	40% (9)	55% (14)

### 1.4 Descriptif des symptômes de la plaie

Les symptômes de la plaie (exsudats, odeurs, saignements provoqués et spontanés) ont été appréciés en quatre classes (absent, faible, modéré et intense) par l'évaluateur et les patients.

Le contrôle de chaque symptôme par les soins locaux a été apprécié en 3 classes (contrôlé, partiellement contrôlé, non contrôlé). Le terme de « contrôle des symptômes » ne signifie pas que le symptôme a été traité et éliminé, mais que l'inconfort qu'il entraînait a été pallié par les pansements,

soins ou traitements. Même si l'objectif de ce travail n'est pas d'évaluer l'efficacité des dispositifs médicaux, il semblait intéressant de faire apparaître leurs bénéfices et leurs limites. En effet, à plus long terme, une des perspectives de cette étude est la mise en place de travaux de recherche et développement de dispositifs médicaux spécifiquement indiqués pour les plaies tumorales.

#### 1.4. A. Exsudat

Les écoulements, d'intensité modérée pour la plupart (Tableau 12), ont pu être contrôlés par l'application de pansements absorbants type alginate, fibres de CMC, hydrocellulaires ou compresses hyper absorbantes (Tableau 12 bis).

Tableau 12 : intensité des écoulements (absence, faible, modéré, intense) à J0, J21, J42

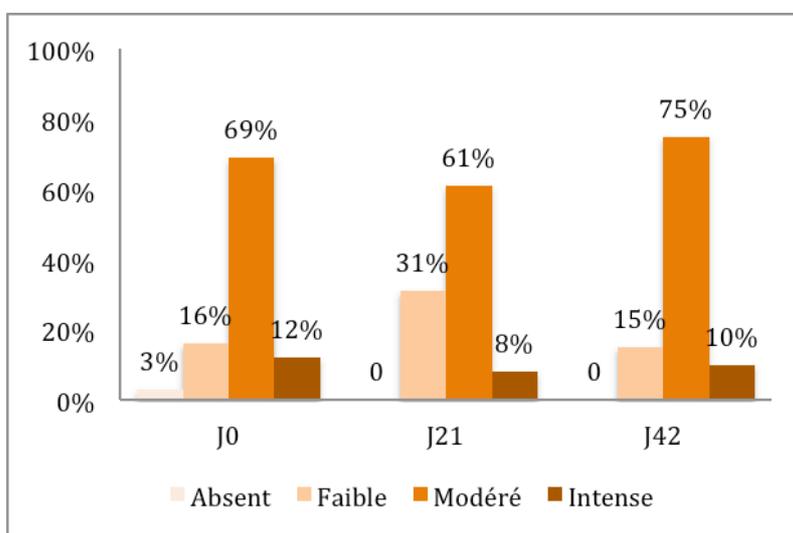
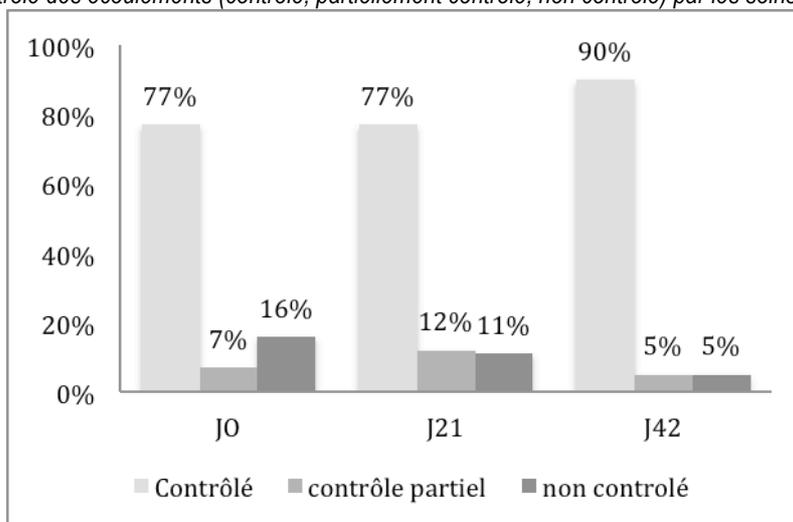


Tableau 12 bis : contrôle des écoulements (contrôlé, partiellement contrôlé, non contrôlé) par les soins locaux à J0, J21, J42



## 1.4. B Odeurs

A J0, aucune odeur considérée comme intense n'a été relevée (Tableau 13). Pour autant, dans 25% des cas, les odeurs n'étaient pas complètement contrôlées par les soins locaux (pansement au charbon actif), ce qui souligne que l'odeur même d'intensité faible ou modérée peut-être difficile à traiter (Tableau 13 bis). A J21, les odeurs intenses ont été traitées avec des antibiotiques (métronidazole) par voix générale.

Tableau 13 : intensité des odeurs (absente, faible, modérée, intense) à J0, J21, J42

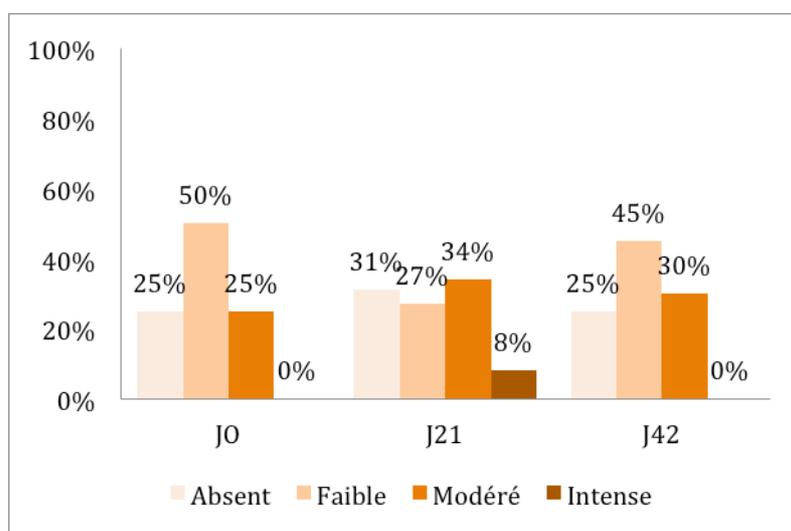
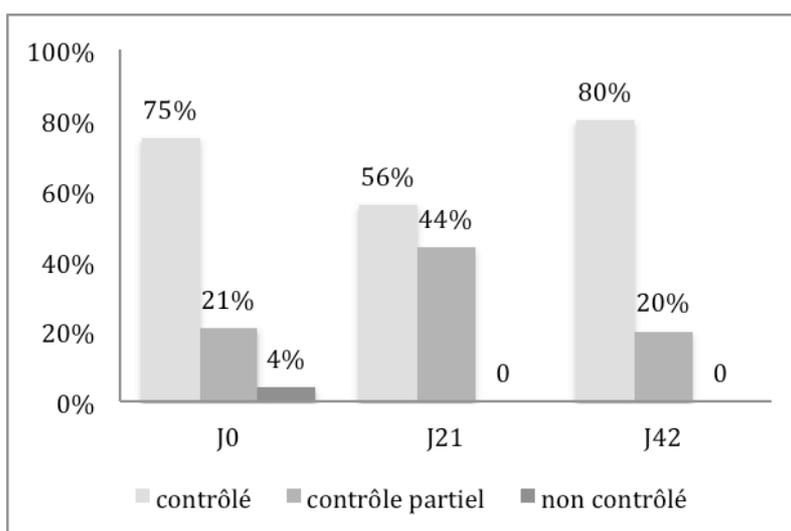


Tableau 13 bis : contrôle de l'odeur (contrôlée, partiellement contrôlée, non contrôlée) par les soins ou traitements à J0, J21, J42



### 1.4 C. Saignements spontanés

Les saignements ont été considérés comme « spontanés » quand ils apparaissaient entre deux soins, avec le pansement en place (Tableau 14). S'ils étaient présents, ces saignements ont été contrôlés par les soins locaux (alginate, pansements hémostatiques, adrénaline locale) (Tableau 14 bis)

Tableau 14 : intensité des saignements spontanés (absence, faible, modéré, intense) à J0, J21, J42

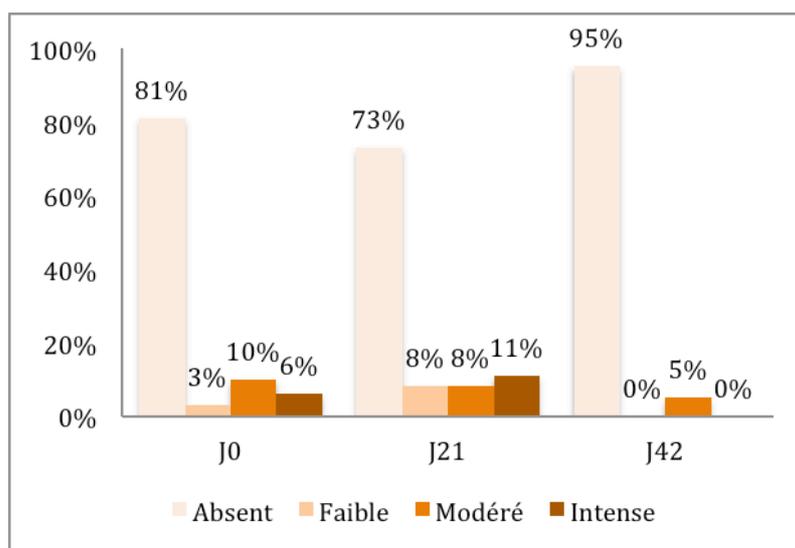
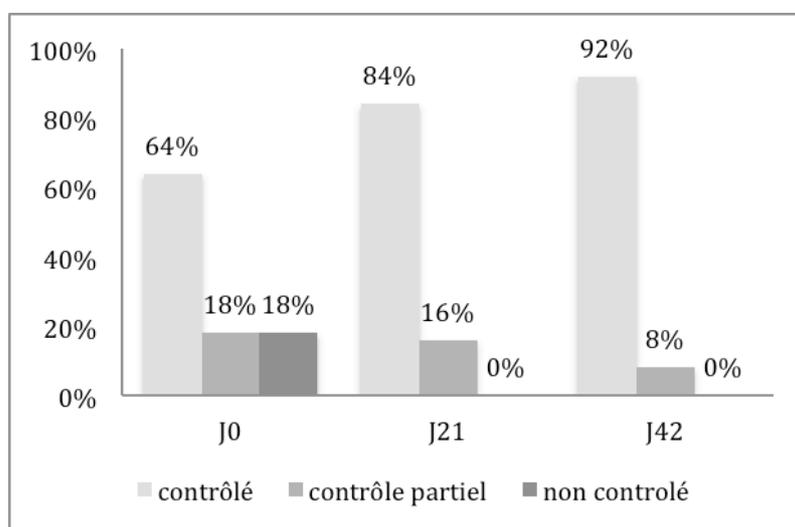


Tableau 14 bis: contrôle des saignements spontanés (contrôlés, partiellement contrôlés, non contrôlés) par les soins locaux à J0, J21, J42



### 1.4. D Saignements provoqués par les soins

Ils sont liés au caractère friable des bourgeons spécifique de ce type de plaie, et à l'angiogenèse importante du processus tumoral évolutif (Tableau 15). Ces saignements ont été globalement contrôlés

par l'application de pansement primaire non adhérent, type interface ou pansement siliconé (Tableau 15 bis).

Tableau 15 : intensité des saignements provoqués (absence, faible, modéré, intense) à J0, J21, J42

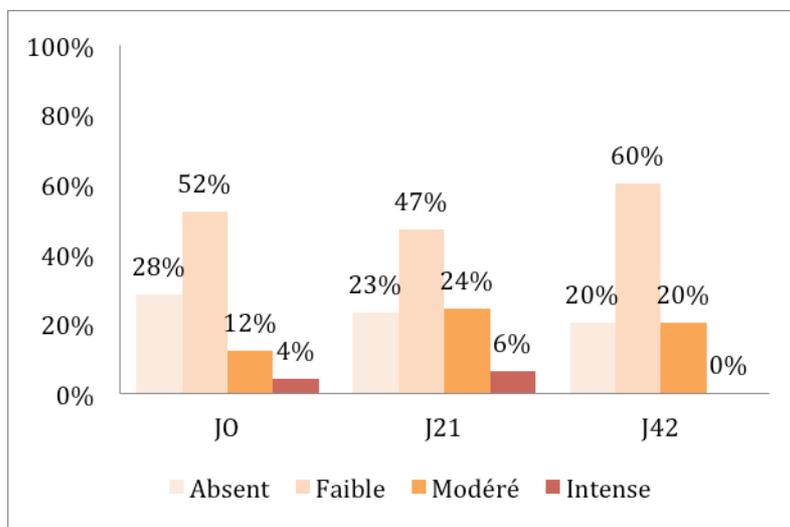
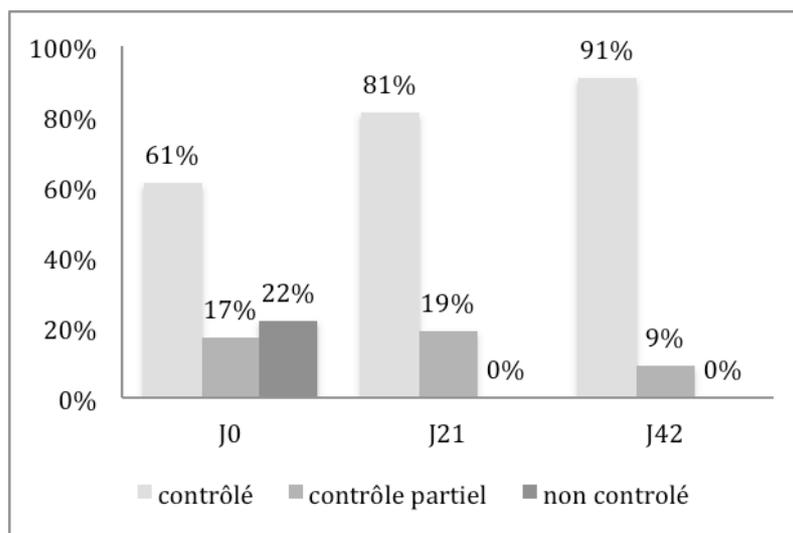


Tableau 15 bis : contrôle des saignements provoqués (contrôlés, partiellement contrôlés, non contrôlés) par les soins locaux à J0, J21, J42

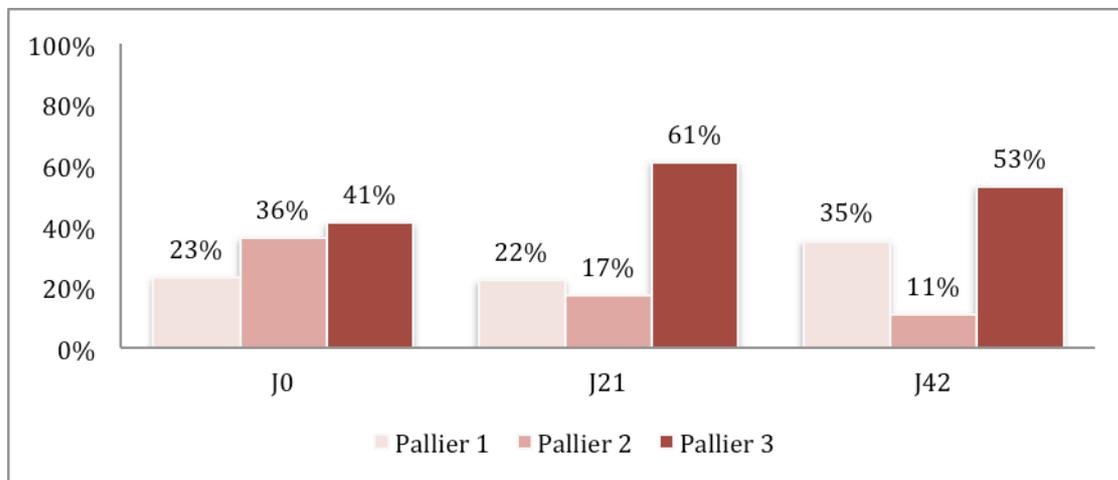


#### 1.4. E Douleur

Les plaies tumorales sont le reflet extérieur du cancer, qui évolue le plus souvent. Elles mettent donc le patient, à chaque soin, dans une position d'inquiétude et de stress qui tend à mêler douleur et souffrance en une seule et même expression. La douleur a été évaluée avec une échelle verbale simple (EVS) en 5 classes (absente, faible, modérée, forte, intense)

La majorité des patientes bénéficiaient d'un traitement général pour la douleur de palier 1 (non opiacés), 2 (opioïdes faibles) ou 3 (opioïdes), résumé sur le tableau 16.

Tableau 16 : % des traitements antalgiques par palier (1, 2 ou 3)



Si la douleur posait problème lors des soins, il était proposé au patient de la prévenir et de la traiter avec du MEOPA (4% sur l'ensemble des évaluations), une prémédication (4%) ou un anesthésiant local type EMLA® (2%) ou Xylocaïne® (4%)

D'autres thérapeutiques telles que la morphine locale ou la réalisation de soins sous AG (anesthésie générale) ont été proposées dans 4% situations (Tableau 17).

Contrairement aux autres symptômes, la douleur semble plus difficile à gérer, lorsqu'elle est présente, même si elle est majoritairement ressentie comme faible à modérée (Tableau 17 bis).

Tableau 17 : intensité de la douleur (absente, faible, modérée, forte, intense) à J0, J21, J42

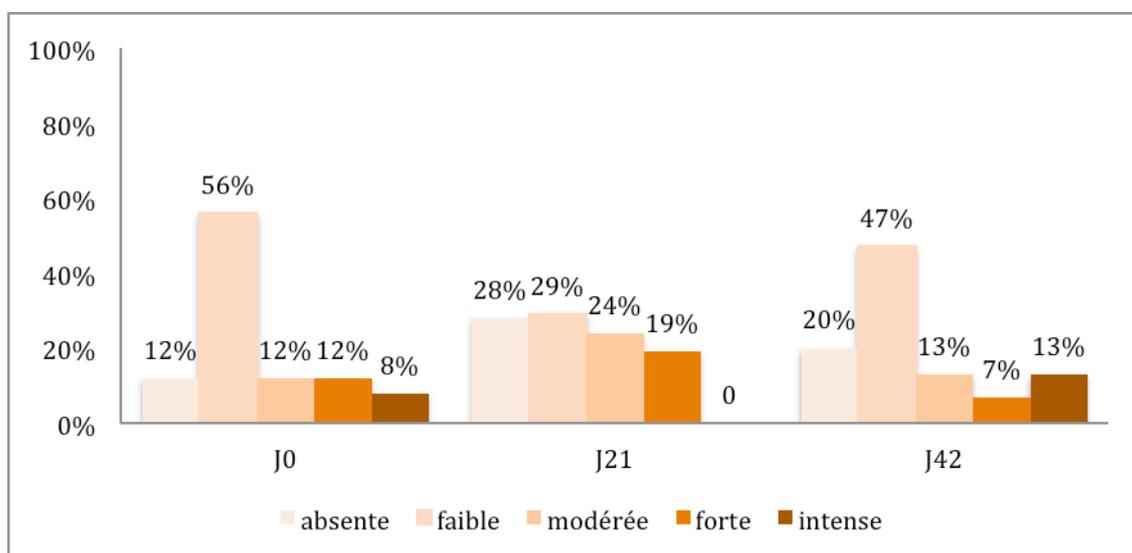
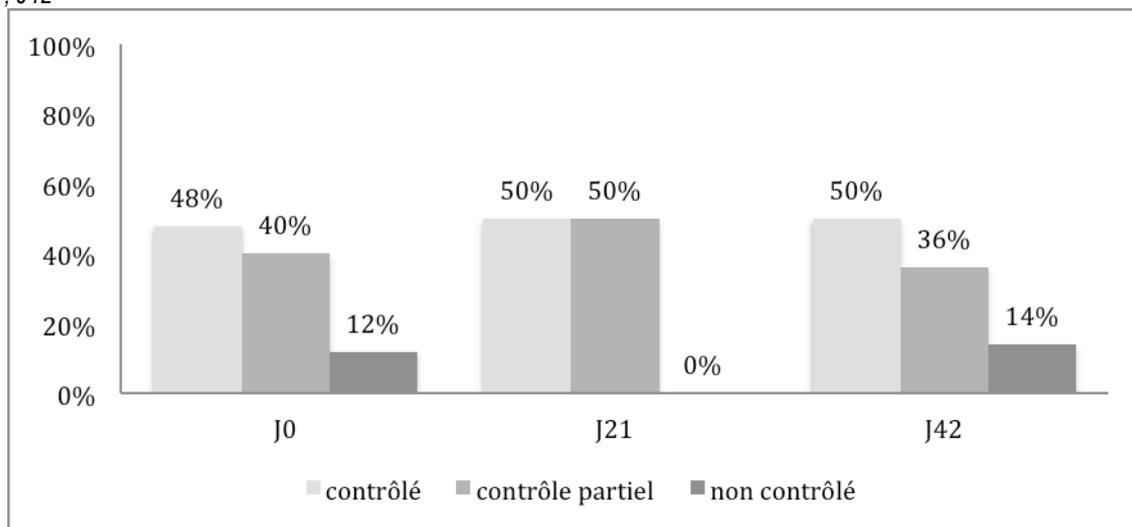


Tableau 17 bis : contrôle de la douleur (contrôlée, partiellement contrôlée, non contrôlée) par les traitements et soins à J0, J21, J42



## 1.5 Descriptif des soins locaux

### 1.5. A Le nettoyage

Le nettoyage des plaies a été réalisé au sérum physiologique dans 79% des cas et à l'eau dans 21% des situations. Un nettoyage au sérum physiologique n'exclut pas un nettoyage préalable à l'eau, la prise de douche sans pansement étant conseillée avant le soin.

### 1.5 B Pansements primaires utilisés

Les pansements primaires sont désignés comme étant ceux qui sont en contact direct avec le lit de la plaie.

- 40% (J0 : 34%, J21 : 50%, J42 : 35%) de pansements alginates ont été utilisés pour leurs propriétés absorbantes, drainantes et hémostatiques (ex : Curasorb<sup>®</sup>, Algosteril<sup>®</sup>).
- 39% (J0 : 41%, J21 : 27%, J42 : 50%) de pansements aux fibres de CMC (Aquace<sup>l</sup><sup>®</sup>) ont été utilisés pour leurs propriétés drainantes, absorbantes et de gélification au contact des exsudats, ce qui permet un retrait non traumatique.
- 11% (J0 : 12%, J21 : 15%, J42 : 5%) de pansements hydrocellulaires (Mepilex<sup>®</sup> non adhésif) ont été utilisés pour leurs propriétés absorbante et drainante, leur facilité d'utilisation (mousse adhérente car siliconée - sans délitement) et leur retrait non traumatique. Les hydrocellulaires font

alors fonction de pansement primaire et secondaire. Leur usage est cependant limité sur les plaies tumorales car ces mousses sont recouvertes (ou enduites) d'un film semi perméable susceptible de majorer les odeurs nauséabondes par la semi occlusion qu'elles créent sur la plaie. La présence d'odeur motive de ce fait un changement de protocole.

- 6% des interfaces (ex : Urgotul® souple) mis en place afin d'éviter que les pansements adhèrent à la plaie et entraînent des saignements traumatiques ou majorent la douleur lors du changement.
- 4% autres

NB : dans 16% des cas, le pansement primaire était positionné en multicouches afin d'en augmenter la capacité d'absorption.

#### 1.5. C Pansements de recouvrement employés

Le recouvrement décrit les compresses ou pansements qui se superposent au pansement primaire. Il était assuré à 42% par une association de compresses absorbantes (ex : Zetuvit®) et de pansement au charbon (ex : ActiSorb® Plus), à 19% par des hydrocellulaires (ex/ Mepilex®), à 15% par une association alginate, charbon et compresses absorbantes, à 8% par des compresses absorbantes seules, à 4% par des alginates et compresses absorbantes, à 12% par d'autres pansements (ex : compresses simples)

#### 1.5. D Antimicrobiens

Des antimicrobiens (pansements imprégnés, solution de nettoyage) ont été appliqués dans 24% des situations :

- 8% : alginate + ions Ag (Release® Ag non adhérent)
- 3% : hydrocellulaire + ions Ag
- 1% nanocristaux d'Ag (Acticoat®),
- 7% autres (PHMB + Bétaïne ou autre anti-bactérien et anti-biofilm)

Ces produits ont été prescrits sur une période de 8 à 12 jours pour traiter les premiers signes infectieux observés cliniquement (ex : majoration des odeurs ou des exsudats, modification inexplicée du lit de la plaie) ou en cas de suspicion de présence de biofilm. Dans ce dernier cas, les antimicrobiens ou solution de nettoyage (Prontosan®) étaient associés tant que possible à une détersion superficielle régulière du lit de la plaie afin d'optimiser l'efficacité anti-biofilm des soins.

Ces antimicrobiens n'aurait pas été systématiquement poursuivis en cas d'infection, car dans ce cas, un traitement antibiotique par voix générale s'impose. L'intérêt de l'application locale concomitante

d'antimicrobiens peut-être discutable bien qu'elle semblerait pouvoir renforcer l'efficacité du traitement administré par voie générale. Le lavage de la plaie et le drainage des écoulements sont par contre systématiquement renforcés.

## 2. Microbiologie

### 2.1 Descriptif des résultats microbiologiques

Sans surprise, la flore des plaies s'est avérée majoritairement polymicrobienne. Cinquante-quatre bactéries différentes ont été retrouvées sur les plaies, soit 37 bactéries aérobies et anaérobies facultatives, et 17 bactéries anaérobies strictes. Les dix bactéries les plus fréquemment retrouvées sont, par ordre décroissant : *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. striatum*, *P. mirabilis*, *E. Coli*, *F. necrophorum*, *P. micros*, *S. Bêta hémolytique*, *P. asacharolyticus*, *P. assacharolytica*. (Tableaux 18 et 19 – encadrés en bleu)

Tableau 18 : % (nombre) des bactéries aérobies et aéro-anaérobies facultatives isolées dans les prélèvements à J0 (25 prélèvements), J21 (21 prélèvements), J42 (15 prélèvements)

		J0	J21	J42
<b>Staphylococcus</b>	<i>aureus</i>	64% (16)	62% (13)	73% (11)
	Coag -	20% (5)	10% (2)	13% (2)
	<i>lugdunensis</i>	4 % (1)	10% (2)	0 %
<b>Pseudomonas</b>	<i>aeruginosa</i>	40% (10)	52% (11)	33% (5)
	<i>stutzeri, putida, spp</i>	12% (3)	5 % (1)	7 % (1)
<b>Corynebacterium</b>	<i>striatum</i>	28% (7)	43% (9)	40% (5)
	<i>Sp, pseudodiphthericum</i>	12% (2)	5 % (1)	0 %
<b>Streptococcus</b>	du groupe B	16% (4)	24%(5)	13% (2)
	Beta hémolytique du groupe G	8 % (2)	10% (2)	13% (2)
	<i>Sanguinis, oralis, mitis</i>	12% (3)	10% (2)	7 % (1)
<b>Proteus</b>	<i>mirabilis</i>	24% (6)	33% (7)	27% (4)
	<i>vulgaris, penneri,</i>	4 % (1)	10% (2)	13% (2)
<b>Escherichia</b>	<i>coli</i>	20% (5)	24% (5)	27% (4)
<b>Entérocoques</b>	<i>faecium</i>	4 % (1)	5 % (1)	7 % (1)
	<i>faecalis</i>	16% (4)	10% (2)	13% (2)

<b>Klebsiella</b>	<i>oxytoca</i>	8 % (2)	14% (3)	20% (3)
<b>Propionibacterium</b>	<i>acnes</i>	8 % (2)	5 % (1)	7 % (1)
<b>Alcaligenes</b>	<i>faecalis</i>	4 % (1)	10% (2)	7 % (1)
<b>Morganella</b>	<i>morganii</i>	4 % (1)	10% (2)	7 % (1)
<b>Citrobacter</b>	<i>freundii</i>	4 % (1)	0 %	13% (2)
<b>Autres</b>	<i>A.Baumannii, X. maltophila, A viridans, A. turicensis, Dermaba hominis, S marescens, C. koseri, Pantoea sp, Bacillus sp, B coryneforme, E. cloacae</i>	4 % (1)	5 % (1)	7 % (1)

Tableau 19 : % (nombre) des bactéries anaérobies strictes isolées sur les prélèvements à J0 (25 prélèvements), J21 (21 prélèvements), J42 (15 prélèvements)

		<b>J0</b>	<b>J21</b>	<b>J42</b>
<b>Peptostreptococcus</b>	<i>micros</i>	12% (3)	24% (5)	20% (3)
	<i>magnus</i>	20% (4)	5 % (1)	7 % (1)
	<i>asacharolyticus</i>	24% (6)	19% (4)	13% (2)
	<i>anaerobius</i>	4 % (1)	5 % (1)	13% (2)
	<i>indolicus</i>	4 % (1)	0 %	7 % (1)
	<i>prevotii</i>	4 % (1)	0 %	13% (2)
	<i>sp</i>	0 %	10% (2)	0 %
<b>Prevotella</b>	<i>bivia</i>	12% (3)	19% (4)	7 % (1)
	<i>loeschii</i>	4 % (1)	5 % (1)	7 % (1)
	<i>sp</i>	8 % (2)	5 % (1)	0 %
	<i>melaninogenica</i>	8 % (2)	10% (2)	13% (2)
	<i>disiens</i>	4 % (1)	5 % (1)	7 % (1)
<b>Fusobacterium</b>	<i>necrophorum</i>	20% (4)	19% (4)	27% (4)
<b>Porphyromonas</b>	<i>assacharolytica</i>	12% (3)	19% (4)	20% (3)
<b>Clostridium</b>	<i>Clostridioforme, spp</i>	8 % (2)	0 %	0 %
<b>Bacteroides</b>	<i>fragilis</i>	12% (3)	19% (4)	20% (3)

Si nous regardons plus précisément les dix bactéries les plus fréquemment isolées dans l'étude (Tableau 20) nous pouvons dire que ce sont principalement des germes commensaux, pathogènes ou pathogènes chez le sujet immunodéprimé (opportunistes). Ils peuvent exprimer des facteurs de virulence :

- structures d'adhésion (Pili)
- capsule polysaccharidique qui offre à la bactérie une plus grande résistance à la bactéricidie et à la phagocytose
- exotoxines (molécules synthétisées par un organisme vivant ayant un effet nocif ou létal pour l'hôte): hémolysine (détruit les hématies), leucocidine (détruit les PN), cytotoxine, leucotoxine (détruit les leucocytes)
- production d'enzymes hydrolytiques (uréases, protéases, DNAses, collagénases, sialidases) qui vont participer à la formation des lésions au siège de la multiplication bactérienne.

Par ailleurs, plusieurs de ces bactéries ont une facilité à s'organiser en mode biofilm.

Tableau 20 : rappel synthétique des caractéristiques des 10 bactéries les plus fréquemment retrouvées

<i>Staphylococcus aureus</i>	Aérobie, Cocci Gram + 1) <u>commensal</u> : chez 15 à 30 % des individus sains (ex : nez, gorge), 2) <u>pouvoir pathogène</u> : pouvoir invasif, enzymes et toxines (ex : hémolysine, leucocidine +/- TSST), +/- capsule, facilité à s'organiser en mode biofilm 3) <u>ubiquitaire</u> (bonne résistance aux mécanismes d'épuration naturels) → risque de transmission , 4) ! pression de sélection (ex : SARM).
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( <i>Bacille pyocyanique</i> )	Aérobie, Bacille Gram – 1) <u>ubiquitaire</u> , 2) <u>pathogène opportuniste</u> . Facteurs de virulence : adhésion (pili), capsule, libération de toxines (exotoxine A, cytotoxine), enzymes, facilité à s'organiser en mode <b>biofilm</b> , 3) ! pression de sélection
<i>Corynebacterium striatum</i>	Aérobie, Bacille Gram + 1) <u>Commensal</u> , ORL, peau (espace interdigitaux), ORL, 2) <u>pathogène</u> : très rarement, sauf chez sujet immunodéprimé NB : serait en cause dans les odeurs des pieds (espace inter-orteils)
<i>Proteus mirabilis</i>	Aéro-anaérobies, Bacille Gram – 1) <u>commensal</u> du tube digestif. 2) <u>pathogène opportuniste</u> . Facteurs de virulence : adhésion (fimbriae), mobilité, libération protéase et enzymes (ex : uréase, hémolysine), +/- encapsulé, facilité à s'organiser en mode biofilm
<i>Escherichia coli</i> ( <i>colibacille</i> )	Aéro-anaérobies, Bacille Gram - 1) <u>commensal</u> du tube digestif, 2) <u>pathogène</u> : capacités d'adhésion, multiplication rapide, possible capsule, sécrétions de toxines. Certains mutants de l'E. coli s'organisent en mode biofilm.
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	Anaérobies, Bacille Gram – 1) <u>pathogène</u> , même si considéré comme commensal dans la sphère ORL, 2) très virulent. Facteurs de virulence : a) enzymes facilitant la destruction des tissus qu'elles envahissent (hémolysine, hémagglutinine, DNase, collagénase, gélatinase), b) facteurs d'agrégation des plaquettes (risque de thrombose), c) capsule), d) sécrétion d'une leucotoxine qui agit sur les leucocytes est également dermatotoxique NB : 2 sous groupe A et B
<i>Peptostreptococcus micros et</i>	Anaérobies, Cocci Gram + (Gram similaire aux Bacteroides)

<i>asacharolyticus</i>	1) commensal bouche, peau, gastro intestinal, vagin, voies urinaires 2) pathogène chez sujet immunodéprimé ou après traumatisme. Entraîne des nécroses des tissus sains et abcès. Participe aux infections mixtes à anaérobies. Parmi les Pepto, souvent observés dans les infections de plaie et de peau. Souvent lié à la chronicité, 3) importante résistance aux ATB, notamment car se multiplie lentement.
<b><i>Streptococcus B</i></b> <b>(<i>S. agalactiae</i>)</b>	Anaérobies aéro tolérants, Cocci Gram + 1) commensal : voies génitales, intestin, respiratoires. Pathogène : chez sujet immunodéprimé (+ femme enceinte), pyogène (même si < Gr A). Facteurs de virulence : +/- capsule, sécrétion d'enzyme (sialidase), pouvoir invasif, adhésion (Pili). Capacité à s'organiser en mode biofilm particulièrement quand 2a pili à la surface (3 types de pili 1, 2a et 2b)
<b><i>Porphyromonas</i></b> <b><i>assacharolytica</i></b>	Anaérobies. Bacille Gram – 2) commensal cavité buccale et ORL, génital, intestinal 2) pathogène : Facteurs de virulence : toxines

Malgré un nombre important de bactéries d'espèces différentes, aucun épisode infectieux n'a été observé chez les 25 patientes pendant la période d'évaluation de 42 jours alors que 56% à 60% d'entre elles présentaient un risque d'infection par contiguïté (proximité plaie / cathéter central) et 64% étaient en cours de chimiothérapie le jour de l'inclusion.

Mais même en l'absence d'infection avérée, nous pouvons suspecter que les variations de la flore bactérienne, sa mixité et la présence de certaines bactéries spécifiques aient pu modifier l'intensité des symptômes (odeurs, douleur, exsudat, saignement) et du risque infectieux.

## 2.2. La mixité de la flore et ses conséquences

La présence et le nombre de bactéries anaérobies sur une plaie sont évoqués comme pouvant majorer le risque infectieux.

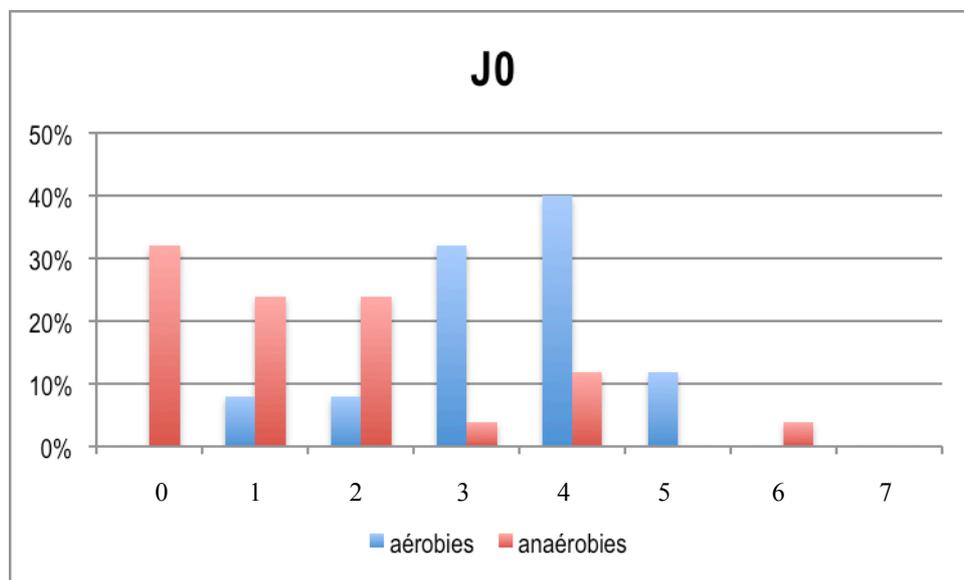
Selon une revue de la littérature réalisée par Bowler et al en 2001, les bactéries anaérobies constituent 1/3 du nombre total des bactéries sur les plaies colonisées et ce chiffre augmente à 50% sur les plaies infectées (Tableau 4). Même si cette revue de la littérature ne porte pas sur les plaies tumorales, la répartition et l'évolution des bactéries aérobie / anaérobies semble donc être un facteur déterminant du risque infectieux et/ou de l'évolution défavorable de certains symptômes (ex : odeurs, douleur). Les conséquences de la synergie des bactéries aérobie et anaérobies seraient plus importantes que le caractère pathogène de certaines bactéries spécifiques retrouvées sur les plaies.

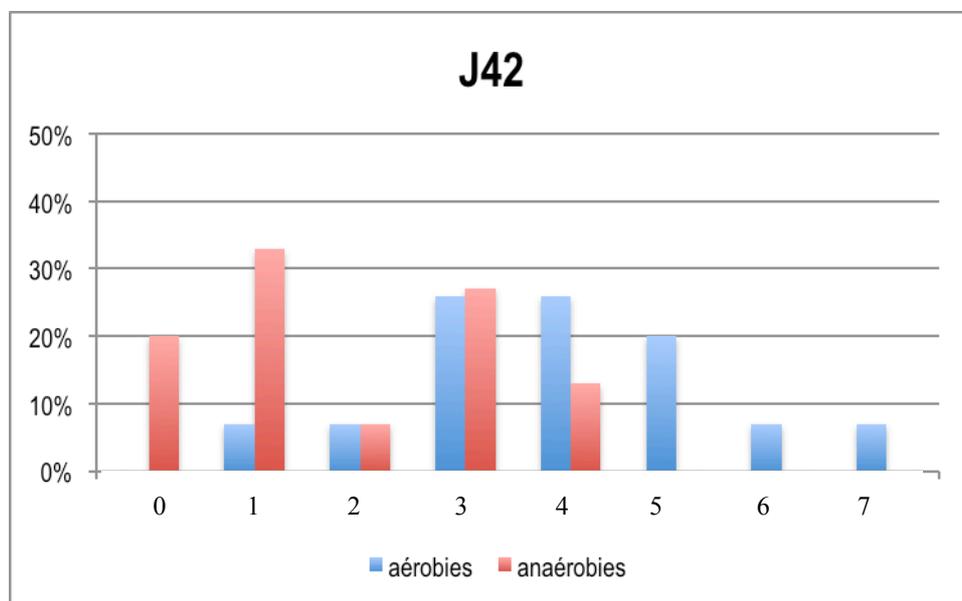
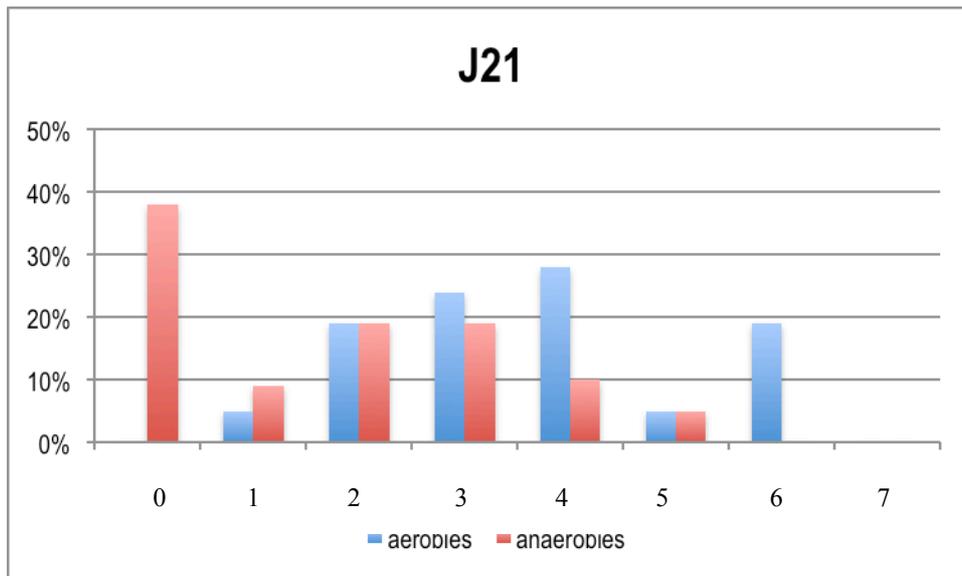
Si nous comparons ces hypothèses à la répartition des bactéries sur les prélèvements de nos 25 patientes, nous pouvons noter que toutes les plaies étaient colonisées avec au moins 1 bactérie aérobie ou aéro-anaérobie. En revanche, la présence de bactéries anaérobies strictes  $\geq 1$  n'a été retrouvée que sur 70% des échantillons (J0 : 68%, J21 : 62%, J42 : 80%). Par ailleurs, sur l'ensemble des prélèvements le nombre de bactéries anaérobies strictes constituait environ 1/3 du nombre total des bactéries, en cohérence avec ce qui est écrit dans la littérature.

En mode libre et circulant, le développement des bactéries anaérobies strictes serait le plus souvent lié à la présence de bactéries aéro-anaérobies facultatives qui réduisent localement le potentiel d'oxydoréduction et créent les conditions favorables au développement des germes anaérobies commensaux présents sur le site.

Aussi avons-nous essayé d'observer si ce potentiel Redox était visible sur les tableaux illustrant la répartition entre les bactéries aérobies et aéro-anaérobies *versus* les bactéries anaérobies strictes dans notre étude (Tableaux 21, 22, 23).

Tableaux 21, 22, 23 : répartition du nombre des bactéries aérobies et aéro-anaérobies (en bleu) et des bactéries anaérobies strictes (en rouge) isolées dans les prélèvements à J0, J21 et J42





L'interprétation des tableaux est hasardeuse. Nous n'observons pas ici des phénomènes d'interactions bactériennes *in vitro* mais *in vivo*, dans un contexte dynamique soumis à l'influence de multiples facteurs liés à l'hôte, l'environnement ou les traitements. Nous notons que des écarts semblent se réduire (lorsqu'il y a 3 ou 4 bactéries). Une plus longue période d'évaluation aurait peut-être permis de mettre en évidence des changements plus marqués et récurrents.

Les bactéries anaérobies étant suspectées de majorer le risque infectieux, nous avons travaillé sur l'impact de la présence ou de l'absence des bactéries anaérobies strictes dans l'évolution des plaies et de leurs symptômes chez les 25 patientes incluses.

Si nous regardons le faible nombre de plaies (16%) qui se sont partiellement épidermisées, nous constatons qu'aucune d'entre elles n'étaient colonisées par des germes anaérobies lors de l'évaluation précédant l'épithélialisation, mais aussi que le nombre de bactéries aérobies étaient relativement faible (de 1 à 3). Le nombre de plaies est cependant insuffisant pour conclure que la cicatrisation ait été conditionnée par l'absence de germes anaérobies ou un faible nombre total de bactéries.

Afin d'étudier l'impact clinique des bactéries anaérobies sur les plaies nous avons croisé les données relatives aux différents symptômes (odeurs, exsudats, douleur) avec la présence de bactéries anaérobies à chaque évaluation. Les résultats montrent une différence significative sur l'odeur (divisée en 2 groupes : odeur 0 : absente *versus* odeur 1 : faible, 2 : modérée, 3 : intense), la quantité des exsudats (divisée en 2 groupes : exsudat 0: absent, 1 : faible *versus* exsudat 2: modéré, 3 : intense) (Tableau 24) et des résultats non significatifs sur la douleur.

Tableau 24 : résultats significatifs de l'impact des bactéries anaérobies strictes sur les odeurs (absente (0), présente (1, 2, 3)) et les exsudats (absent ou faible (0, 1), modéré ou intense (2,3))

	<b>Absence de bactéries anaérobies strictes</b>	<b>Présence de bactéries anaérobies strictes</b>	<b>Total</b>
<b>Odeur absente</b>	10 (55,6%)	9 (21,4%)	19 (31,7%)
<b>Odeur faible, modérée, intense</b>	8 (44,4%)	33 (78,6%)	41 (68,3%)
			<b>p = 0.009</b>
<b>Exsudat absente, faible</b>	8 (44,4%)	7 (16,7%)	15 (25,0%)
<b>Exsudat modéré, intense</b>	10 (55,6%)	35 (83,3%)	45 (75,0%)
			<b>p = 0.050</b>
<b>Total</b>	18	42	60

NB : une valeur manquante dans l'analyse des anaérobies d'où un total sur 60

La présence de bactéries anaérobies semblerait influencer sur l'odeur et l'intensité des écoulements. Aussi avons nous cherché si cela pouvait être lié à une bactérie particulière, sur l'ensemble des germes (bactéries anaérobies strictes, aérobies ou aéro-anaérobies).

Nous avons croisé chaque bactérie à la présence d'odeur, sur l'ensemble des évaluations. A la lecture des résultats, 1 seule bactérie aéro-anaérobie (*P. mirabilis*) est significativement liée à la présence d'odeur. Nous notons également une tendance avec une bactérie anaérobie stricte (*P. magnus*) et 1 autre bactérie aéro-anaérobies (*C. striatum*) (Tableau 25).

Tableau 25 : bactérie spécifiquement liées à l'odeur ( $p < 0,05$ ) et bactéries pour lesquelles on note une « tendance » (proche de  $p < 0,05$ )

	<b>Absence <i>P mirabilis</i></b>	<b>Présence <i>P mirabilis</i></b>	<b>Total</b>
<b>Odeur absente</b>	17 (38.64%)	2 (11.76%)	19
<b>faible</b>	20 (45.45%)	4 (23.53%)	24
<b>modérée</b>	7 (15.91%)	9 (52.94%)	16
<b>intense</b>	0 (0.00%)	2 (11.76%)	2
<b>Total</b>	44	17	61 <b>p = 0.001</b>
	<b>Absence <i>P magnus</i></b>	<b>Présence <i>P magnus</i></b>	<b>Total</b>
<b>Odeur absente</b>	5 (25.00%)	3 (60.00%)	8
<b>faible</b>	11 (55.00%)	0 (0.00%)	11
<b>modérée</b>	4 (20.00%)	2 (40.00%)	6
<b>intense</b>	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0
<b>Total</b>	20	5	25 <b>p = 0.064</b>
	<b>Absence <i>C striatum</i></b>	<b>Présence <i>C striatum</i></b>	<b>Total</b>
<b>Odeur absente</b>	16 (41.03%)	3 (13.64%)	19
<b>faible</b>	12 (30.77%)	12 (54.55%)	24
<b>modérée</b>	10 (25.64%)	6 (27.27%)	16
<b>intense</b>	1 (2.56%)	1 (4.55%)	2
<b>Total</b>	39	22	61 <b>p = 0.088</b>

Puis, nous avons réalisé le même croisement, mais avec les données relatives à la quantité d'exsudat. Sur l'ensemble des évaluations, seule *Klebsiella oxycota* (bactérie aéro-anaérobie) semble, avoir une tendance ( $p=0,06$ ) à majorer les exsudats, lorsqu'elle est isolée.

Ces résultats n'ont donc pas permis d'établir de liens entre des bactéries anaérobies strictes et des symptômes, bien que ces mêmes symptômes semblent s'intensifier en présence de bactéries anaérobies dans la flore mixte qui les compose. Cela peut sans doute s'expliquer par l'effet synergique de certaines bactéries entre elles ainsi que nous l'avons évoqué plus haut. Aussi avons-nous cherché si nous pouvions identifier des bactéries en lien avec des effets synergiques.

Nous avons tout d'abord considéré qu'un effet synergique était lié à un couple d'au moins une bactérie aérobie ou aéro-anaérobie facultative et une bactérie anaérobie stricte. Selon ce critère, nous avons trouvé 407 couples (dont 187 différents) sur les 61 évaluations et n'avons retenu que les couples représentés  $\geq 5$  fois, soit 22 couples.

En travaillant sur ces 22 couples, nous n'avons retrouvé aucun résultat significatif sur les odeurs, les exsudats ou la douleur. Ce constat est peut être lié à la trop faible représentativité de chaque couple, même si nous avons pris la précaution de ne retenir que ceux présents plusieurs fois.

En revanche, dans ces résultats, nous avons remarqué qu'une bactérie aérobie (*P. aeruginosa*), une bactérie aéro-anaérobie (*P. Mirabilis*) et une bactérie anaérobie stricte (*F. necrophorum*) étaient plus souvent que les autres associés à cette notion de couple.

Nous avons donc décidé de réaliser des regroupements autour de ces 3 bactéries, toujours dans l'objectif d'essayer de mettre en évidence d'éventuels effets synergiques liés à la mixité de la flore. Les résultats montrent que :

- Les couples « *P. Mirabilis* + 1 bactérie anaérobie stricte » augmentent significativement les odeurs ( $p=0,04$ ) et ont tendance à majorer les exsudats ( $p=0,07$ ).
- Les couples « *P. aeruginosa* + 1 bactérie anaérobie stricte » n'impactent ni les odeurs, ni la quantité d'exsudat, ni la douleur.
- Les couples « *F. necrophorum* + 1 bactérie aérobie » augmentent significativement les exsudats ( $p=0,02$ ).

Il avait déjà été démontré que *P. mirabilis*, isolément, impactait les odeurs. En revanche, il est intéressant de noter que *F. necrophorum* influe sur les écoulements lorsqu'il est en couple, par un effet probable de synergie avec d'autres bactéries.

Puis, nous avons considéré que la synergie était peut-être davantage liée à des couples composés d'au moins 2 bactéries anaérobies. Nous n'avons retrouvé dans notre série que 2 couples de bactéries anaérobies strictes présents  $\geq 5$  fois.

En croisant la présence de ces 2 couples avec les variables relatives aux odeurs, exsudats et douleur, nous n'avons obtenu aucun résultat significatif (ni de tendance).

Identifier précisément des bactéries responsables d'effet synergique semble difficile. En revanche, en prenant en compte que dans cette étude:

- 1) les plaies sont colonisées par une flore mixte et polymicrobienne,
- 2) des effets de synergie entre les bactéries peuvent s'opérer,
- 3) la présence de  $\geq 1$  germe anaérobie semble majorer les odeurs et les exsudats,

nous avons recherché si les symptômes étaient majorés lorsque les plaies étaient colonisées par plusieurs espèces de bactéries, que ce soit des germes aérobies, aéro-anaérobies, ou anaérobies strictes. La comparaison entre deux groupes semble possible et représentative lorsque la colonisation est au nombre de 4 ou 5 bactéries d'espèces différentes, car nous avons alors deux groupes un peu

près équivalents (Tableau 26). Les résultats sont significatifs sur les odeurs et les exsudats, mais non significatifs sur la douleur. Ils sont donc en faveur d'une majoration des odeurs et des exsudats lorsque la plaie est colonisée par une flore mixte et plusieurs espèces de bactéries.

Tableau 26 : impact de la présence d'un nombre d'espèce de bactéries supérieur à 4 ou 5 sur les odeurs et la quantité d'exsudat

	Nbre de bactéries < 4	Nbre de bactéries > 4	Total
<b>Absence d'odeur (0)</b>	13 (56,5%)	6 (15,8%)	19 (31,1%)
<b>Présence d'odeur (1, 2, 3)</b>	10 (43,5%)	32 (84,2%)	42 (68,9%)
Total	23	38	61 <b>p = 0,0008</b>
<b>Exsudat absent ou faible</b>	10 (43,5%)	5 (13,2%)	15 (24,6%)
<b>Exsudat modéré ou intense</b>	13 (56,5%)	33 (86,8%)	46 (75,4%)
Total	23	38	61 <b>p = 0,007</b>

	Nbre de bactéries < 5	Nbre de bactéries > 5	Total
<b>Absence d'odeur (0)</b>	14 (48,3%)	5 (15,6%)	19 (31,1%)
<b>Présence d'odeur (1, 2, 3)</b>	15 (51,7%)	27 (84,4%)	42 (68,9%)
Total	29	32	61 <b>p = 0,005</b>
<b>Exsudat absent ou faible</b>	11 (37,9%)	4 (12,5%)	15 (24,6%)
<b>Exsudat modéré ou intense</b>	18 (62,1%)	28 (87,5%)	46 (75,4%)
Total	29	32	61 <b>p = 0,02</b>

Ce constat nous a amené à regarder si le nombre d'espèces de germes sur les plaies augmente avec leur ancienneté (Tableau 27). L'ancienneté a été divisé en trois groupes : ≤ 6 semaines, entre 6 semaines et 8 mois et supérieure à 8 mois. Le calcul a été fait en tenant compte des évaluations à J0, des patients étant susceptibles de changer de groupe entre J0 et J42, ou d'être sortie de l'étude.

Tableau 27 : nombre d'espèces de bactérie / nombre de patients, par rapport à l'ancienneté de la plaie, à J0

	Ancienneté ≤ 6 semaines	6 semaines < ancienneté ≤ 8 mois	Ancienneté > 8 mois
<b>Nombre d'espèces de bactéries</b>	14	39	57
<b>Nombre de patients</b>	3	8	12
<b>Total</b>	4.666667	4.875000	4.750000

L'ancienneté ne semble pas impacter le nombre de bactéries d'espèce différentes présentes sur la plaie, en prenant en compte qu'aucune plaie n'avait une ancienneté inférieure à 4 semaines.

### 2.3. La quantité de bactéries, le risque infectieux et les signes d'infection

Même si l'infection est le plus souvent microbiologiquement définie comme la présence de bactéries excédant  $10^5$  /g sur une plaie, le diagnostic d'infection reste avant tout clinique, après observation de signes locaux (ex : aspect, majoration des exsudats) associés ou non à des signes généraux comme la fièvre.

Dans cette série, aucune infection n'a été cliniquement diagnostiquée alors que des bactéries étaient en quantité  $> 10^5$ /g sur certains prélèvements. En revanche, des premiers signes locaux d'infection ont été observés.

L'infection locale et le risque infectieux peuvent être abordé sous deux angles différents, soit par l'observation clinique, soit microbiologiquement, en retenant le seuil de quantité de bactéries  $> 10^5$  /g. Dans les deux cas, les critères (signes cliniques) et le seuil ( $10^5$  /g) peuvent être critiqués. Ils sont en effet souvent sujets à des débats d'experts.

Ceci peut s'expliquer par le fait que:

- 1) les signes locaux d'infection diffèrent d'un type de plaie à l'autre,
- 2) les bactéries sont rarement quantifiées et corrélées avec des résultats cliniques,
- 3) la mise sur le marché d'antimicrobiens (pansements à l'argent) à large spectre et à priori moins cytotoxiques et allergisant que les antiseptiques traditionnellement utilisés peuvent modifier le risque infectieux étudié avant l'utilisation de ces pansements.
- 4) il est toujours délicat de travailler sur une notion de risque, de probabilité lorsque ce risque est impacté par de multiples facteurs. Le risque infectieux est donc difficile à analyser statistiquement car multifactoriel.

Dans ce contexte, les résultats présentés ici, au-delà de leur intérêt sur les plaies tumorales, apporteront peut être quelques éléments de réponses.

Nous avons choisi d'amorcer notre réflexion en comparant l'intensité des symptômes à la présence de bactéries en quantité  $\leq 10^5$  ou  $> 10^5$ . Sur 321 germes recensés, 36 étaient en quantité  $> 10^5$ . Les résultats montrent une augmentation significative de la douleur ( $p=0,04$ ) et une tendance à la majoration des exsudats ( $p=0,07$ ) lorsqu'une bactérie est en quantité  $> 10^5$  (Tableau 28).

Tableau 28 : Impact de la présence d'une bactérie > 10<sup>5</sup> sur les symptômes

		Bactéries ≤ 10 <sup>5</sup>	Bactéries > 10 <sup>5</sup>	Total	
<b>Odeur</b>	<b>absente</b>	65 (22.8%)	6 (16.7%)	71 (22.1%)	
	<b>faible</b>	115 (40.4%)	13 (36.1%)	128 (39.9%)	
	<b>modérée</b>	92 (32.3%)	14 (38.9%)	106 (33.0%)	
	<b>intense</b>	13 (4.6%)	3 (8.3%)	16 (5.0%)	
	Total	285	36	321	<b>p = 0.56</b>
<b>Exsudats</b>	<b>absent</b>	1 (0.4%)	0 (0.0%)	1 (0.3%)	
	<b>faible</b>	53 (18.6%)	1 (2.8%)	54 (16.8%)	
	<b>modéré</b>	205 (71.9%)	33 (91.7%)	238 (74.1%)	
	<b>intense</b>	26 (9.1%)	2 (5.6%)	28 (8.7%)	
	Total	285	36	321	<b>p = 0.07</b>
<b>Douleur</b>	<b>absente</b>	66 (23.2%)	4 (11.1%)	70 (21.8%)	
	<b>faible</b>	129 (45.3%)	15 (41.7%)	144 (44.9%)	
	<b>modérée</b>	50 (17.5%)	5 (13.9%)	55 (17.1%)	
	<b>forte</b>	27 (9.5%)	8 (22.2%)	35 (10.9%)	
	<b>intense</b>	13 (4.6%)	4 (11.1%)	17 (5.3%)	
Total	285	36	321	<b>p = 0.04</b>	

Il nous a paru étonnant de ne pas avoir de résultats significatifs (ou tendance) sur les odeurs. Aussi avons-nous décidé de croiser les variables relatives à l'odeur avec un seuil de quantité de bactérie plus bas, à > 10<sup>4</sup>. Nous avons obtenu un résultat significatif sur les odeurs (p = 0,02). Cela signifie que dans cette étude, lorsqu'une bactérie est en quantité > 10<sup>4</sup> dans un prélèvement, la douleur, les écoulements et les odeurs tendent à être plus importants. Or, ces symptômes sont également des signes cliniques d'infection, qui marquent que l'équilibre entre la colonisation bactérienne et l'hôte est précaire, avec l'apparition (ou la majoration) de symptômes.

Le seuil de 10<sup>5</sup> étant celui le plus fréquemment retenu dans la littérature, nous avons recherché les conditions les plus fréquentes dans lesquelles on retrouve au moins une des bactéries présente en quantité > 10<sup>5</sup>.

Compte tenu des résultats obtenus au chapitre précédent (mixité de la flore et ses conséquences), nous avons croisé la quantité de bactéries (≤ 10<sup>5</sup> ou > 10<sup>5</sup>) au nombre de germes d'espèces différentes colonisant les plaies, au nombre de germes anaérobies strictes et au pourcentage de bactéries anaérobies strictes par rapport aux bactéries aérobies et aéro-anaérobies.

Les résultats statistiques indiquent que lorsque les bactéries sont en quantité  $> 10^5$  dans un prélèvement, le nombre d'espèces de germe / prélèvement est plus élevé, le nombre de germe anaérobies stricts est plus élevé, le pourcentage du nombre d'espèces de germes anaérobies / aérobie est plus élevé (Tableau 29)

Tableau 29 : test (quantitatif) sur les prélèvements avec une bactérie  $> 10^5$ , par rapport au nombre de germes d'espèces différentes, au nombre de germes anaérobies stricts, et à la répartition des bactéries aérobie et aéro-anaérobies / bactéries anaérobies strictes, dans les prélèvements.

	Bactéries $\leq 10^5$ dans 1 prélèvement	Bactéries $> 10^5$ dans 1 prélèvement	Total
	40	21	61
<b>Nombre de germe</b>			
Médiane	4	7	6
Extrêmes	1 - 11	1 - 10	1 - 11
			<b>p = 0.0003</b>
<b>Nombre de germes anaérobies stricts</b>			
Médiane	1	3	1
Extrêmes	0 - 5	0 - 6	0 - 6
			<b>p = 0.0006</b>
<b>% de germes anaérobies stricts</b>			
Médiane	0,16	0,37	0,25
Extrême	0 - 0,6	0 - 0,6	0 - 0,6
			<b>p = 0.004</b>

Nous savons par ailleurs que lors des périodes d'aplasie (baisse des polynucléaires neutrophiles) liées à certains traitements de chimiothérapie, le risque infectieux est plus élevé étant donné la baisse des défenses immunitaires. 24 à 29% des patientes étaient en période d'aplasie lors des évaluations.

Si nous comparons la quantité ( $\leq 10^5$  ou  $> 10^5$ ) et le nombre d'espèces de bactéries sur les plaies des patientes en aplasie par rapport aux patientes non immunodéprimées, nous observons un plus grand nombre de bactéries en quantité  $> 10^5$  ( $p= 0,3$  à J0,  $p=0,02$  à J21,  $p=0,02$  à J42) dans le groupe des patientes en aplasie, et une tendance à un plus grand nombre d'espèce de germes sur les plaies ( $p= 0,6$  à J0,  $p= 0,01$  à J21,  $p=0,1$  à J42) de ce même groupe.

L'ensemble de ces considérations microbiologiques est intéressante mais complexe pour aider les soignants au diagnostic clinique d'évaluation du risque infectieux, d'autant plus que les bactéries anaérobies sont peu voire pas analysées en pratique courante, et les germes ne sont pas non plus quantifiés. Si nous synthétisons les résultats obtenus (Tableau 30), nous retenons que :

- 1) Les bactéries en quantité  $\geq 10^5/g$  majorent les odeurs, la douleur +/- les exsudats (Tableau 28). L'élévation de cette quantité de germes est davantage observée en période d'aplasie et / ou et / ou lorsque la plaie est colonisée par plusieurs bactéries d'espèces différentes et / ou lorsque la présence de bactéries anaérobies est plus élevée (Tableau 29).
- 2) Quand le nombre de bactéries d'espèces différentes est supérieur à 4 ou à 5, l'odeur et les exsudats sont majorés (Tableau 26). L'ancienneté de la plaie ne majore pas le nombre d'espèces présentes sur la plaie, sur des plaies d'ancienneté supérieure à 1 mois (Tableau 27).
- 3) La présence de bactéries anaérobies strictes semble majorer les odeurs et les écoulements, ainsi que le risque infectieux si ces bactéries sont en proportion trop importantes par rapport aux germes aérobies (Tableaux 24, 29). L'odeur semble un bon indicateur clinique de la présence de bactéries anaérobies, même s'il n'a pas été possible d'établir un lien direct entre des bactéries anaérobies strictes et l'odeur (Tableau 25)

Tableau 30 : synthèse de résultats.

	Présence de bactéries anaérobies	Nombre d'espèces bactéries > 4	Bactérie $\geq 10^5/g$ dans 1 prélèvement
<b>IMPACT SUR</b>			
Odeurs	p=0,009	p = 0,0008	p=0,02
Écoulements	p=0,050	p = 0,007	NS*
Douleurs	NS*	NS*	p=0,04
<b>FAVORISE PAR</b>			
Ancienneté	NS*	Non (plaie > 1 mois)	NS*
Aplasia	NS*	-	p=0,02
% de bactérie anaérobies / aérobies élevé	-	-	p=0,004

\*NS = résultat non significatif

L'odeur semble un bon indicateur du déséquilibre du microbiote des plaies, d'où l'intérêt d'en étudier la perception et la composition dans la suite de ce travail, même si ce critère peut sembler subjectif au regard de la complexité des interactions microbiennes et de ses fluctuations.

Lorsque nous regardons les résultats des évaluations cliniques, nous observons que 47% des plaies ont été identifiées en état de « colonisation critique » (J0 : 48%, J21 : 52%, J42 : 40%), ce qui est relativement stable. Il était entendu par les évaluateurs que l'appellation « colonisation critique » désignait l'apparition de premiers signes infectieux, même frustres ; la perception clinique et subjective d'un risque d'infection.

Les évaluations étaient assurées par les trois infirmières de l'Unité P&C, expérimentées et habituées à travailler ensemble, réduisant au mieux les biais liés à des variations de jugement inter-évaluateur.

Si on corrèle cette observation clinique à la quantité de bactéries retrouvée sur les plaies, on s'aperçoit que 67% des plaies définies en état de « colonisation critique » avaient au moins une bactérie en quantité  $> 10^5$ . Mais si nous croisons la notion de « colonisation critique » de chaque évaluation et chaque sujet avec les variables relatives aux odeurs, exsudat et douleur, nous ne retrouvons qu'une tendance ( $p = 0,06$ ) à la majoration des exsudats, sans résultats significatifs pour les odeurs et la douleur (Tableau 31).

Tableau 31 : croisement de la notion de « colonisation critique » avec les symptômes (odeurs, exsudat, douleur)

	Colonisation critique NON	Colonisation critique OUI	Total	
<b>Odeurs 0</b>	13 (40,6%)	6 (20,7%)	19 (31,1%)	
<b>Faible, modérée, intense</b>	19 (59,4%)	23 (79,3%)	42 (68,9%)	
Total	32	29	61	$p=0,09$
<b>Exsudats 0</b>	11 (34,4%)	4 (13,8%)	15 (24,6%)	
<b>1, 2, 3</b>	21 (65,6%)	25 (86,2%)	46 (75,4%)	
Total	32	36	61	$p=0,06$
<b>Douleur 0</b>	8 (25%)	4 (13,8%)	12 (19,7%)	
<b>faible</b>	15 (46,9%)	12 (41,4%)	27 (44,3%)	
<b>modérée</b>	5 (15,6%)	5 (17,2%)	10 (16,4%)	
<b>forte</b>	3 (9,4%)	5 (17,2%)	8 (13,1%)	
<b>intense</b>	1 (3,1%)	3 (10,3%)	4 (6,6%)	
Total	32	29	61	$p=0,55$

NB : 14 valeurs manquantes

Au vu de ces résultats nous pouvons avancer plusieurs hypothèses :

- 1) que l'appréciation clinique d'un soignant expérimenté peut être suffisamment éduquée pour repérer une élévation de risque infectieux, même avant et / ou en absence d'apparition de signes cliniques

francs (odeurs, douleur) puisque près de 70% des plaies définies microbiologiquement comme ayant une bactérie susceptible d'être en quantité suffisante (> à 10<sup>5</sup>) pour majorer le risque infectieux ont été pressenties comme telles par l'évaluateur,

- 2) que le soignant tient compte d'autres éléments que ceux consécutifs à l'augmentation de la quantité de bactéries, comme la présence de biofilm qui sera étudiée dans les paragraphes suivant.

## 2.4. Pansements et microbiologie

Les pansements appliqués en contact avec la plaie sont très majoritairement (76%) des pansements drainants et absorbants ; associés à un nettoyage soigneux de la plaie, ils contribuent à la garder propre, contrôler les exsudats, éviter les douleurs et les saignements au retrait. Dans certains cas, ils préviennent que la plaie ne se recouvre de croûtes (susceptibles de majorer le risque infectieux) ou d'un épais dépôt de fibrine en conservant un milieu à fort taux d'humidité.

Ils ne contiennent donc pas de principes actifs, mais tendent à limiter les complications et symptômes par des propriétés d'absorption, de drainage, d'hémostase, de non adhérence et de préservation du milieu humide.

Deux familles de pansements se positionnent différemment : les pansements au charbon qui adsorbent les composés volatils odorants produits par les bactéries, et les antimicrobiens. Il nous a donc semblé intéressant de corrélérer leurs applications aux données microbiologiques recueillies.

En effet, nous avons observé d'après le descriptif des soins que les odeurs des plaies malodorantes recouvertes de pansement au charbon n'étaient complètement contrôlées que dans 50% des cas, même si ces odeurs étaient faibles ou moyennes (Tableau 32).

Tableau 32 : contrôle de l'odeur avec les pansements au charbon

	<b>Pst charbon NON</b>	<b>Pst charbon OUI</b>	<b>Total</b>
<b>Odeur non/partiellement contrôlée</b>	2 (14,3%)	14 (50%)	16
<b>Odeur contrôlée</b>	12 (85,7%)	14 (50%)	26
<b>Total</b>	14	28	42

Aussi avons-nous regardé si cet échec partiel était imputable à un certain type de colonisation bactérienne (type de bactérie, quantité de germe). Nous avons donc comparé les résultats microbiologiques du groupe dont les odeurs ont été contrôlés par les soins au groupe dont les odeurs n'ont été que partiellement ou non contrôlées par les soins (Tableau 33).

Nous constatons dans ce deuxième groupe que:

- les odeurs sont significativement plus difficilement contrôlées quand les bactéries sont présentes en quantité  $> 10^5$  ( $p=0,04$ ).
- les bactéries anaérobies strictes ont tendance à avoir un impact ( $p=0,08$ ).
- il n'est pas possible d'imputer spécifiquement à une espèce bactérienne l'échec du traitement de ce symptôme.

Nous retrouvons ici, dans la difficulté à contrôler ce symptôme, le triptyque récurrent : bactéries en quantité  $> 10^5$  et non identification d'une bactérie spécifique +/- bactéries anaérobies strictes

Tableau 33 : Impact de la présence de bactéries en quantité  $>10^5$  et des différent regroupements de bactéries sur le contrôle des odeurs par les soins. Calcul effectué sur les 250 bactéries différentes qui ont été recensées dans les prélèvements des 20 sujets avec présence d'odeur ( $> 0$ )

	Odeur non/partiellement contrôlée	Odeur contrôlée	Total
Regroupements de bactéries			
Bactéries anaérobies strictes	49 (42,6%)	35 (25,9%)	84 (33,6%)
Enterobactéries	18 (15,7%)	23 (17%)	41 (16,4%)
<i>Pseudomonas</i>	13 (11,3%)	15 (11,1%)	28 (11,2%)
<i>Staphylocoques</i>	11 (9,6%)	23 (17%)	34 (13,6%)
<i>Streptocoques</i>	13 (11,3%)	18 (13,3%)	31 (12,4%)
Divers Gram +	11 (9,6%)	21 (15,6%)	32 (12,8%)
Bactéries en quantité $\leq$ ou $>$ à $10^5$			
Bactéries $\leq 10^5$	96 (83,5%)	124 (91,4%)	220 (88%)
Bactéries $> 10^5$	19 (16,5%)	11 (8,1%)	30 (12%)
<b>Total</b>	115	135	250

Concernant les antimicrobiens, nous les avons regroupés en un seul groupe compte tenu du faible nombre de prescription. Nous avons considéré qu'une réduction de l'intensité d'un des trois symptômes liés à l'infection (odeur, exsudat, douleur) serait considérée comme un effet positif. Mais sur l'ensemble des évaluations, les tests ont été non significatifs. Ces résultats ne semblent cependant pas pouvoir être exploités étant donné le trop faible nombre de sujets ayant été traité avec des antimicrobiens.

## 2.5 Schéma de l'évolution de la flore bactérienne

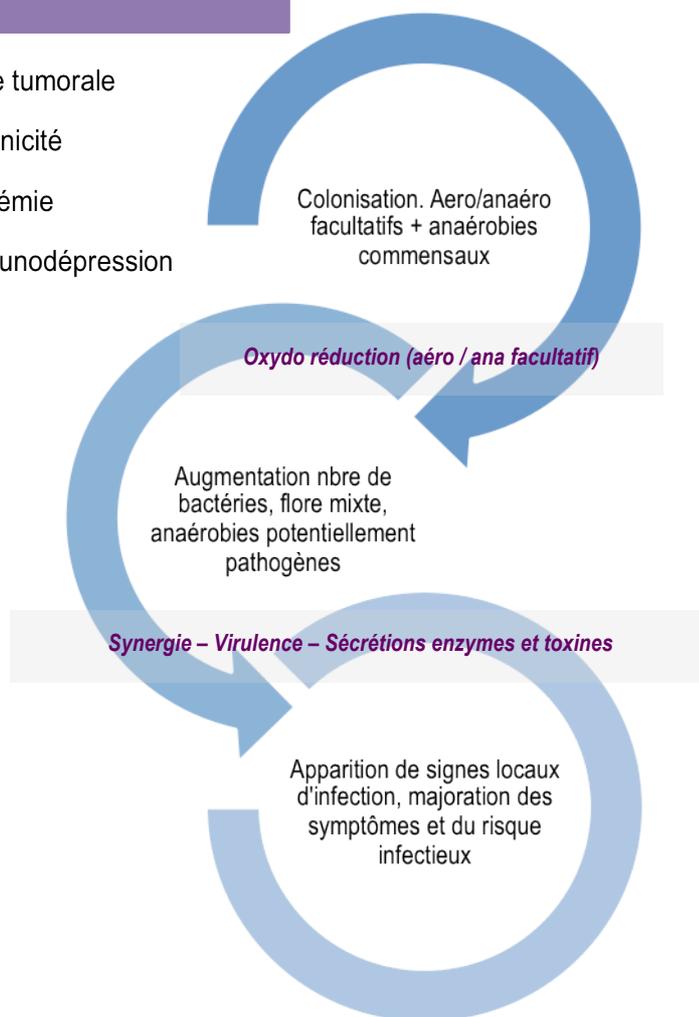
Au regard de ces résultats, il est possible de proposer ce premier schéma, qui doit être lu en considérant que l'infection peut survenir à chaque étape, que l'hôte ou l'évolution de la plaie elle-même (ex : extension, fistulisation) peuvent accélérer chacune des étapes. L'objectif était de schématiser l'évolution de la flore bactérienne des plaies tumorales du sein et suggérer dès à présent une réflexion sur le rapport bénéfice / risque à respecter la colonisation bactérienne, maîtriser ses fluctuations et traiter les symptômes lorsqu'ils sont installés (Schéma 2).

Schéma 2 : évolution de la flore bactérienne sur les plaies tumorales du sein

### Risque de rupture d'équilibre / infection



- plaie tumorale
- chronicité
- ischémie
- immunodépression



### **3. Le biofilm**

#### **3.1 Résultat global**

La présence de biofilm a été analysée sur les plaies tumorales de l'ensemble des 32 patients, soit 78 prélèvements. Douze échantillons n'ont pu être exploités pour des raisons techniques (assèchement). Sur les 66 échantillons exploitables, la présence de biofilm a été retrouvée dans 23 prélèvements (35%) ; Ce chiffre est important, mais bien inférieur à ceux annoncés dans la littérature concernant les plaies chroniques (60%), nécrotiques et colonisées (Wolcott RD 2010).

#### **3.2 Recherche de facteurs cliniques et microbiologiques**

Afin de tenter d'identifier des facteurs prédisposant au développement du biofilm, les données relatives au biofilm ont été croisées avec les dimensions des plaies (longueur, largeur), leur aspect (cavitaire, extériorisé, superficiel), la prédominance d'une couleur (noir, jaune, rouge) et l'aspect de la peau péri lésionnelle. Mais aucun résultat significatif (ni tendance) n'est ressorti de ces différentes analyses.

Nous avons croisé la notion de biofilm avec l'ancienneté de la plaie, selon les trois mêmes groupes que ceux définis dans l'analyse microbiologique (< 6 semaines, de 6 semaines à 8 mois, > à 8 mois). Mais les résultats n'ont rien montré de probant (non significatifs)

Toujours selon cette même idée, nous avons essayé de lier la notion de biofilm (présence, absence) aux différents résultats microbiologiques obtenus, puisque la colonisation initiale permet l'adhésion et le développement du biofilm.

De ce fait, la présence de biofilm a été croisée avec la présence de chaque germe aérobie et aéro-anaérobie, aux trois évaluations. Mais, les résultats n'ont pas permis de corréliser la présence d'une bactérie spécifique à celle de biofilm.

Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'une bactérie n'est justement plus identifiable sur des prélèvements analysés en microbiologie lorsqu'elle s'est organisée en mode biofilm. Nous avons donc comparé le changement de présence d'un germe (oui, non, inchangé) à un changement de valeur de biofilm (apparition ou disparition) entre la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> évaluation, la 2<sup>ème</sup> et la 3<sup>ème</sup> évaluation, la 1<sup>ère</sup> et la 3<sup>ème</sup> évaluation. Les résultats n'ont rien mis en évidence, excepté une tendance (non significative, p =

0,076) avec trois bactéries : *S. aureus*, *S. beta hémolytique* et *A. baumannii*, entre la 1<sup>ère</sup> et la 3<sup>ème</sup> évaluation uniquement.

Afin d'aller plus loin dans cette réflexion, nous sommes partis du principe que certaines bactéries fréquemment retrouvées dans les prélèvements des patientes incluses dans cette étude sont connues pour leur capacité à s'organiser en mode biofilm : *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. Mirabilis*, et aussi *E. coli* et *Streptocoque B*. Il serait donc possible qu'elles facilitent la formation de biofilm lorsqu'au moins l'une d'elles est présente, en synergie avec les autres germes qui colonisent la plaie.

De ce fait, la présence de biofilm a été comparée à la présence d'au moins 1 des 3, puis 1 des 5 bactéries citées, dans les prélèvements de chaque sujet, à chaque évaluation, comparativement aux prélèvements ne contenant aucune de ces 3, puis 5 bactéries. Les résultats de cette comparaison, réalisée à partir de groupes de bactéries et non plus de bactérie analysée isolément, n'ont rien mis en évidence.

Nous nous sommes alors demandé si la quantité de bactéries (non pas en nombre d'espèces différentes, mais en quantité) n'influençait pas la présence de biofilm sur la plaie.

Les bactéries n'ont été quantifiées que sur les 25 premières patientes incluses, mais nous avons observé dans l'analyse microbiologique concernant ces patientes qu'il y avait un plus grand nombre de bactéries > 10<sup>5</sup> lors des périodes d'aplasie. Si nous croisons les résultats des 66 échantillons pour lesquels la présence de biofilm a été analysée aux données relatives à l'aplasie, nous ne retrouvons aucun résultat significatif. Une quantité plus élevée de bactéries ne paraîtrait donc pas influencer la formation de biofilm, ni la baisse de défenses immunitaires définies ici par la neutropénie.

Tableau 34 : récapitulatif biofilm / facteurs cliniques et microbiologiques

Données / biofilm	Surface plaie	Aspect plaie	Couleur plaie	Peau plaie	Lien 1 bactérie	modif bactérie	ancienne té plaie	Flore mixte 1	Flore mixte 2	Aplasia
<b>Spécificité</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Tendance</b>					3					
					bactéries					

### 3.3. Recherche de facteurs liés aux soins et traitements

Les croisements et comparaisons entre les résultats microbiologiques et ceux du biofilm ne permettant pas de réaliser de liens et mieux comprendre pourquoi et quand le biofilm se développe, nous avons cherché si les soins locaux et traitements médicaux auraient pu influencer ce processus.

#### 3.3. A Les soins locaux

Nous avons tout d'abord croisé la présence de biofilm avec les actes de soins ou produits appliqués en contact direct avec la plaie (pansements primaires)

Sans surprise, le type de nettoyage (eau ou sérum physiologique) ne semble pas influencer sur la présence de biofilm. Les différents pansements primaires neutres (sans antibactériens) non plus, excepté les interfaces pour lesquelles nous pouvons noter une tendance (non significative –  $p = 0,11$ ) en faveur d'une présence plus importante de biofilm, comparativement aux autres pansements utilisés, tous drainants et absorbants. Ce résultat ne peut cependant pas être confirmé, d'autant plus que les interfaces sont justement le type de pansement qui a été le moins souvent positionné. L'analyse porte donc sur un très faible nombre de soins.

Puis, nous avons observé les liens éventuels entre la présence de biofilm et l'application des pansements à l'argent (ions, nano cristaux).

Les autres traitements proposés n'ont pas été évalués car aucune patiente n'a été traitée avec des solutions iodées, de chlorhexidine, ou par antibiotique local ; Par ailleurs, plusieurs échantillons de plaies traitées par des solutions antibiofilm n'ont pas été exploitables.

Les résultats sont difficilement interprétables étant donné le nombre de sous-groupes, le nombre restreint d'évaluations réalisées après applications d'antimicrobiens (12), avec une répartition très inégale entre ces groupes. Cependant, le seul pansement qui semble être en lien avec le biofilm, en diminuant sa présence sur la plaie, est le Release® Ag (alginate imprégné d'ions Ag) avec un  $p=0,058$  (Tableau 35).

Tableau 35 : impact des pansements neutres et antimicrobiens sur la présence de biofilm

	Biofilm 0	Biofilm 1	Total
Pansement neutre	33 (64,7%)	18 (35,3%)	51
Alginate Ag	6 (100%)	0 (0%)	6
Autres antimicrobiens	2 (33,3%)	4 (66,7%)	6
<b>Total</b>	<b>41 (65,1%)</b>	<b>22 (34,9%)</b>	<b>63</b>

Or, la concentration en ions argent de cet alginate est relativement similaire à celle des autres produits évalués, imprégnés eux aussi d'ions argent, mais combinés à une mousse hydrocellulaire ou des fibres de CMC. Nous avons donc pensé que le support (pansement) pourrait avoir une action sur le biofilm, même si ces pansements, sous leur forme neutre, n'ont pas donné de résultats significatifs sur le biofilm lorsqu'ils étaient positionnés en pansement primaire. Ce regroupement a permis de constituer des groupes plus importants.

Nous avons donc regroupé les pansements (neutre et antibactérien) selon leur support et apprécié leur efficacité sur le biofilm : groupe 1 : alginate, groupe 2 : fibres de CMC, groupe 3 : hydrocellulaire, en comparant chaque groupe à l'ensemble des autres sujets. Là encore, le groupe des alginates a tendance ( $p = 0,08$ ) à être plus efficace que les autres sur le biofilm (Tableau 36).

Tableau 36 : impact des alginates sur la présence de biofilm

	Biofilm 0	Biofilm 1	Total
<b>Pansements primaires autres que alginate</b>	22 (53,7%)	13 (59,1%)	35
<b>Pansement alginate</b>	19 (46,3%)	9 (40,9%)	28
<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>22</b>	<b>63</b>

Mais nous restons prudents sur la pertinence de ces résultats étant donné la grande inégalité de répartition entre les différents groupes. Le pansement alginate et argent a en effet été beaucoup plus souvent positionné étant donné qu'il est le pansement à l'argent référencé à l'Institut Curie.

Le terme « alginate » désigne une famille de polysaccharides susceptibles de gélifier en présence de certains cations divalents ( $Ca^{2+}$ ). Pour la confection de pansements, mais aussi de beaucoup d'autres produits industriels (ex : gelées alimentaires, cosmétologie, peinture), l'alginate est extrait d'une famille

d'algues brunes. Les propriétés physico chimiques de l'acide mannuronique et l'acide guluronique qu'il contient permettent la fabrication de ses différents produits. Dans le contexte du biofilm, l'alginate est l'exopolysaccharide produit par des bactéries (ex : *P. aeruginosa*) qui participe à la formation de la matrice protectrice du biofilm.

### 3.3. B Les traitements médicaux

La notion de biofilm (absence / présence) a été croisée aux données relatives aux traitements anti-cancéreux (chimiothérapie, radiothérapie), antibiotiques et corticoïdes. Aucun de ces croisements n'a donné de résultats spécifiques.

Nous remarquons qu'il y avait présence de biofilm aux deux seules évaluations réalisées en cours de traitement de radiothérapie, ce qui pourrait peut-être s'expliquer par la réaction inflammatoire locale provoquée par les rayons. Mais cette hypothèse est à prendre avec beaucoup de précautions étant donné le nombre très réduit d'évaluation en cours de radiothérapie.

Il n'est pas surprenant que les antibiotiques n'aient pas interféré avec le biofilm, puisqu'une des grandes particularités de cette organisation bactérienne est de lui permettre de résister à l'efficacité de ce traitement.

En revanche, les corticoïdes auraient pu avoir un retentissement sur le biofilm puisqu'il est suggéré dans la littérature que les corticostéroïdes interfèrent avec le développement du biofilm en réduisant l'inflammation, qui est leur source nutritive.

Tableau 37: récapitulatif biofilm / soins locaux et traitements médicaux

Données / biofilm	Nettoyage	Pst primaire	Antimicro.	Par groupe	Chimiothér.	Radiothér.	Corticoïdes	antibio
<b>Spécificité</b>	-	-	+/-	-	-	?	-	-
<b>Tendance</b>		+		+				

### 3.4 L'impact clinique et sur les symptômes

Rappelons qu'aucun épisode d'infection avérée (avec des signes locaux et généraux) n'a été relevé chez les 32 patients pendant la durée des évaluations (42 jours). Nous considérons donc que la notion

de risque infectieux lié à la présence de biofilm est présente, sans pouvoir en évaluer les conséquences, ou situer ce risque dans une notion de temps.

Aucun biofilm n'a été observé sur les prélèvements exploitables des 4 plaies qui ont cicatrisé (ou se sont partiellement épidermisées) en cours d'évaluation. Curieusement, 50% des échantillons n'ont pas été exploitables dans ce groupe, alors qu'ils n'étaient que 12,5% sur l'ensemble des prélèvements réalisés sur les 28 autres patients. Cela pourrait être lié au fait que les plaies soient moins humides et même parfois croûteuses en fin de cicatrisation ou à trop petit volume d'échantillon en raison du peu de matière à prélever sur les zones pré-cicatrisées.

Dans cette étude le biofilm n'a pas été caractérisé dans le but d'en étudier l'impact sur le processus de cicatrisation, puisqu'il s'agit de plaies tumorales pour la plupart évolutives. Le biofilm reste néanmoins reconnu comme étant un facteur de retard de cicatrisation, et l'absence de biofilm chez ces 4 patientes est donc concordante.

Même en absence d'épisode infectieux, l'analyse de l'impact du biofilm sur les différents symptômes des plaies est essentielle, tant pour en évaluer les conséquences, qu'à visée diagnostique. En croisant les 66 résultats avec les variables relatives aux odeurs, exsudats, saignements spontanés et douleur, aucune différence significative (ni tendance) n'a pu être mise en évidence selon qu'il y ait ou non présence de biofilm.

En revanche, nous notons une tendance ( $p = 0,06$ ) avec les saignements provoqués, dans le sens où il y aurait moins de saignements provoqués lorsqu'il y a présence de biofilm (Tableau 38). Ce résultat était inattendu, ce type de saignement étant connu et lié à la grande friabilité du bourgeon tumoral lors du retrait du pansement. Mais il est possible d'imaginer qu'un enduit, fut-il bactérien et minime, protège un peu le bourgeon en contact direct avec le pansement.

Tableau 38 : résultats des saignements provoqués / biofilm

	Biofilm 0	Biofilm 1	Total
<b>Absence de saignements provoqués</b>	11 (25,6%)	11 (47,8%)	22 (33,3%)
<b>Saignements provoqués</b>	32 (74,4%)	12 (52,2%)	44 (66,7%)
<b>Total</b>	<b>43</b>	<b>23</b>	<b>66</b>

Dans cette étude, excepté pour les saignements, la présence de biofilm ne semble donc pas modifier les symptômes cliniques, ni positivement (réduction), ni négativement (aggravation) selon les critères évalués et fréquemment utilisés en pratique clinique.

Devant ce constat, nous pouvons nous interroger sur les résultats du croisement de la notion de biofilm avec celle de « colonisation critique ». En effet, il y a significativement plus de biofilm quand l'évaluateur a coché positivement cet item lors des évaluations cliniques ( $p = 0,02$ ), à l'instar de ce qui avait été observé lors de l'analyse microbiologique où 67% des plaies définies en état de « colonisation critique » avaient au moins une bactérie en quantité  $> 10^5$  (Tableaux 31 et 39)

Tableau 39 : résultats du croisement des données liées à la présence de biofilm / colonisation critique

	Colonisation critique = 0	Colonisation critique = 1	Total
<b>Biofilm = 0</b>	24 (80%)	19 (52%)	43 (65,2%)
<b>Biofilm = 1</b>	6 (20%)	17 (47,2%)	23 (34,8%)
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>36</b>	<b>66</b>
			<b>p = 0,02</b>

Tableau 40 : récapitulatif biofilm / impact clinique et symptômes

Données / biofilm	Odeurs	Exsudat	Douleur	Saignement provoqué	Saignement spontané	Colonisation critique
<b>Spécificité</b>	-	-	-	-	-	+
<b>Tendance</b>				+		

### 3.5 Schéma de l'évolution de la flore bactérienne et du biofilm

Le schéma proposé après l'analyse des résultats microbiologiques peut être complété de la façon suivante (Schéma 2), même si les conditions d'apparition et de rupture du biofilm n'ont pas été éclaircies par ces résultats.

L'organisation des bactéries en mode biofilm est élevée (35% dans cette étude). Le fait de ne pas avoir d'outil diagnostic et de critères d'évolution clinique ne fait que majorer la notion de risque. En effet, le biofilm apparaît à travers ces résultats comme une organisation parallèle, presque indifférente à l'hôte, les soins et les traitements.

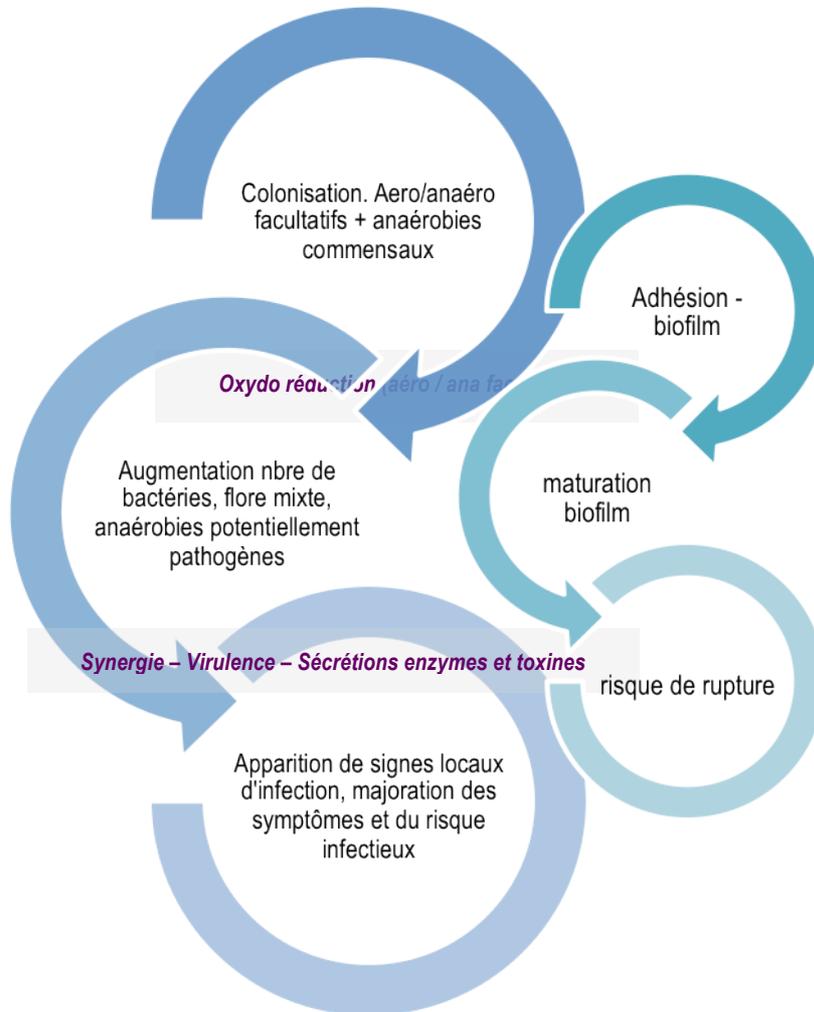
L'hypothèse d'une notion de « biofilm protecteur » [Wilson M 2001, Seven L 2004] ne semble pas pouvoir être retenue ici puisque si le biofilm n'a pas été impacté par l'augmentation du nombre d'espèces de bactéries ou leur quantité sur les plaies, il ne semble pas, à l'inverse, avoir influé et modéré l'évolution de cette colonisation polymicrobienne.

Schéma 3 : évolution de la flore bactérienne et du biofilm des plaies tumorales du sein

**Risque de rupture  
d'équilibre/ infection**



- plaie tumorale
- chronicité
- ischémie
- immunodépression
- biofilm



**4. Les odeurs et composés volatils**

**4.1 Résultats de l'enquête de perception sensorielle**

32 volontaires de l'Institut Curie ont accepté de participer à une enquête de perception sensorielle sur les bactéries odorantes : 28 femmes et 4 hommes, âgés de 26 à 60 ans (médiane : 41,5). 16% d'entre eux étaient fumeurs.

Tableau 41 : répartition professionnelle des volontaires à l'étude de perception sensorielle

Infirmières	Médecins	Aides Soignants	Autres
14 (43,75%)	12 (37,50%)	2 (6,25%)	4 (12,50%)

Huit bactéries ont été sélectionnées par les techniciennes du laboratoire de microbiologie, parmi celles prélevées sur les plaies tumorales du sein des 25 premiers patients inclus dans l'étude, sur le critère unique d'être odorantes (Tableau 42). Ces 8 bactéries étaient présentes à des pourcentages variables sur les plaies.

Tableau 42 : identification des 8 bactéries sélectionnées pour l'enquête de perception sensorielle

Souche N°	Bactéries	% (moyen) sur les 3 prélèvements
1	<i>Escherichia coli</i>	24%
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42%
3	<i>Alcaligenes faecalis</i>	7%
4	<i>Proteus mirabilis</i>	29%
5	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	5%
6	<i>Acinetobacter baumannii</i>	< 4%
7	<i>Porphyromonas asacharolytica</i>	19%
8	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	22%

Dans l'analyse des résultats, on observe une nette différence entre les souches 1, 2, 3 décrites comme fortement « végétales », mais aussi « urineuses », et les souches 4, 5, 6, 8 décrites comme « cadavériques ». La souche 7 se démarque des autres car davantage « excrémentielle ».

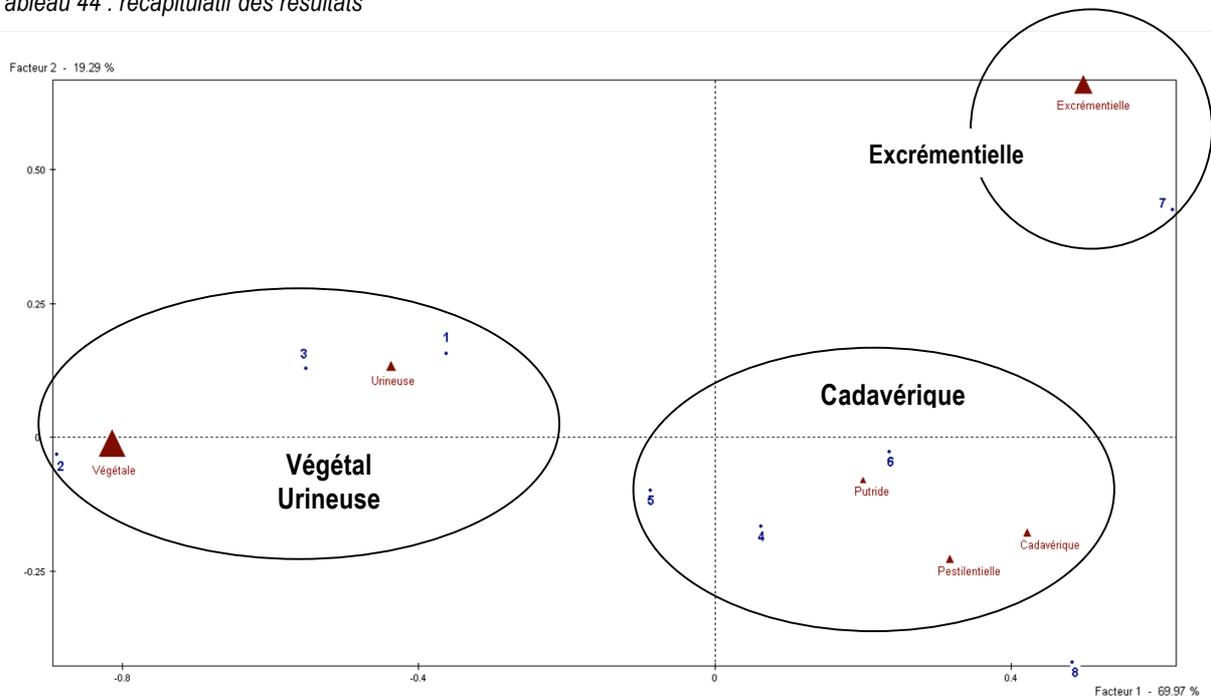
La catégorie "végétale" (souche 1, 2 et 3) est assez large. Si on se rapporte aux commentaires libres proposés aux volontaires, en les regroupant : la souche 1 (*E. coli*) a été aussi qualifiée par des termes tels que "levure de boulanger - pain" ; la souche 2 (*Ps. Aeruginosa*) par des termes "sucrés-douçâtres", et la souche 3 (*A. faecalis*) par des termes "fruités-acides".

L'intensité (sur une échelle de 0 à 7) semble en rapport avec le caractère désagréable de chacune de ces odeurs (Tableau 43)

Tableau 43 : intensité des odeurs selon les bactéries

Intensité (médiane)	2	3	4	5	6	7
bactéries	<i>Ps aeruginosa</i>	<i>A. faecalis</i> , <i>E. coli</i>	<i>St lugdunensis</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>F. necrophorum</i> , <i>P. asacharolytica</i>

Tableau 44 : récapitulatif des résultats



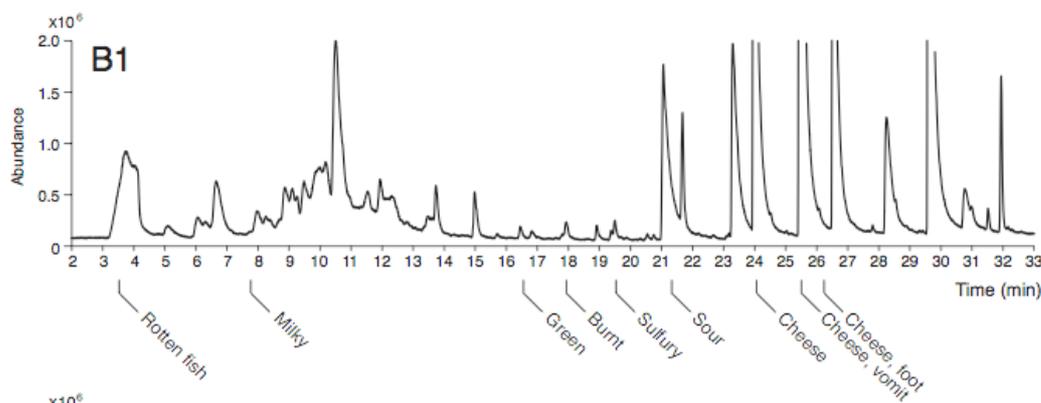
Le caractère extrêmement malodorant des anaérobies strictes est connu [Dubreuil L. 2003] et concorde avec cette enquête, dont les résultats diffèrent cependant de ceux de l'étude clinique dans laquelle, parmi ces 8 bactéries, seul *P. mirabilis* est significativement corrélé à la présence d'odeur. Cette différence (Tableau 45) pourrait être liée à la mixité des composés volatils odorants émanant d'une même plaie, à leur concentration, ou encore à un nombre trop restreint de prélèvements microbiologiques.

Tableau 45 : exemple de *F. necrophorum*, non spécifiquement lié à l'odeur dans l'étude clinique et ressenti avec une intensité forte et une odeur désagréable dans l'enquête de perception sensorielle

	Odeur 0 (absence)	Odeur 1 (faible, moyenne, forte)
<b>FUSOBACTERIUM NECROPHORUM</b>		<b>p=0.7538</b>
Eval N°1	3 (27, 27%)	1 (25%)
Eval N°2	6 (54, 55%)	1 (25%)
Eval N°3	2 (18, 18%)	2 (50%)

Une seule publication décrit les composés odorants de trois plaies tumorales du sein et deux plaies tumorales de cancer ORL malodorantes [Shirasu M. 2009]. Les analyses ont été faites par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse et un olfactomètre (Sniffer9000 system).

Chromatogramme : total des résultats des prélèvements issus de plaies tumorales du sein :



Les pics caractéristiques d'odeurs de fromage, fromage/vomi, fromage/pied sont importants, liés à la présence d'acide carboxylique (ex : acide acétique) et d'esters (ex : acide isovalérique). Ces résultats semblent concorder avec ceux de l'enquête. En effet, quand il avait été demandé aux volontaires de rapprocher et hiérarchiser chaque odeur selon les 4 termes « fromage, vomi, pieds, poisson pourri », le fromage a bien souvent été désigné en premier, suivi des odeurs de pieds ou de vomi. (Tableau 46) Il est à noter que les participants ont cependant eu des difficultés à répondre à cette question, estimant que certaines souches ne pouvaient être associées à ces 4 odeurs.

Tableau 46 : rapprochement d'odeur / souche

N°	1	2	3	4	5	6	7	8
Souche								
Fromage	2	1	1	1	2	2	1	1
Vomi	3	3	2	3	3	4	2	2
Pied	1	2	3	2	1	3	3	3
Poisson pourri	4	4	4	4	4	1	4	4

A la fin de chaque questionnaire était demandé aux participants si l'odeur ressemblait typiquement à celle d'une plaie tumorale (en oui / non). (Tableau 47)

Tableau 47 : % typicité / échantillon

N°	1	2	3	4	5	6	7	8
Souche								
Oui	12%	14%	27%	67%	44%	62%	62%	55%

*Proteus mirabilis* est la bactérie dont le résultat de typicité est le plus élevé, ce qui rejoint cette fois les résultats de l'étude clinique où la présence de *P. mirabilis* était significativement liée à la présence d'odeur, isolement ( $p = 0,001$ ), mais aussi lorsqu'associé à une bactérie anaérobie stricte ( $p=0,04$ ).

Au-delà des résultats chiffrés, il semble important de souligner le caractère extrêmement particulier de l'enquête (réalisée sur 1 journée) qui a demandé un véritable effort aux participants (Photo 18) afin de :

- 1) « sniffer » les 8 échantillons malgré la répulsion que provoquaient certains d'entre eux,
- 2) décrire les odeurs,
- 3) contenir la crainte irrationnelle de tomber malade après le jour de l'enquête.

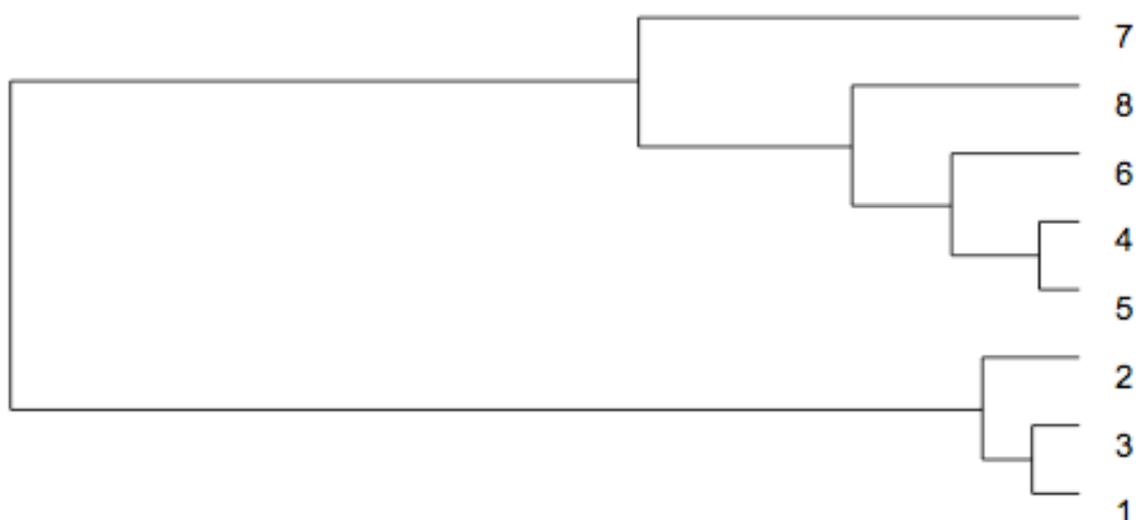
Photo 18 : groupe de volontaires – le jour de l'enquête (26/02/2012):



Les résultats de cette enquête, résumés par la classification hiérarchique (Schéma 4) présentée ci-dessous permettent :

- 1) de soulever des premières pistes de réflexion avant d'aborder l'analyse des composés volatils émanant des pansements usagers, réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (SPME), et qui sera dans un deuxième temps croisée avec les résultats cliniques et microbiologiques,
- 2) de s'interroger sur l'impact direct de certains COV sur le comportement des patients et des soignants par le biais d'autres enquêtes, en collaboration avec l'Unité de Psycho-Oncologie.

Schéma 4 : classification hiérarchique directe des odeurs des échantillons de 1 à 8



#### 4.2 Les composés volatils (COVs)

Des échantillons de pansements primaires usagés (en contact avec la plaie) ont été récupérés lors des évaluations de l'ensemble des 32 patientes, excepté si les pansements avaient dû être imbibés d'eau

pour en permettre le retrait ou s'il y avait eu des saignements importants. Soixante deux échantillons ont de ce fait pu être exploités et analysés par chromatographie en phase gazeuse permettant de retrouver 91 composés volatils odorants différents.

L'analyse de ces COVs peut être abordée de différentes façons :

- 1) tenter d'identifier les composés volatils susceptibles de majorer les odeurs, dans le but de proposer d'éventuelles solutions thérapeutiques (contrôle des symptômes),
- 2) étudier les interactions COVs / microbiologie (bactéries circulantes et biofilm) afin de mieux comprendre d'éventuels mécanismes d'équilibre de la flore,
- 3) réfléchir sur l'intérêt de l'utilisation des COVs comme un biomarqueur potentiel d'infection ou d'évolutivité tumorale.

Dans tout les cas, ce travail est préliminaire. Il n'est que l'ébauche de premiers résultats permettant quelques hypothèses montrant la complexité à analyser les composés volatils. Il y a par ailleurs peu de références concernant les COVs liés aux plaies dans la littérature. En effet, les composés volatils sont difficiles à caractériser du fait du grand nombre de substances chimiques présentes, des variations de structure d'une molécule et sa traduction en odeur, ainsi que les variations de concentration influençant la perception de l'odeur. Les obstacles à la normalisation des techniques de prélèvements et d'analyses sont également une difficulté supplémentaire. .

Les questions relatives à l'odeur mériteraient sans doute d'être complétées par des études qualitatives, prenant en compte les aspects cognitifs et linguistiques.

#### 4.2 A Composés volatils et odeurs

Nous avons tout d'abord classé les composés volatils selon l'intensité de l'odeur (0= absence, 1 : faible, 2 : modéré) relevé lors de l'étude clinique, lors des prélèvements d'échantillons, afin d'identifier ceux qui étaient les plus fréquemment retrouvés et / ou associés à une présence d'odeur (Tableau 48). Sur les 62 échantillons, 16 correspondaient à des plaies non odorantes, 28 à des plaies faiblement odorantes et 18 à des plaies dont l'odeur était considérée comme modérée.

Nous n'avons pas pris en compte les pics d'intensité, car ils sont dépendants de l'imprégnation du pansement (inégalement d'un échantillon à l'autre), de la fibre utilisée pour l'extraction, et sensibles à l'intervalle de temps entre la décongélation et l'analyse.

*Tableau 48 : nombre et % de composés volatils sur 62 échantillons, classés selon l'intensité de l'odeur*

<b>Composés</b>	<b>Odeur 0 (aucune)</b>	<b>Odeur 1 (faible)</b>	<b>Odeur 2 (modérée)</b>	<b>Odeurs caractéristiques *</b>
<b>Aldéhyde</b>				
2-méthylbutanal	1 (2%)	4 (6%)	1 (2%)	Plaisante
3-méthylbutanal	7 (11%)	12 (19%)	13 (21%)	Chocolat, fromage rance, odeur étouffante
Nonanal	1 (2%)	-	-	
Hexanal, 2-ethyl-	-	1 (2%)	-	Légère
<b>Acide carboxylique</b>				
Acide acétique	-	1 (2%)	1 (2%)	Forte, d'œuf / fromage
Acide butyrique (butanoic acid)	2 (3%)	2 (3%)	1 (2%)	Beurre rance, parmesan, contenu gastrique
Acide 2-methyl butanoïque	2 (3%)	4 (6%)	6 (10%)	Forte de fromage (Roquefort, chèvre)
Acide isovalérique (acide 3-methyl butanoïc)	3 (5%)	5 (8%)	6 (10%)	Forte de fromage (chèvre)
Acide pentanoïque, 4-methyl-	3% (2)	4 (6%)	7 (11%)	Fromage
Acide pentanoïque (acide valérique)	-	-	1 (2%)	Fromage
Acide propanoïque	-	-	1 (2%)	Produits laitiers
<b>Amide</b>				
Formamide, N,N-diméthyl-	-	1 (2%)	-	Poisson
<b>Amine</b>				
Triméthylamine	-	1 (2%)	1 (2%)	Poisson, ammoniac
1-Butanamine, 3-methyl-N-	-	1 (2%)	-	Poisson
<b>Esters</b>				
2-ethylhexylbenzoate	2 (3%)	1 (2%)	-	Ether
Acétate de butyle	2 (3%)	-	-	Ethérée
Acide benzoïque, 2-ethylhexyl ester	1 (2%)	2 (3%)	-	Ethérée
Acide butanethioïque, S-methyl ester	-	2 (3%)	-	Fromage
Acide butanoïque, 3-methyl-, 2-methylpropyl ester	-	1 (2%)	-	Fruitée (pomme)
Acide butanoïque, 3-methyl-, 3-methylbutyl ester	-	2 (3%)	-	Fruitée
Acétate d'éthyle	1 (2%)	-	-	Fruitée, éther
Acide carbamodithioïque, diethyl-, methyl ester	1 (2%)	3 (5%)	3 (5%)	
Acide hexadecanoïque, methyl ester	2 (3%)	-	-	
Acide acétique éthényle ester	-	2 (3%)	-	Fruitée, âcre, irritante
<b>Indole</b>				
Indole	9 (15%)	20 (32%)	16 (26%)	Matière fécale.
1H-indole, 3 methyl	1 (2%)	-	1 (2%)	Matière fécale
Dihydro-2-(3H)-thiophenone	2 (3%)	-	1 (2%)	
<b>Organo-sulfuré</b>				
Diméthyle sulfure (DMS)	-	-	1 (2%)	Chou
Diméthyle disulfure (DMDS)	5 (8%)	13 (21%)	16 (26%)	Ail
Diméthyle Pentasulfure	2 (3%)	1 (2%)	1 (2%)	
Diméthyle trisulfure (DMTS)	5 (8%)	10 (16%)	10 (16%)	Ail
Diméthyle Tetrasulfure	-	3 (5%)	-	Œuf, oignon, d'ail
Dioxyde de soufre	-	1 (2%)	2 (3%)	Suffocante
Disulfure de carbone	4 (6%)	9 (15%)	6 (10%)	Œuf pourri, répugnant
2,4-Dithiapentane	-	-	2 (3%)	Truffe, ail, moutarde
<b>Cétone</b>				
2, 3-butanedione (diacétyle)	1 (2%)	-	-	Fromage, transpiration fermentée (pieds)
Ethanone, 1-(2-aminophenyl)-	-	-	1 (2%)	Raisin
2-Heptanone	1 (2%)	10 (16%)	3 (5%)	Fruitée, piquante, pomme, banane
2-Heptanone, 6-methyl-	-	1 (2%)	-	Camphre

2-Heptanone, 5-methyl-	-	1 (2%)	-	
2-Undecanone	1 (2%)	4 (6%)	3 (5%)	Fleur, pomme
2 - tridecanone	-	1 (2%)	4 (6%)	Champignon, noix de coco
2-nanonone	2 (3%)	9 (15%)	7 (11%)	Pied, rose, thé, pomme, fromage, noix de coco
2-Piperidinone	-	-	3 (5%)	Ammoniacal, poivre
Benzophénone	1 (2%)	3 (5%)	2 (3%)	Odeur balsamique
2-Butanone	1 (2%)	7 (11%)	7 (11%)	Piquante, caramel
2-Butanone, 3-hydroxy- (acetoin)	3 (5%)	1 (2%)	1 (2%)	Beurre rance, produits laitiers, sucrée
Butyrolactone	-	1 (2%)	-	Beurre rance
Cyclohexanone	-	1 (2%)	-	Acétone
Mercaptoacétone	1 (2%)	6 (10%)	6 (10%)	Poulet
Methyl isobutyl cétone	2 (3%)	-	-	Fruitée
4'-(2-Methylpropyl) acetophénone	-	1 (2%)	-	
2-Hexanone, 5-methyl- (isobutylacétone)	-	3 (5%)	-	Fruitée
2-Hexanone, 4-methyl-	-	-	1 (2%)	
2-Pentanone	1 (2%)	4 (6%)	5 (8%)	Acétone
2-pentanone, 4-hydroxy-4-methyl	-	1 (2%)	-	
3-penten-2-one, 4-methyl	-	1 (2%)	-	Miel
2-propanone, 1-hydroxy	-	1 (2%)	-	
<b>Alcool</b>				
3 methylbutanol 1 (alcool isoamylique)	6 (10%)	16%	6 (10%)	Empyreumatique (vin), fromage, forte odeur d'alcool
Méthyl 3 butanol 1, acétate	1 (2%)	1 (2%)	2 (3%)	Banane, fruitée
1-Hexanol, 2-ethyl-	3 (5%)	2 (3%)	1 (2%)	Moisie (enfermé)
Ethanol	1 (2%)	1 (2%)	-	
Alcool phénéthylrique	4 (6%)	2 (3%)	3 (5%)	Rose, fruitée avec nuance de miel
Phenyl acetaldehyde	2 (3%)	-	-	Florale (jacinthe)
2-Propanol, 1-ethoxy-	-	1 (2%)	-	Douce
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- (Linalool)	-	1 (2%)	-	Florale, citron, orange
Alcool benzylrique	-	-	1 (2%)	Plaisante
2-nonanol	-	-	1 (2%)	Fruitée, concombre
Phénol (hydrobenzene)	3 (5%)	11 (18%)	15 (24%)	Goudron
Phénol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)	1 (2%)	2 (3%)	1 (2%)	
Phénol, 4-methyl	2 (3%)	6 (10%)	8 (13%)	Phénol, goudron
<b>Hydrocarbures, Benzène, Alcane</b>				
Benzène, 1,4-dichloro-	1 (2%)	-	-	Naphtaline, pénétrante
Benzène, 1,3-bis (1,1-dimethylethyl)	1 (2%)	4 (6%)	-	
Benzaldéhyde	1 (2%)	3 (5%)	3 (5%)	Amande amère
Benzèneacetaldehyde	1 (2%)	-	-	Sucrée, miel, rose
Benzène, 4-diisocyanato-1-methyl	3 (5%)	5 (8%)	-	Forte, fuitée, sucrée
2H-Benzimidazole-dihydro-5-methyl	2 (3%)	3 (5%)	-	
Benzène, 1-ethyl-4-(2-methylpropyl)-	-	2 (3%)	-	
Butylhydroxytoluène (BHT)	7 (11%)	3 (5%)	1 (2%)	Type phénol
Toluène (methylbenzène)	-	1 (2%)	-	Benzène
Heptane, 2, 2, 4, 6,6-pentamethyl	8 (13%)	10 (16%)	4 (6%)	Légère odeur d'essence
4-tetramethyloctane	1 (2%)	1 (2%)	2 (3%)	Légère odeur d'essence
Cyclohexane, methyl-	1 (2%)	-	-	Pétrole
Cyclopentan	1 (2%)	-	-	
2, 2, 4,4-tetramethyloctane	-	1 (2%)	-	
<b>Divers</b>				
Cinéole (eucalyptol)	-	1 (2%)	-	Rafraîchissante, épicée de camphre
Benzenepropanoic acid, ethyl ester (Ethyl benzenepropanoate)	-	1 (2%)	-	Plaisante, fruitée, sucrée

Oxime-methoxy-phenyl	-	2 (3%)	1 (2%)	
1- méthyl éthyl 2-méthyl-2-butenoate	-	-	1 (2%)	Menthe
Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy)- (carbitol)	-	1 (2%)	2 (3%)	Douce, agréable

\* [www.pherobase.com](http://www.pherobase.com), [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org), National Toxicology Program, Luis JR Barron, Yolanda Redondo, Mikel Aramburu, *Journal of the Science of food and agriculture*, 1660-1671 (2005)

Les 10 composés volatils les plus fréquemment retrouvés sont par ordre décroissant: l'indole (73%); le diméthyle disulfure (DMDS) (55%); le 3-méthylbutanal (51%); le phénol (47%); le diméthyle trisulfure (DMTS) (39%); le 3-méthylbutanol (36%); l'heptane, 2, 2, 4, 6,6-pentaméthyl- (35%); le disulfure de carbone (31%); 2-nanonone (29%); phénol, 4-méthyl (26%).

Afin d'étudier le lien entre les composés volatils et les odeurs nous avons croisé les données relatives aux odeurs avec la présence des différents COVs > 5% dans au moins un des groupes d'odeurs. Les résultats montrent une différence significative (test de Fisher  $p < 0,05$ ) sur l'odeur (divisée en 2 groupes : gr 0 : absente, gr 1 : faible, modérée, intense) pour 3 composés volatils :

- liés à l'apparition d'odeur: DMDS ( $p=0,04$ ), phénol ( $p=0,01$ )
- associés à une notion de non-odeur: butylhydroxytoluène (BHT) ( $p=0,04$ )

D'autres composés volatils semblent être attachés à cette notion de non-odeur comme ceux caractérisés par une odeur éthérée. A l'inverse, des COVs ont une tendance à augmenter les odeurs tels que des cétones types 2-Heptanone ( $p=0,09$ ), 2-Butanone ( $P=0,08$ ) (exception : acetoin) et les composés organo sulfurés (exception : diméthyle pentasulfure)

Rappelons qu'il est difficile de grouper ces composés volatils structurellement car souvent, des molécules de structure similaire ont des odeurs qui se ressemblent, mais dans certains cas, de petites modifications structurales peuvent entraîner des perceptions olfactives totalement différentes [U.J Meierhenrich 2005].

Nous avons comparé ces résultats avec ceux obtenus sur des bouillons de culture (BHI, BTS) de souches de bactéries désignées comme liées à la présence d'odeurs dans l'étude clinique et l'enquête de perception sensorielle (Tableau 49), c'est à dire:

- Les 3 bactéries identifiées isolément comme responsables d'odeurs dans l'étude microbiologique : *P. Mirabilis*, *P. magnus*, *C. Striatum*

- 1 bactérie avec une intensité forte et une typicité élevée dans l'enquête de perception sensorielle : *F. necrophorum*.

Trois autres bactéries avaient une intensité et typicité élevée : *P. mirabilis* (déjà pris en compte), *P. asaccharolytica* mais sa culture en bouillon (BHI) n'a pas été possible, *A. baumannii* qui n'a pas été mis en culture car sa présence était < 4% dans les prélèvements de l'étude.

- Une association de 2 bactéries malodorantes (*P. mirabilis* et *F. necrophorum*) faisant partie des 10 bactéries les plus isolées dans les résultats microbiologiques et qui semblaient entraîner des effets synergiques.

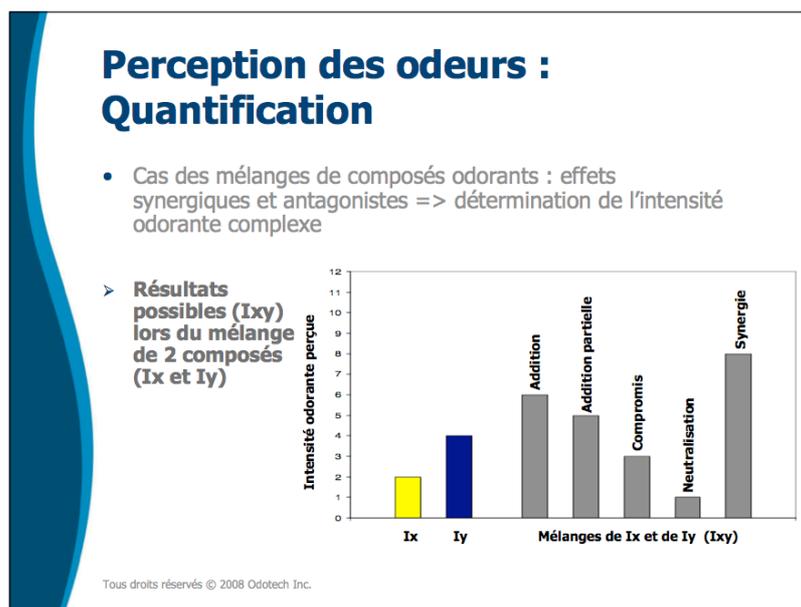
Tableau 49 : COVs après mise en culture de *P. mirabilis*, *P. magnus*, *C. striatum*, *F. necrophorum*, *P.mirabilis* et *F. necrophorum*

Composés	<i>P. mir</i>	<i>C. stri</i>	<i>P. mag</i>	<i>F. necr</i>	<i>P.m et F.n</i>
Acide 2-méthyl butanoïque					+
Acide isovalérique		+			+
Acide butyrique				+	
Indole	+	+		+	+
Diméthyle disulfure (DMDS)	+			+	+
Diméthyle trisulfure (DMTS)	+			+	+
Mercaptoacétone				+	
3 Méthylbutanol	+		+		+
Alcool phénéthylrique	+				+
Phénol (hydrobenzène)				+	+

NB : 5 COVs ont été identifiés alors qu'ils n'apparaissent pas dans les échantillons de pansements usagers, sans doute car à trop faibles concentrations : 1-propanol, 3-(méthylthio)- (méthionole) ; Tétrachloroéthylène ; Pyrazine, 2, 5—diméthyl ; Pyrazine, 3-éthyl-2, 5-diméthyl- ; 1-Butanol

Nous retrouvons dans ces échantillons 2 COVs liés à l'odeur (DMDS, Phénol) dans les cultures de *P. mirabilis* et *F. necrophorum*. Les COVs identifiés dans les cultures respectives de *P. mirabilis* et *F. necrophorum* ne sont pas exactement les mêmes que lorsqu'ils ont été mis en culture ensemble. Ce phénomène d'effets synergiques ou antagonistes entre composés odorants est connu (Diapositive 1) et pourrait expliquer au moins partiellement la difficulté à identifier les composés volatils (isolés ou par groupe) auxquels les odeurs sont imputables. Une fois encore, nous sommes en présence de phénomènes dynamiques et interactifs.

Diapositive 1 : Extraite d'une session de formation à la métrologie des odeurs (2008). Par T. Pagé, président et co-fondateur de Odotech.



Il nous a paru important de s'assurer que ces résultats n'étaient pas liés au fait que différentes souches d'une même bactérie puissent libérer des composés volatils différents. Pour ce faire, nous avons analysé de nouveaux bouillons de culture de *P. mirabilis* avec 3 souches de bactéries prélevées sur différentes plaies tumorales du sein. (Tableau 50)

Tableau 50 : composés volatils émanant de cultures de 3 souches différentes de *P. mirabilis*

Composés	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Odeurs 2
3-methyl Butanal	+	+	+	21%
2-butanone, 3 hydroxy	+			2%
Diméthyle disulfure (DMDS)	+	+	+	26%
Diméthyle trisulfure (DMTS)	+		+	16%
Benzèneacétaldéhyde	+	+	+	-
Benzaldéhyde		+		5%
2-tridecanone	+		+	6%
3 Méthylbutanol	+	+	+	10%
Alcool phénéthylrique			+	5%

Les composés volatils retrouvés sont relativement similaires même si nous notons des différences selon les souches. Deux composés volatils sont présents sur ces 3 échantillons, ainsi que sur celui analysé initialement : le DMDS et le 1-Butanol, 3-méthyl.

D'autres COVs sont présents dans 3 échantillons sur 4 tels que que le DMTS et le Butanal, 3 méthyl.

Même si seul le DMDS est spécifiquement lié à la présence d'odeur, il nous a paru important de s'interroger également sur le DMTS, car ces deux COVs sont souvent décrit pour leurs odeurs particulièrement déplaisantes [Son HK 2003, Schulz S. 2007, Statheropoulos M 2007]. Leur seuil de détection est très bas. De plus, Shirasu M et al (2009) ont associé le caractère dérangeant des odeurs des plaies tumorales à la présence de DMTS dans leur étude sur 5 plaies tumorales (nez et sein).

Nous remarquons que dans notre étude, dans 88% des cas, le DMTS est caractérisé en présence de DMDS. Aussi avons-nous croisé l'association DMDS + DMTS à la présence d'odeur sur l'ensemble des échantillons. Mais les résultats n'étaient pas significatifs ( $p > 1$ ).

Était également évoqué par Shirasu M et al le fait que le DMTS puisse être produit par des bactéries anaérobies strictes ou par *P. aeruginosa*. Nous avons donc réalisé de nouveaux bouillons de culture (BHI, BTS) avec des souches de : *P. aeruginosa*, une association de 4 bactéries (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. faecalis*, *B. fragilis*) afin de reproduire une flore mixte, et une souche d'*E.coli* car fréquemment suspecté d'induire des odeurs (Tableau 51)

Tableau 51 : composés volatils émanants de cultures de bactéries spécifiques

Composés	<i>P aer</i>	<i>E.coli</i>	X 4
Acide isovalérique			+
Indole	+	+	
Diméthyle disulfure (DMDS)			+
2-nanonone		+	
Alcool phénéthylrique			+
3 Méthylbutanol	+	+	+

NB : 3 COVs ont été identifiés alors qu'ils n'apparaissent pas dans les échantillons de pansements usagers, sans doute car à trop faibles concentrations : Ethanone, 1-(2-aminophenyl) ; Tetrachloroethylene ; Thiocyanic acid, methyl ester

Nous n'avons pas retrouvé de DMTS sur ces souches et notamment dans celles avec *P. aeruginosa*. Par contre, il y a présence de DMDS dans la culture associant 4 bactéries.

Aussi avons-nous décidé de croiser la présence de DMDS, mais aussi de Phénol et BHT avec les 10 bactéries les plus fréquemment retrouvées dans les prélèvements de l'étude, sur les évaluations réunissant des résultats microbiologiques complets (bactéries aérobies et anaérobies) et l'identification des composés volatils, soit 47 évaluations.

A la lecture des résultats, une seule bactérie est significativement liée à la présence de DMDS : *B. fragilis* ( $p=0,01$ ) et deux autres montrent une tendance : *F. necrophorum* et *P. asaccharolytica* ( $p=0,09$ ). Ces trois germes sont des bactéries anaérobies strictes.

Aucune des 10 bactéries n'était par ailleurs significativement liée à la présence de phénol ou BHT. Le BHT pourrait ne pas être lié à un métabolisme bactérien mais à un topique appliqué sur la plaie ou la peau péri lésionnelle puisque ce composé est souvent associé à la formulation de crèmes ou gels. (Thomas A. 2010, Lanigan RS 2002).

Par ailleurs, il est probable que l'odeur ne soit pas liée à un seul composé, mais à l'association de plusieurs d'entre eux, certains pouvant être détectés (présence d'odeur) même à très faible concentration et / ou reconnu à des concentrations variables (ex : le diméthylsulfure a un seuil de reconnaissance à 0.001 ppm, alors que le thiophénol à un seuil de reconnaissance à 0.28 ppm). Aussi avons-nous observé plus simplement si le nombre de composés volatils par échantillon évoluait avec l'intensité de l'odeur.

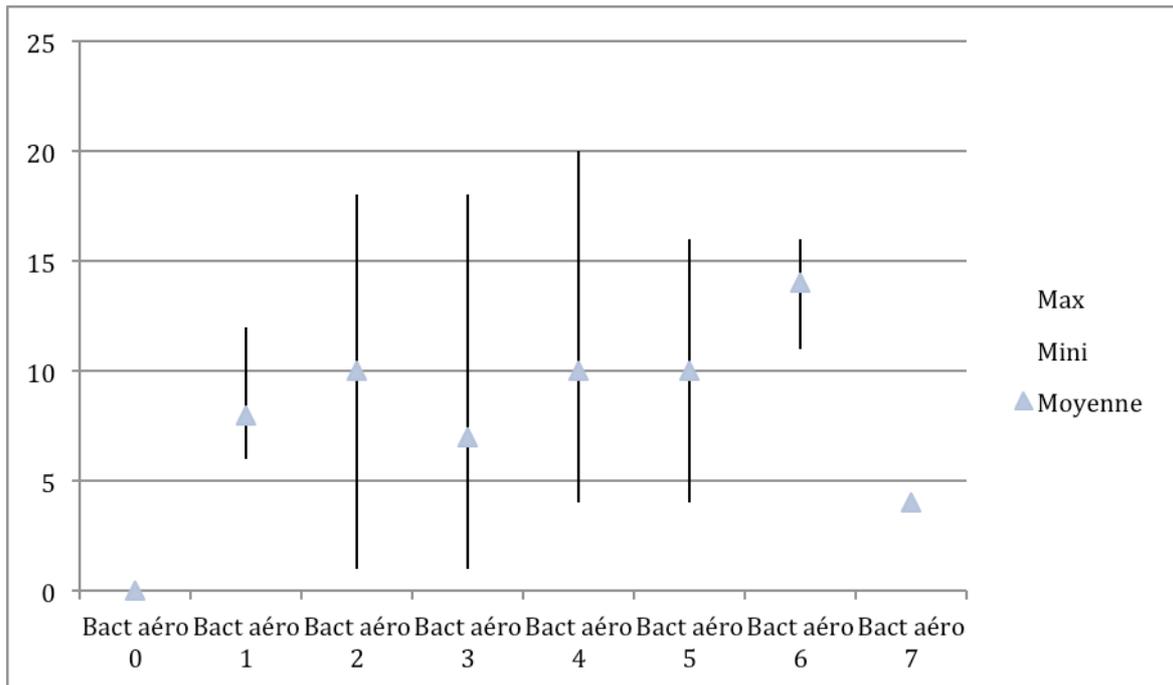
Les échantillons non odorants avaient une moyenne de 7 composés volatils par prélèvements (range : 1 ; 15), ceux avec une odeur faible avaient une moyenne de 9 composés volatils par prélèvement (range 1 ; 15) et ceux avec une odeur modérée une moyenne de 11 composés volatiles par prélèvement (range : 5 ; 20), en faveur d'une augmentation linéaire des odeurs et du nombre de différents COV. (Tableau 52)

*Tableau 52: moyenne du nombre de COV / prélèvement selon l'intensité de l'odeur*

	Odeur 0	Odeur 1	Odeur 2
<b>Moyenne du nombre de composés volatils / échantillon</b>	7	9	11

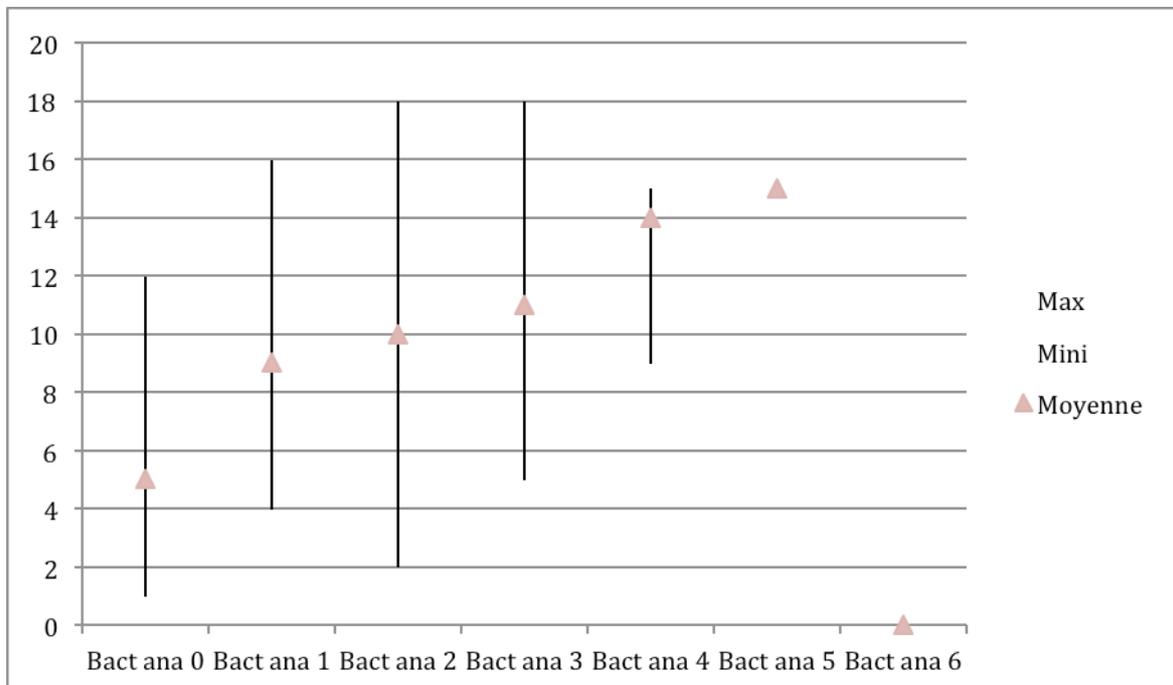
Puis, nous avons cherché si le nombre de bactéries aérobies ou anaérobies strictes retrouvées sur les prélèvements des plaies des 25 premiers patients de l'étude influençait le nombre de composés volatils présents dans les échantillons (Tableaux 53 - 54).

Tableau 53 : nombre minimum, maximum et moyenne des COVs selon le nombre de bactéries aérobies et aéro-anaérobies



Il ne semble pas avoir de lien entre le nombre de bactéries aéro et aéro-anaérobies et celui des composés volatils.

Tableau 54 : nombre minimum, maximum et moyenne des COV selon le nombre de bactéries anaérobies strictes



Par contre, le nombre de composés volatils par échantillon semble augmenter avec le nombre de bactéries anaérobies strictes. Ce qui laisse supposer qu'une réduction du nombre des bactéries anaérobies permettrait de réduire la présence d'odeur, en corrélation avec les résultats de l'étude microbiologique (Tableau 24).

#### 4.2 B Les composés volatils : de potentiels biomarqueurs ?

Utiliser les COVs en tant que biomarqueurs est une idée séduisante car elle repose sur des techniques de prélèvements non invasives. Les composés volatils peuvent être en effet retrouvés et analysés sur une grande variété d'échantillons : la peau (sébum, transpiration), l'air expiré, les urines, la salive, le lait maternel, les plaies, etc. Le corps humain émet des COVs liés à son processus endogène propre (ex : phéromones), mais aussi après absorption de contaminant extérieur (ex : aliments) et par l'intermédiaire du métabolisme bactérien (ex : odeurs d'aisselles). Des paramètres tels que l'origine ethnique, le sexe, le régime alimentaire modifient les COVs [Thomas A. 2010, Shirasu M 2011]. L'identification de composés volatils susceptibles d'être utilisés comme marqueurs d'une pathologie ciblée sur une population hétérogène semble extrêmement complexe, du fait de cette grande variabilité et de la difficulté déjà évoquée à mettre au point un processus de normalisation des procédures de prélèvement et d'analyse.

La méthodologie mise en place pour notre étude avait pour but de corréler l'intensité de l'odeur à des composés volatils et ne permet donc pas de travailler précisément sur une notion de biomarqueur. Par contre, nos résultats peuvent être lus comparativement aux travaux déjà publiés, et faire l'objet d'une réflexion sur l'intérêt diagnostique du développement de biomarqueurs.

Dans des travaux destinés à chercher comment diagnostiquer plus rapidement l'origine d'une infection par chromatographie en phase gazeuse et liquide, Philips et al (1976) et Ladas et al (1979) concluent que la détection d'acide propionique, isobutyrique, butyrique ou isovalérique (acides carboxyliques) met en évidence la présence d'une infection à germe anaérobie (sans différencier l'infection de la colonisation). Edson RS et al (1982) tempèrent ces résultats en trouvant une corrélation de 88% entre la présence de bactéries anaérobies strictes et celle d'acide butyrique ou isovalérique.

Nous avons donc recherché si ces quatre différents composés volatils étaient retrouvés sur nos échantillons réunissant des résultats microbiologiques complets (bactéries aérobies et anaérobies) et l'identification des composés volatils (soit 47) afin de voir s'ils étaient en effet corrélés

systématiquement à une colonisation des plaies par des bactéries anaérobies. Seule la présence d'acide butyrique et isovalérique a été retrouvée (Tableau 55)

Tableau 55 : nombre d'échantillons avec acide butyrique ou isovalérique / présence de bactéries anaérobies

	Echantillons Avec bactéries anaérobies	Echantillons Absence bactéries anaérobies	total
Acide butyrique ou isovalérique	9	2	11
Absence acide butyrique ou isovalérique	24	12	36
total	33	14	47

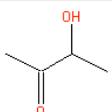
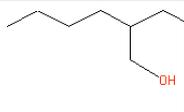
Dans notre étude, rien ne permet de lier la présence de ces composés volatils à celle de bactéries anaérobies. Mais peut-être ces résultats auraient-ils été différents en cas d'infection avérée.

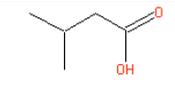
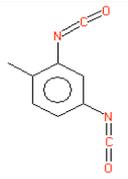
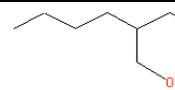
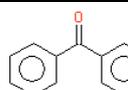
Nous notons tout de même qu'en absence de bactéries anaérobies, la présence de ces deux composés volatils semble exceptionnelle. Cependant, de l'acide isovalérique a été détecté dans les analyses de *C. striatum* (Tableau 30) qui est une bactérie aérobie.

Nous nous sommes intéressés aux 2 échantillons issus d'une plaie non colonisée par des bactéries anaérobies mais avec présence d'acide isovalérique. Car ces échantillons ont été recueillis chez une même patiente (Tableau 56).

Cette patiente était également la seule des 32 patientes à n'avoir été colonisée que par 1 seule bactérie aérobie (*S. aureus* à  $10^3$ ) durant les 42 jours d'évaluation. Une stabilité déjà étonnante pour une plaie avec une ancienneté de 8 mois le jour de l'inclusion.

Tableau 56 : Patiente 1, éval N°3, *S. aureus*  $10^3$ , biofilm caractérisé: identification des composés volatils de l'échantillon

Fibre CAR PDMS 2 (flacon 1)			Fibre PA 2 (flacon 2)		
Temps de rétention (min)	Composé	Formule chimique	Temps de rétention (min)	Composé	Formule chimique
8.380	2-Butanone, 3-hydroxy-		14.907	1-Hexanol, 2-ethyl-	

10.902	Butanoic acid, 3-methyl-		20.247	Benzene, 2,4-diisocyanato-1-methyl-	
14.842	1-Hexanol, 2-ethyl-		24.123	Benzophenone	

Du biofilm a été caractérisé aux 2 évaluations où l'acide isovalérique a été retrouvé. La présence de slime avait d'ailleurs été suspectée cliniquement par l'évaluateur lors des évaluations.

L'ensemble de ces éléments peut nous laisser supposer (avec prudence, puisqu'un seul cas) :

- 1) une relation entre le biofilm et la présence de ce composé volatil,
- 2) que des bactéries anaérobies n'ont pas été identifiées,
- 3) que ce composé volatil est indépendant du métabolisme bactérien, ou uniquement lié à *S. aureus*

Lors des évaluations, d'autres échantillons ont été prélevés par écouvillonnage, conservés dans une solution qui stabilise l'ARN (RNAlater™) et congelés à - 80°C afin de permettre la réalisation d'analyses métagénomiques qui permettra de répondre dans l'avenir à au moins l'une de ces hypothèses.

Concernant le biofilm, nous avons comparé la répartition des différents composés volatils dans les groupes avec ou sans biofilm. Mais aucune différence n'était observable.

Cependant, plusieurs publications évoquent que les composés volatils agiraient sur le système de communication inter-bactérienne et qu'ils impacteraient la formation (ou l'inhibition) du biofilm (Ryan RP 2008, Kai M 2009), ce qui semble être une perspective de travail intéressante, tant d'un point de vue diagnostic que thérapeutique.

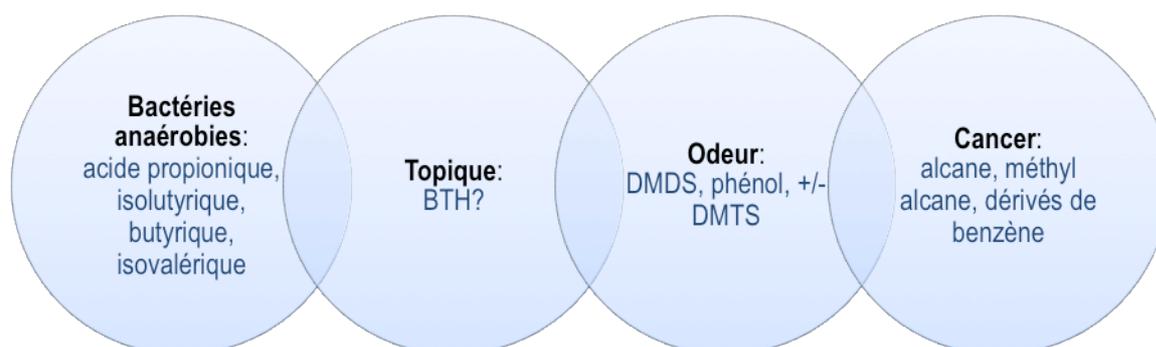
D'autres travaux à visée diagnostic ont été réalisés sur les composés volatils retrouvés dans l'air expiré des patientes atteintes de cancer du sein. Une étude pilote conclue que les alcanes et méthyl alcanes pourraient être de potentiels biomarqueurs du cancer du sein. Leur production serait liée à un phénomène de stress oxydatif [Philips M. 2003].

Cela pourrait expliquer la présence d'Heptane 2,2,4,6,6-pentaméthyl- dans les 10 COVs les plus fréquemment retrouvés dans nos échantillons, bien que ce composé volatil soit également décrit comme marqueur de la tuberculose [Philips M. 2007].

### 4.3. Schémas relatifs aux COVs

L'étude et l'exploitation des connaissances des composés volatils sont complexes car les COVs sont nombreux, interagissent entre eux, et sont sensibles aux variations intrinsèques et extrinsèques de chaque individu. Les progrès effectués avec les techniques de chromatographie, parfois couplées avec d'autres technologies telles que les nez électroniques, permettent déjà de trouver des solutions dans l'environnement (ex : dépollution, attraction ou répulsion d'insectes), ou de cibler progressivement des COVs à des situations médicales particulières (ex : pathologies, odeur).

Nous avons regroupé sur un schéma les hypothèses liant des COVs à des situations cliniques intéressant les plaies tumorales du sein :



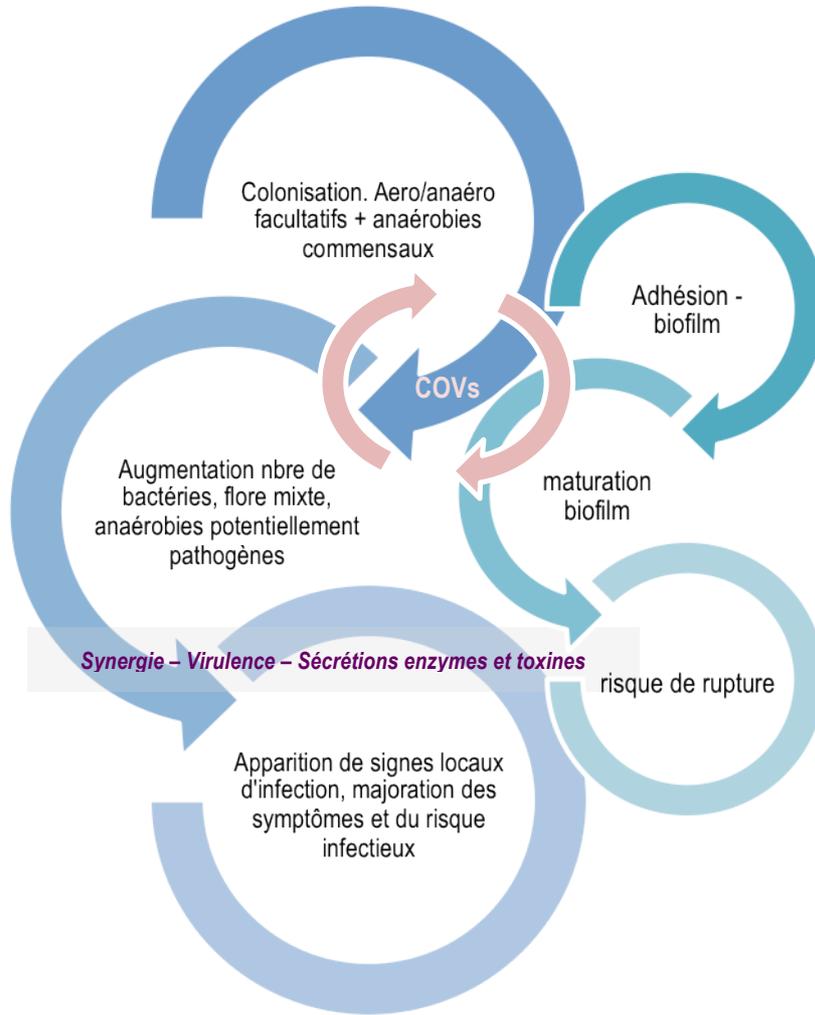
Puis nous avons fait évoluer le schéma initial sur l'évolution de la flore bactérienne et du biofilm en y ajoutant les composés volatils bactériens (Schéma 5)

Schéma 5 : évolution de la flore bactérienne et du biofilm et des composés volatils des plaies tumorales du sein

**Risque de rupture  
d'équilibre/ infection**



- plaie tumorale
- chronicité
- ischémie
- immunodépression
- biofilm



## **PARTIE 4**

### **DISCUSSION DES RESULTATS / CONCLUSION / PERSPECTIVES**

Un nombre important de données a été recueilli lors de ce travail malgré les limitations liées au recrutement et à la réalisation de prélèvements potentiellement traumatiques et répétés. Les résultats acquis nous permettent, grâce à leur analyse poussée, de formuler des hypothèses, perspectives, et proposition d'adaptation des pratiques.

## **1. Risque infectieux**

L'évaluation du risque infectieux des plaies tumorales du sein aurait nécessité une comparaison entre deux groupes de plaies : colonisées *versus* infectées. Une étude sur une cohorte de malades plus importante sur une plus longue période aurait sans doute permis de recueillir des informations lors d'épisodes infectieux, tout en sachant qu'une période d'évaluation plus longue risquait d'augmenter le nombre de sortie prématuré de l'essai, déjà élevé.

Huit mois après la fin de l'étude, 27 des 32 patientes incluses sont décédées, ce qui souligne le stade avancé de leur maladie et l'effort consenti pour se soumettre aux impératifs d'un protocole de recherche clinique (ex : rendez-vous fixes, prélèvements) lors de cette période toute particulière de la vie. Le protocole n'a pas été proposé à toutes les patientes suivies pour des plaies tumorales du sein pour des raisons d'anxiété majeure, de douleur non contrôlée ou d'éloignement géographique incompatibles avec l'inclusion dans l'étude.

Cependant, les données recueillies, originales par rapport aux études antérieures, permettent déjà une analyse.

Notre réflexion débute sur l'absence d'épisode infectieux malgré la grande fragilité des patients, la présence de plaies de taille relativement importante, colonisées par des bactéries et associées dans 35% des cas à la présence de biofilm. Ce constat amène à nous arrêter sur la notion « d'équilibre » avant d'évoquer celle du risque infectieux.

### **1.1 Equilibre et diagnostic du microbiote et du biofilm**

#### **1.1. A Résultats et analyse des pratiques cliniques**

La présence d'une flore mixte sur les plaies chroniques est déjà connue et documentée. Cette colonisation polymicrobienne, a priori sans impact sur l'évolution de la plaie, justifie les pratiques de soins en vigueur. En absence de signes infectieux, les plaies chroniques sont lavées au sérum physiologique ou à l'eau pour en ôter les souillures. Les éventuels dépôts nécrotiques sont retirés. Des

pansements drainants et absorbants sont appliqués si la plaie exsude. L'ensemble de ces mesures vise à conserver la plaie propre, à réduire la charge bactérienne par des actions mécaniques. Les soins ne sont pas réalisés stérilement, excepté en cas de risque infectieux élevé (liés à l'hôte, la plaie ou l'environnement). En France, la sécurité sociale a d'ailleurs dé-reboursé les compresses stériles sur les indications de soins destinés au traitement des plaies chroniques en 2010 [Arrêté du 16 juillet 2010]

La prédominance de certaines bactéries comme *S. aureus*, *P. aeruginosa* et les entérobactéries a été observée dans de nombreuses études. Des différences avec les résultats présentés dans notre travail doivent tout de même être soulignées :

- par rapport aux résultats décrits par Rotimi VO et Durosinmi-Etti FA (1984) sur 70 plaies tumorales dont 30 du sein. Dans cette étude, les *Bactéroïdes* et *E.coli* prédominent, avec un nombre plus important de bactéries anaérobies que de bactéries aérobies. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que les prélèvements aient été réalisés majoritairement par écouvillonnages (superficiels), sur des sites variés (ex : génitaux, tête et cou, thorax), dans une population très différente de celle traitée dans notre établissement (Lagos, Nigeria) et sans notion d'ancienneté.
- comparativement à une étude plus récente sur l'efficacité du miel par rapport au pansement à l'argent sur 67 patients porteurs de plaies tumorales, dont 53 au niveau du sein [B. Lund-Nielsen 2011]. Dans cette étude, les prélèvements ont été effectués par écouvillonnages avec analyse des germes aérobies et anaérobies (sans quantification). Vingt-cinq différentes espèces bactériennes ont été détectées avec une colonisation de 1 à 4 différents germes pathogènes sur les plaies (médiane = 2). *S. aureus* était la bactérie la plus fréquemment isolée (42%), suivi des entérobactéries (34%) de Streptocoque hémolytique (16%) et *P. aeruginosa* (10%). Les bactéries anaérobies strictes étaient présentes dans 16% des prélèvements, avec des espèces sensiblement différentes à celles retrouvées dans notre étude : *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella* et *Peptostreptococcus*. Ces différences peuvent être liées au mode de prélèvements et à l'absence de stratification des résultats en fonction du site de la plaie.
- par rapport à l'ulcère de jambe et au mal perforant plantaire où la présence de *S. epidermidis* est beaucoup plus élevée [Wheat, LJ 1986, Hansson C 1988].

- par rapport aux escarres où les germes de la flore fécale sont en plus grand nombre. (*P. mirabilis*, *E. coli*, *Enterococcus* spp), car ces plaies se développent majoritairement au niveau du sacrum et / ou chez des patients alités et parfois incontinents [Bowler PG 2001].

De façon générale, les bactéries anaérobies les plus souvent isolées dans les prélèvements d'ulcères, d'escarres et de plaies du pied diabétique sont *Peptostreptococcus*, *Bacteroides* et *Prevotella*. [Silver S. 2006]. Ces résultats peuvent être critiquables en fonction du mode de prélèvement (écouvillonnage ou biopsie) et du temps de transport au laboratoire d'analyse. En effet, ces trois bactéries peuvent survivre plusieurs jours en présence d'air contrairement à d'autres bactéries anaérobies. Elles peuvent donc être isolées sur de nombreux types de prélèvements.

Dans notre étude, une bonne coordination avec le laboratoire de microbiologie a permis un acheminement des échantillons et un traitement sitôt les prélèvements réalisés, et ce dans des délais très courts. Le choix de prélever à la curette, moins traumatique qu'une biopsie, nous a permis d'avoir des échantillons semi-profonds. Ces précautions ont été prises afin de garantir la qualité des résultats, dans un contexte clinique difficile.

L'équilibre entre la présence de plaies ouvertes et une flore polymicrobienne est parfois étonnante, ce qui explique que les plaies chroniques aient été bien longtemps traitées quotidiennement et de façon quasi systématique par des applications d'antimicrobiens. L'évolution des pratiques de soins vers une utilisation raisonnée de ces produits est liée à: 1) l'évolution des connaissances du processus de cicatrisation qui a abouti au développement de pansements favorisant la cicatrisation en milieu humide, suite aux travaux de Winter en 1962 [Winter GD. 1962], 2) l'apparition de résistances bactériennes aux antibiotiques et à la mise en évidence qu'une utilisation prolongée de certains antiseptiques pouvaient générer un retard de la cicatrisation, 3) l'émergence de réactions d'intolérance aux antiseptiques et antibiotiques (eczéma de contact, allergie, irritations) [Barbaud A 2009]. Dès lors, la notion de préservation d'un équilibre tripartite entre la flore bactérienne, l'hôte et les effets secondaires des traitements s'est imposée, bien qu'elle ne soit pas encore admise par l'ensemble des professionnels de santé.

La colonisation bactérienne des plaies chroniques ne doit pas pour autant être réduite à un état de fait. Elle peut être à l'origine de l'apparition de symptômes et de développement de biofilm, susceptibles d'altérer les capacités du patient à cicatriser, provoquer des inconforts, ou évoluer vers l'infection. L'estimation d'une prévalence supérieure à 900 000 individus porteurs de plaies chroniques en France

nous motive à nous interroger sur la pertinence de nos pratiques, notamment par rapport à de nouvelles notions telles que celles de biofilm.

En effet, peut-être que les critères diagnostiques de surveillance de la colonisation (essentiellement cliniques) nous amènent à conclure que la colonisation est encore dans un état d'équilibre alors que cet équilibre est déjà compromis par la présence de certaines bactéries ou que des bactéries se sont organisées en mode biofilm, sans que des symptômes évocateurs puissent être détectés par l'œil du clinicien. Rappelons que le biofilm n'est pas visible sauf s'il est mature et que les prélèvements microbiologiques les plus fréquemment prescrits, par écouvillonnages, n'apportent qu'une information partielle (bactéries aérobies, sans quantification) [Fromantin I 2009]. Cette hypothèse nous conduit à nous demander si nous ne réagissons pas trop tardivement, dans certaines situations, alors qu'un risque infectieux est déjà installé.

### 1.2. B Surveillance et diagnostic

Les résultats de notre étude ont montré que lorsque l'évaluateur avait coché l'item « colonisation critique » il y avait significativement plus de biofilm ou une bactérie en quantité supérieure à  $10^5$  germes dans le prélèvement, sans que la présence de biofilm n'ait pu être corrélée aux signes cliniques listés dans le cahier de recueil de données et représentatif d'une évaluation clinique standard (surface, topographie, couleur, exsudats, odeur, douleur, saignements). Cela signifie que l'évaluateur aurait basé son jugement sur d'autres informations, dont il n'a peut-être pas ou peu eu conscience, tel qu'une réduction des saignements provoqués en présence de biofilm.

Une analyse qualitative auprès de cliniciens expérimentés dans le traitement des plaies permettrait peut-être de définir plus précisément ces éléments diagnostiques (ex : présence de slime visible, d'un aspect particulier du tissu de bourgeonnement). Une fois définis, ces critères cliniques devraient faire l'objet d'une nouvelle étude évaluant leur sensibilité et spécificité comparativement à des résultats obtenus après analyse d'échantillons de plaies en laboratoire.

La mise au point d'outils diagnostiques capables de détecter de façon simple et rapide la présence de biofilm, une charge bactérienne trop élevée, ou d'identifier l'ensemble des bactéries serait nécessaire. Pour les bactéries circulantes, des outils comme la PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérase en chaîne) permet la détection de très faible quantité de bactéries mais restent bien trop coûteux pour une utilisation fréquente et sur un grand nombre. Par contre, la commercialisation récente du WoundCheck® Protease Status, test destiné à détecter une activité protéasique élevée sur la plaie,

semble avoir renforcé l'idée que la conception d'outils diagnostiques simples pour évaluer et traiter des plaies chroniques avait toute sa place, en complément de la clinique.

Ces travaux permettraient de faire évoluer l'actuel débat sur le diagnostic clinique du biofilm qui divise les experts et a d'ailleurs fait l'objet d'échanges de points de vue contradictoires dans des revues spécialisées telles que le Journal of Wound Care, certains affirmant qu'un diagnostic clinique est possible et d'autres non [Cowan T. 2012, Hurlow J. 2012, White RJ. 2012]. Ces débats prouvent à eux seuls que la question est difficile. Or, étant donnée l'estimation d'une prévalence élevée de biofilm, il semble important que le diagnostic clinique ne soit pas dépendant du degré d'expertise de l'évaluateur mais puisse être réalisé par tout professionnel susceptible de prendre en charge un patient porteur de plaie chronique.

L'absence de possibilité de diagnostic interfère avec deux autres problématiques : les niveaux de preuve et les traitements locaux. En effet, à ce jour, les connaissances sur le biofilm des plaies *in vivo* sont limitées par la complexité à caractériser la présence de biofilm en dehors de projets de recherche tels que celui présenté ici. Les hypothèses restent au moins aussi nombreuses que les certitudes. Il est donc délicat de donner des indications claires, de savoir quand et comment traiter un biofilm. Pour cette même raison, il est difficile pour les industriels qui ont développé des solutions anti-biofilms (ex : Prontosan®, Iodosorb®) de mener à bien des projets de recherche clinique offrant un niveau de preuves suffisant. Cela se répercute par l'impossibilité à obtenir le remboursement de leurs produits, et un intérêt moindre de la part des cliniciens.

Le contexte socio-économique peut sembler très éloigné de ce travail de recherche. Il est pourtant une problématique omniprésente dès lors qu'il s'agit de plaies chroniques. Car, dans tous les cas, ces plaies touchent une population particulièrement vulnérable à laquelle il n'est pas possible de prescrire sur une longue période des produits non remboursés. Il diminue aussi l'intérêt des industriels à développer des innovations, difficulté majorée dès lors qu'il s'agit de plaies tumorales dont la prévalence est basse comparativement aux autres plaies chroniques [Meaume S. 2010].

Aussi, bien que le National Institute of Health (USA) ait annoncé que 80% des infections bactériennes pourraient être liées au biofilm, la conjonction des difficultés à collecter des données et analyser des échantillons dans un contexte économique délicat, retarde la mise en place de solutions concrètes [Ammons CB 2010].

### 1.2. C. Adaptation des pratiques cliniques

Observée sous un angle plus global, cette notion d'équilibre microbiologique des plaies chroniques, n'est donc pas simple à gérer tant du point de vue diagnostique et thérapeutique, que scientifique, épidémiologique et économique. Différentes attitudes cliniques semblent pouvoir d'ores et déjà être adoptées suite aux résultats de ce travail et à l'analyse de la littérature.

En absence de signes infectieux, sur une plaie chronique non tumorale dont la cicatrisation est attendue, les mesures d'hygiène (nettoyage, détersion, drainage) et de contrôle de l'humidité doivent être réalisés, conjointement à une prise en charge plus générale visant à corriger les facteurs de retard de cicatrisation. En cas d'épisodes infectieux récurrents ou d'arrêt du processus de cicatrisation malgré une prise en charge adaptée, la présence de biofilm peut-être suspectée, même en absence de slime visible. Dans ce cas, une détersion quotidienne du lit de la plaie, associée à l'application d'antimicrobien doit être réalisée même si la plaie est macroscopiquement propre, jusqu'à la reprise du processus de cicatrisation. Le protocole ne doit pas excéder deux semaines si des antimicrobiens potentiellement cytotoxiques sont utilisés.

Sur une plaie tumorale ou dont la cicatrisation n'est pas attendue, l'objectif du soin consiste à gérer les symptômes et les risques. Or, nos résultats montrent que les symptômes ne sont pas majorés par la présence de biofilm. Le traitement du biofilm sera donc envisagé selon un principe de gestion du risque, détaillé ultérieurement.

En 2012, maintenir sur une longue période une charge bactérienne réduite grâce à un produit actif qui préviendrait en plus l'apparition de biofilm ne s'inscrit pas dans les pratiques. Elle pourrait être envisagée avec des solutions de nettoyage telle que le Protonsan® ou des pansements dont l'activité antimicrobienne est assurée par un effet mécanique comme le Sorbact®. Le faible niveau de preuve de l'efficacité de ces topiques ne permet cependant pas d'en confirmer l'indication. A terme, la conception de produits non cytotoxiques répondant à ces objectifs pourrait peut-être conserver la plaie dans un état d'équilibre sur une plus longue période.

#### **1.2. Gestion du risque**

En absence d'infection avérée, la gestion du risque infectieux peut être réfléchi à partir des signes cliniques d'infection et des conditions dans lesquelles ils apparaissent.

L'analyse des résultats a permis de mettre en évidence quelques effets de synergie (avec *P mirabilis* et *F necrophorum*). *P mirabilis* est aussi le germe le plus significativement lié à la présence d'odeur, en concordance avec les résultats de l'enquête de perception sensorielle. Pour autant, Il ne semblerait pas cohérent de se focaliser sur cette unique bactérie qui évolue au sein d'une flore polymicrobienne, dont la répartition (germe aérobie / anaérobie) et la charge bactérienne ( $\geq 10^5$ ) impactent également l'expression des symptômes.

La pratique clinique, étayée par la littérature, suffit à conforter ce choix de ne pas cibler une ou des bactéries même si elles présentent des particularités. Nous observons par exemple que les odeurs nauséabondes disparaissent le plus souvent suite à l'administration de métronidazole, alors que cet antibiotique n'agit pas sur *P mirabilis*.

Les résultats obtenus avec *P mirabilis* et *F necrophorum* soulignent par contre que même sur une petite cohorte de patients, il est possible d'identifier des synergies inter bactériennes. Le concept de synergie et d'association se retrouve dans l'analyse des composés volatils où des relations bactéries / composés volatils ont pu être identifiés, mais où l'association de deux bactéries (ou plus) semble pouvoir générer des composés tous autres que ceux associés aux bactéries prises individuellement.

L'étude simultanée du microbiote, du biofilm et des composés volatils à partir d'échantillons de plaies évolutives, dans un univers dynamique, suggère qu'aucun de ces éléments ne peut être dissocié, qu'ils interagissent, s'adaptent et se répondent l'un-l'autre selon des mécanismes et des enchaînements extrêmement complexes. Certains auteurs tels que G. Stotzky avancent même l'hypothèse que les composés volatils émis par les bactéries pourraient à leur tour stimuler ou inhiber des bactéries de la même espèce ou d'espèces différentes [Stotzky G 1976].

Cette vision dynamique et communautaire des bactéries, qu'elles évoluent en mode planctonique ou qu'elles soient organisées en mode biofilm peut expliquer : 1) les décalages entre les résultats d'études réalisées *in vitro*, sur quelques bactéries, et une réalité clinique, 2) la difficulté à évaluer et anticiper le risque infectieux compte tenu du caractère multifactoriel et évolutif de chaque situation, 3) l'importance de traiter à bon escient, en ayant conscience que toute intervention active (antiseptique, antibiotique), même ciblée, risque de perturber un cycle dont on ne maîtrise pas tous les paramètres.

Un des risques infectieux le plus documenté et surveillé est celui de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Il a donc paru important d'amorcer notre réflexion autour de ce problème avant d'aborder

plus globalement la gestion du risque infectieux des plaies tumorales du sein à partir des résultats obtenus.

### 1.2. A. Risques lié aux résistances bactériennes

L'émergence de résistance bactérienne aux antibiotiques (SARM, entérobactéries productrices de Bêta-lactamases à spectre étendu - EBLSE) mobilise depuis des années l'attention des communautés scientifiques impliquées dans la surveillance et la prévention du risque infectieux. Les infections à BMR (bactérie multi résistante) limitent les possibilités thérapeutiques, avec le risque, à terme, de générer des mécanismes de résistance de plus en plus importants. La prescription d'antibiotique est donc devenue plus raisonnée et ciblée afin de limiter la pression de sélection des bactéries aux antibiotiques. De nombreuses actions ont par ailleurs été mises en place pour limiter les transmissions.

Les patients porteurs de plaies chroniques sont identifiés comme étant un groupe à haut risque de portage et transmission de BMR (Bactéries Multi Résistantes). Le premier cas de *S. aureus* résistant à la vancomycine a d'ailleurs été isolé sur une plaie chronique en 2002 aux USA [Howell-Jones R.S 2005]

En théorie, des BMR devraient être fréquemment isolés sur les plaies tumorales puisqu'elles sont portées par des patients traités depuis longtemps (72% de métastases cutanées), immunodéprimés, susceptibles d'avoir reçu des traitements antibiotiques répétés et hospitalisés itérativement. Pourtant une seule patiente était porteuse de BMR dans l'étude.

En observant de façon prospective les résultats des prélèvements bactériologiques des 50 patients porteurs de plaies chroniques prélevés avant la mise en place de l'étude par l'unité P&C en 2010 (40 plaies tumorales de toutes localisations / 10 plaies non tumorales): SARM a été isolé sur 40% des plaies non tumorales (escarres, ulcères), et 5% seulement sur les plaies tumorales, à colonisation équivalente à *S. aureus* (> 80%). Dans l'étude comparative réalisée par Lund-Nielsen et al sur 67 plaies tumorales, aucune d'entre elles n'étaient colonisée par SARM même si 46% des plaies étaient colonisées par *S aureus* [B. Lund-Nielsen 2011].

Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées :

- Les plaies tumorales sont des masses dont la vascularisation est modifiée, le plus souvent ischémique et dont l'épaisseur peut excéder plusieurs centimètres. Aussi est-il suggéré que la

diffusion locale d'antibiotique administré par voie générale serait faible, ce qui réduirait la pression de sélection des bactéries aux antibiotiques [Ammons CB 2010]. Mais cette hypothèse peut être contredite par le fait que le métronidazole, antibiotique fréquemment prescrit pour traiter les odeurs des plaies tumorales, soit actif tant après administration locale que par voie générale [Ashford RFU. 1980, Seaman 2006].

- Les bactéries seraient dans un état particulier, spécifique à ce type de plaie.
- La réduction progressive de l'incidence et de la prévalence des SARM observée en France depuis les années 2000 expliquerait qu'aucun des 32 patients de l'étude n'ait été porteur de ce type de germe. Mais ce serait sans prendre en compte que la réduction du nombre de SARM diverge avec la progression d'autres BMR telles que l'EBSLE [Desenclos JC 2006]. Or aucune de ces bactéries n'a été retrouvée dans nos échantillons.

Etant donné le faible nombre de patients inclus dans l'étude, le fait qu'une patiente ait été porteuse de BMR ainsi que l'absence d'explications scientifiques justifiant que les bactéries des plaies tumorales réagiraient différemment que les bactéries retrouvées sur les autres types de plaies, la prudence quant au risque de pression de sélection des bactéries aux antibiotiques doit rester une priorité. Les prescriptions d'antibiotiques doivent être évitées en absence d'infection avérée.

Si une antibiothérapie est indispensable pour gérer un symptôme, il semble recommandé de l'administrer pendant des périodes courtes (7 à 10 jours) et de la cibler sur les bactéries en cause. En concordance avec la littérature, le métronidazole est donc indiqué si des odeurs persistent malgré des soins locaux appropriés puisqu'il est actif sur les germes anaérobies qui semblent impacter ce symptôme. Mais cet antibiotique agirait aussi indirectement sur les bactéries anaérobies facultatives et pourrait donc de modifier le microbiote de la plaie au-delà des bactéries anaérobies strictes [Ingham HR. 1977].

La notion déjà évoqué d'interactions (virulence, synergie, potentiel redox) dans un environnement changeant tant localement que sur un plan général nous impose la vigilance. Les bénéfices immédiats et à court terme obtenus par une intervention ciblée doivent être pondérés par la prise en compte du caractère chronique des plaies qui impose une gestion du risque sur un plus long terme, réfléchi au cas par cas.

L'hypothèse selon laquelle les bactéries ne développeraient pas de mécanismes de résistance sur les plaies tumorales est intéressante et étonnante. Si cette hypothèse se vérifiait, cela pourrait impacter les choix thérapeutiques, le risque infectieux, et peut-être même le biofilm.

Avec la collaboration de microbiologistes, un travail serait à envisager à partir de nouveaux échantillons ou des souches bactériennes conservées au laboratoire de microbiologie.

Par ailleurs, il est prévu dans le protocole déposé au Bénin de prélever non seulement des UB, mais aussi des plaies tumorales du sein. Le comparatif entre les résultats microbiologiques de plaies similaires, dans des contextes d'antibio-résistance certainement différents en France et au Bénin pourrait là aussi faire évoluer nos réflexions.

### 1.2 B. Résultats et analyse du risque infectieux lié aux bactéries planctoniques

Le risque infectieux, qu'il soit local ou général, est abordé différemment sur la plaie tumorale et sur les autres plaies chroniques. En absence de réponse du patient aux traitements anti-cancéreux, la plaie tumorale ne peut pas cicatriser. Le risque de retard de cicatrisation consécutif à une charge bactérienne locale trop importante n'est donc pas l'élément prioritaire qui motive la mise en place d'un traitement. Par contre, la majoration des symptômes est un paramètre essentiel car il se répercute sur le confort des patients et peut être annonciateur d'une infection.

Sur une lésion tumorale, il est difficile de différencier si la fluctuation de l'intensité des symptômes est liée à l'évolution de la maladie, aux bactéries, aux traitements ou à l'association de l'ensemble de ces éléments. Aux interactions entre les bactéries, l'hôte et l'environnement, s'ajoute la problématique du cancer, des soins et choix thérapeutiques en fin de vie.

Dans nos résultats, en concordance avec la littérature, la présence de bactéries anaérobies semble retentir sur l'intensité des symptômes [Dabras H 2005, Bowler PG 1999]. La prolifération de ces bactéries sur la plaie tumorale s'explique notamment par le fait que la tumeur favorise la formation de tissus ischémiques, superficiels ou profonds.

Différentes stratégies peuvent être mises en place ou envisagées :

- 1) L'administration de métronidazole, sachant que l'utilisation de cet antibiotique ne peut être systématisée et proposée sur une longue période en raison : du risque potentiel de pression de sélection aux antibiotiques, du retentissement sur l'équilibre de la flore bactérienne, des interactions avec d'autres molécules et des éventuels effets secondaires [Dictionnaire Vidal 2012].

2) L'apport local d'oxygène (O<sub>2</sub>) qui pourrait être théoriquement efficace.

- L'oxygénothérapie hyperbare (HBOT) est utilisée pour le traitement des plaies. Elle impose des séances répétées en caisson, sous surveillance médicale. Moins de 40 sites (civils ou militaires) disposent de caissons en France métropolitaine. Les contraintes du traitement par rapport aux bénéfices éventuels ne permettent pas de retenir cette option thérapeutique pour les patients porteurs de plaies tumorales (Photo 19)
- Le traitement local par oxygène (Topical Oxygen Therapy - TOT) a été développé aux USA et au Canada sur le même principe que l'HBOT. Il consiste en un apport d'O<sub>2</sub> directement sur la plaie, par des séances quotidiennes, quatre jours sur sept, à répéter jusqu'à cicatrisation complète. Il peut être réalisé dans une chambre conventionnelle (Photo 20).

Mais comme l'HBOT, le principe de cette thérapie est de stimuler l'angiogénèse pour favoriser la fermeture de la plaie dont les tissus sont mal vascularisés et oxygénés [Heng C.Y 2000]. Or l'angiogénèse anormale d'une tumeur participe justement à son évolution, d'où le développement de traitements anti-cancéreux anti-angiogéniques (ex : Avastin®). Le rapport bénéfice / risque de ce type de thérapies semble donc contre-indiquer leur utilisation sur les plaies tumorales, même si aucune étude ne traite du développement tumorale sous HBOT.

Photo 19 : Caisson de l'Hôpital d'Instruction des Armées Ste Anne



<http://www.medsubhyp.com>.

Photo 20 : Topical Pressurized Oxygen Therapy



<http://www.tsswoundcare.com>

- Les topiques tel que l'Oxozyme® qui est un hydrogel délivrant sur la plaie de l'oxygène dissous et de l'iode (non disponible en France). Une étude sur les plaies diabétiques comparant l'HBOT, la TOT et l'Oxozyme® conclut que l'HBOT et la TOT sont des traitements adjuvants bénéfiques à la cicatrisation mais qu'il serait par contre nécessaire de conduire d'autres études cliniques pour évaluer l'efficacité de l'Oxozyme®. En effet, trop peu de travaux *in vivo* ont été publiés pour apporter les preuves de son efficacité [Thorn RM 2005, Thorn RM 2006]. S'il faisait l'objet d'une étude clinique ciblée sur son action antimicrobienne, il serait nécessaire de le comparer à un autre

pansement iodé afin de discerner les bénéfices de l'O<sub>2</sub> dissous. Quoiqu'il en soit, le concept d'un polymère capable de relarguer localement de l'O<sub>2</sub> reste intéressant.

Le peroxyde d'hydrogène reste le topique « oxygéné » le plus ancien et connu (eau oxygénée). Ce produit est indiqué pour l'antisepsie et l'hémostase de petites plaies superficielles [Dictionnaire Vidal 2012]. En pratique clinique sur la plaie tumorale, l'eau oxygénée permet occasionnellement de gérer les hémorragies de faible abondance. Une utilisation fréquente est prolongée est déconseillée en raison de sa cytotoxicité.

- 3) L'application d'antiseptiques à large spectre actifs sur les bactéries aérobies et sur les bactéries anaérobies. Mais les plaies tumorales sont des masses ulcérées à la peau, dont l'épaisseur peut excéder plusieurs centimètres, parfois abcédées ou recouvertes de nécrose humide dont le débridement n'est pas toujours réalisable. Cette réalité clinique peut expliquer que les topiques aient une efficacité limitée ou variable d'une plaie à l'autre, tant sur les symptômes qu'en cas d'infection locale, puisqu'ils ne sont actifs que sur les germes en surface.

Un produit semble se démarquer des autres par sa capacité à temporiser des situations critiques : le Flammacerium® (association de Sulfadiazine Argentique et Nitrate de Cérium). Une étude clinique actuellement menée en France devrait très prochainement confirmer ou contredire cette impression clinique.

Mais si les germes anaérobies participent activement à l'apparition des symptômes, en règle générale, les septicémies à bactéries anaérobies strictes sont bien moins fréquentes que celles liées à des bactéries aérobies ou aéro-anaérobies (Tableaux 57, 58). A l'institut Curie en 2011, les septicémies étaient liées dans 4% des cas à des germes aérobies strictes, dans 4% des cas à des germes anaérobies stricts, et dans 92% des cas à des bactéries aéro-anaérobies (résultats obtenus après des prélèvements par hémocultures). Une fois de plus, Il semble donc important de ne pas se focaliser uniquement sur une communauté bactérienne, mais sur un ensemble, qui par des mécanismes de synergies et d'interactions, vont exposer le patient à des inconforts ou des risques, locaux ou généraux.

Tableau 57 : Agents pathogènes le plus fréquemment en cause dans les épisodes de bactériémies (en %)

Agents pathogènes	Etat-Unis 1992 - 93	France 1993
<i>S. aureus</i>	18,8%	21,4%
<i>P. aeruginosa</i>	5,6%	3,8%
<i>E. coli</i>	15%	29,2%
Bactéries anaérobies strictes	3,9%	3,2%

D'après Carpentier, JP et al. Bactériémies. EMC (Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris). Maladies Infectieuses, 8-003-S-10, 2001

Tableau 58 : Mortalité des bactériémies en fonction des agents pathogènes (en % et en risque relatif)

Agents pathogènes	Taux de mortalité	Risque relatif
<i>S. aureus</i>	11,9%	2,18
<i>P. aeruginosa</i>	16,7%	3,04
Bactéries anaérobies Gram +	25%	3,65
Bactéries anaérobies Gram -	14,3%	2,61

D'après Carpentier, JP et al. Bactériémies. EMC (Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris). Maladies Infectieuses, 8-003-S-10, 2001.

Cette image dynamique contraste avec l'idée de stabilité de la colonisation bactérienne d'une plaie chronique. Elle souligne qu'à l'apparition de symptômes, le nombre d'espèces ou une charge bactérienne élevée (présence d'une ou plusieurs bactéries  $\geq 10^5/g$ ) ont d'ores et déjà provoqué un déséquilibre. Il paraît alors difficile de revenir à un état initial d'équilibre car : 1) l'utilisation d'antibactériens, qu'elle soit bénéfique ou non, va modifier la flore et créer une nouvelle configuration du microbiote, en limitant son action aux bactéries planctoniques, 2) en absence de possibilité à cicatriser, sur une plaie tumorale, les actions mécaniques peuvent contenir la situation ou l'améliorer transitoirement, mais ont peu de chance de la contrôler en raison de l'évolution de la lésion et du contexte général de la maladie.

Discuter dans ce travail de la notion de seuil de quantité de bactéries par rapport au risque infectieux serait aléatoire étant donné le faible nombre de patients inclus dans l'étude, l'absence d'infection et de références bibliographiques d'une notion de seuil sur les plaies tumorales.

Nos résultats sont en relative concordance avec les données de la littérature, avec l'apparition de symptômes quand une ou des bactéries sont présentes en quantité  $\geq 10^5/g$  ; A la différence que ces symptômes n'ont pas provoqué d'infection même s'ils en sont des signes précurseurs, et qu'il n'est pas possible d'en évaluer l'impact sur la cicatrisation [Bendy RH 1964, Breidenbach WC 1995].

Ce chiffre conforte par contre l'idée qu'une charge bactérienne trop élevée est délétère et que le patient est davantage exposé lors de périodes identifiées à risque, comme les périodes d'aplasie.

### 1.2. C. Résultats et analyse du risque infectieux lié au biofilm

Selon nos résultats, la présence de biofilm entraîne peu de répercussion clinique sur les plaies tumorales. En absence d'épisode infectieux et de cicatrisation attendue, le biofilm semble être une communauté relativement silencieuse. Dans ce contexte, la motivation à tenter de l'ôter est préventive,

dans l'objectif d'éviter l'apparition d'une infection ou d'infections récurrentes, qui pourrait survenir dans un laps de temps indéterminé.

Face à une situation palliative, où les symptômes locaux et généraux liés à la présence de la plaie ou de la maladie cancéreuse peuvent être nombreux, la notion de gestion des risques doit être évaluée au cas par cas. Le risque va être pris ou non en fonction de l'évaluation d'une situation globale.

Si la mort est proche, l'objectif prioritaire des soins est le confort du patient, avec des pansements espacés contrôlant tant que possible les odeurs, saignements et fuite d'exsudat. A l'inverse, si le patient reste dans une situation potentiellement curative, sous traitement immunosuppresseur, la prise en compte d'un risque infectieux lié au biofilm peut devenir prioritaire.

Le développement d'une solution active, sans nécessité d'une action mécanique associée (déterSION), dont l'efficacité dans le temps serait contrôlée (> 24h) et compatible ou combinée à des pansements drainants-absorbants, permettrait de traiter l'ensemble des patients, indépendamment du stade de leur maladie. En attendant, même si les résultats de l'étude doivent être exploités avec beaucoup de précautions, l'application de pansement à l'alginate imprégné d'Ag peut être une solution consensuelle à privilégier.

### **1.3 Perspectives**

L'ensemble de ces réflexions autour du risque infectieux renforce l'idée qu'il serait nécessaire de développer des solutions nouvelles, applicables avant même l'apparition de symptômes, efficaces tant sur les bactéries circulantes qu'organisées en mode biofilm.

C'est en se servant de l'expérience acquise pendant cette première étude ciblée sur les plaies tumorales du sein qu'a été entrepris un projet plus ambitieux sur le biofilm des plaies chroniques de tous types. Ce projet, nommé PANSaBIO, est un challenge soutenu par l'ANR (Agence National de la Recherche) dans le cadre de son programme TecSan (Technologie pour la Santé). Piloté par le laboratoire ERRMECe, il a pour objectif de proposer en quatre ans de nouvelles solutions anti-biofilm locales, avec la collaboration de six équipes partenaires (laboratoires de recherche, hôpitaux, industriel). Il comprend une recherche systématique de biofilm sur les différents types de plaies chroniques, une analyse du biofilm, des essais de molécules antibiofilm reposant sur une inhibition du quorum sensing et la déstructuration de la matrice du biofilm, la mise au point d'un pansement dirigé spécifiquement contre le biofilm.

Ce travail, en cours depuis 2011, ne s'arrête pas aux frontières de la France puisqu'il intègre des plaies telles que l'ulcère de buruli (UB). L'UB est un processus pathogène à localisation essentiellement cutanée causé par une mycobactérie (*Mycobacterium ulcerans*). Troisième mycobactériose la plus fréquemment rencontrée chez les sujets immunocompétents après la tuberculose et la lèpre, il est un véritable problème de santé publique estimé comme prioritaire par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) dans les pays émergents (OMS 2004). Il touche principalement les enfants. Le traitement le plus répandu est l'exérèse des lésions, associée à la chirurgie réparatrice et orthopédique. Mais ces thérapeutiques sont longues, coûteuses et donc limitées. *Mycobacterium ulcerans* présente une grande résistance aux antimicrobiens et son habilité à s'organiser en mode biofilm en connue d'où l'intérêt d'intégrer ce type de plaie au projet PANaBIO [Marsollier L. 2007].

Soutenue par la Fondation Raoul Follereau, cette extension de projet a été soumise à l'approbation du Comité d'Ethique du Benin en septembre 2012. Il sera couplé à une étude du potentiel zêta sur les bactéries planctoniques afin d'orienter rapidement le choix des antiseptiques les plus appropriés en cas d'infection, dans des pays où les ressources sont faibles.

## **2. Odeurs et composés volatils**

L'idée de coupler une étude sur les odeurs et les composés volatils à un travail sur le microbiote et le biofilm des plaies tumorales du sein a été envisagée à partir d'un constat clinique, une plainte récurrente des patients. L'objectif initial était d'identifier les composés volatils malodorants afin d'évaluer les possibilités de développement de solutions nouvelles, plus efficaces, qui n'interfèrent pas sur le risque infectieux.

Il est très vite apparu que l'analyse des composés volatils ne pouvait pas être restreinte à une seule réflexion de relation cause à effet entre les COVs et les odeurs ; car ces COVs ont eux-mêmes des fonctions et sont le reflet immédiat du processus métabolique de chaque individu.

Le corps humain émet en un grand nombre de COVs, influencés par l'absorption de contaminants extérieurs, variant selon de multiples paramètres comme le statut hormonal, la nourriture, la présence de bactéries, etc. L'analyse des COVs est de ce fait complexe, mais ouvre des perspectives intéressantes.

### **2. 1. Résultats et analyse de l'impact des odeurs**

Les propriétés répulsives de certains composés volatils sont bien connues puisqu'elles constituent la base de substances employées pour repousser des animaux, mais aussi l'homme. Citons par exemple les « boules puantes », ou le « Malodor » décrié en 2009 pour avoir été utilisé dans le but de déloger des personnes sans domicile fixe (SDF) dans une commune française.

Lors de l'enquête de perception sensorielle, le sentiment de répulsion vis-à-vis de certains échantillons a été exprimé oralement, par des attitudes, ou par écrit avec l'utilisation de mots tels que « caca » ou « dégueulasse », inhabituels de la part de professionnels. Des sensations de malaise, nausées, maux de tête ont aussi été observées chez plusieurs participants.

Cet effet répulsif corrobore les témoignages de patients porteurs de plaies tumorales malodorantes (ex : isolement social, rejet) et les mesures de protection inappropriées prises parfois par les soignants qui accueillent ces patients.

Shirasu M et al associent ce caractère extrêmement dérangeant à la présence de composés volatils organo sulfurés et particulièrement à celle de diméthyl trisulfure (DMTS). Dans notre étude, même si le DMTS fait partie des dix composés volatils les plus fréquemment retrouvés, l'odeur semble d'avantage imputable au DMDS et au Phénol [Shirasu M. 2009].

La production de DMDS et DMTS est fréquemment reportée dans la littérature sur les COVs émis par les corps en décomposition, avec la prédominance de DMDS. L'association entre l'odeur de ces deux composés volatils et l'état cadavérique semble forte. D'ailleurs, la plus grande fleur du monde (*Titan arum*) est aussi nommée « fleur-cadavre » car elle émet également du DMDS et DMTS (Photo 2) [Kite GC 1997, Statheropoulos M 2007]. Dans une étude réalisée en 2008 sur les odeurs des corps inhumés, ces deux COVs font partie des cinq composés qui persistent jusqu'à la décomposition de tous les tissus, ce qui n'est pas le cas des dérivés du benzène, aldéhydes, cétones et alcools associés également à la décomposition des corps, et dont certains sont d'ailleurs communs à ceux retrouvés dans nos échantillons [Vass A. 2008]. Pour rappel, la décomposition d'un corps humain est un processus évolutif (rigidité, putréfaction active, momification, décomposition des os et de la peau). Les composés volatils vont différer selon le cycle de décomposition qui peut se dérouler sur une période plus ou moins longue selon l'environnement dans lequel est conservé le corps.

Photo 21 : Titan arum ou fleur-cadavre



[www.gurumed.org](http://www.gurumed.org)

L'odeur des cadavres est symboliquement forte et a un ancrage culturel important. Citons par exemple l'expression « odeur de sainteté » qui se rapporte au fait que des corps de Saints et martyres se dégageait une bonne odeur, ce qui était assimilé à la pureté de leurs âmes. De nos jours, cette expression s'applique aux personnes qui bénéficient de l'estime de supérieurs et font figure de favoris. Ce phénomène curieux rapporté par les hagiographes et les médecins du Moyen Age est réel mais reste un mystère scientifique, bien qu'il soit sans doute lié à des phénomènes de saponification, associé à des décès après une ascèse, et bien sûr renforcé par un fort pouvoir de suggestion.

Le DMTS et DMDS seraient aussi, avec le méthanthiol, les constituants majeurs de l'odeur fétide et désagréable des matières fécales. Une étude associant de la GC-MS et une analyse de perception sensorielle conclue que le DMTS et le DMDS sont les composés qui induisent le caractère désagréable de l'odeur des selles. L'ensemble des participants n'était pas d'accord sur la typicité de l'odeur fécaloïde de ces composants, mais tous s'accordaient sur leurs caractéristiques fétide et putride.

Il est à noter que l'indole n'a pas été retenu comme contribuant à l'odeur désagréable des selles, mais était plutôt associé à une odeur de boule de naphthaline [Moore J.G 1987]. Peut-être cela est-il lié à sa faible volatilité [Statheropoulos M 2007].

Quant au phénol, il est identifié comme faisant partie des principaux constituants des arômes de fromages de nature assez odorante tels que le Pont l'Evêque [Dumont JP 1976]. Il est aussi cité, en association avec d'autres COVs retrouvés dans nos échantillons (3 methylbutanol 1, DMDS) comme un

produit neutre volatil important dans les saveurs des fromages à pâte molle et à croûte lavée (ex : vacherin) [Dumont JP 1974].

Les émotions et l'ancrage perceptif provoqués par les odeurs des plaies tumorales mériteraient d'être travaillés. Car si elles sont associées à des corps putréfiés, des matières fécales ou du fromage, cela pourrait peut-être expliquer les attitudes et plaintes parfois envahissantes. Il est aussi possible d'émettre l'hypothèse que certains types d'odeurs motiveraient les patients porteurs de plaies négligées à consulter, l'apparition d'odeurs ou de saignements étant parfois l'élément déclencheur d'une première consultation [Dolbeault S 2010].

Nous pouvons également nous interroger sur les éventuels effets neuropsychiques de composés volatils tels que le disulfure de carbone. L'exposition à des composés toxiques à très faibles doses, mais de façon continue et pendant une période de fragilité provoque peut-être insidieusement des changements au niveau des fonctions neurophysiologiques et neuropsychologiques [Zayed J 2003]. Les plaies tumorales du sein sont situées sur la partie supérieure du thorax. Le patient en respire donc l'odeur continuellement.

Le disulfure de carbone est par ailleurs un des COV retrouvé en plus forte concentration dans l'air expiré des patients schizophrènes, et retenu comme potentiel biomarqueur de cette pathologie [Phillips M. 1993, Buszewski B. 2008].

## **2.2. Analyse des pratiques cliniques**

La prise en charge des plaies malodorantes est le plus souvent envisagée soit par une réduction de la charge bactérienne, soit par adsorption (charbon). Plus exceptionnellement, d'autres produits sont utilisés (ex : curcuma, chlorophylle, yaourt, huiles essentielles).

Ces produits se heurtent à différentes limites en termes d'efficacité (Tableaux 4, 4 bis), de répercussions sur le microbiote de la plaie, de tolérance, ou d'absence de preuves d'efficacité. Le développement de solutions nouvelles ou d'optimisation de l'efficacité de produits déjà disponibles semble nécessaire.

## **2.3. Perspectives**

### 2.3. A. Evaluation des odeurs, de leurs répercussions psychiques et comportementales

La mise en place d'une étude autour des composés volatils des plaies tumorales et leurs éventuelles conséquences sur les comportements et le psychisme pourrait être menée avec la collaboration de psycho-oncologues et neuropsychiatres. Pour ce faire, la réalisation de nouvelles enquêtes de perception sensorielle et de caractérisation des COVs de différents groupes de patients porteurs de plaies tumorales et non tumorales serait nécessaire, en complément d'évaluations cliniques (neurophysiologique, neuropsychologiques et de la plaie).

Cela impliquerait un travail autour des échelles d'évaluation d'odeurs car celles proposées (Teler®, Haugton and Young et de L. Van Rijswijk) ne prennent en compte qu'une notion d'intensité. Or nos résultats et constatations tendent à démontrer que les types d'odeurs ont un poids au moins aussi important que l'intensité sur la perception de ce symptôme. Ajouter des éléments descriptifs d'odeurs regroupés par classes (ex : fromage, œuf ou poisson pourri, matière fécale – fruitée, sucrée, végétale – d'essence et urineuse) à l'intensité permettrait de créer une échelle scorée afin d'évaluer plus justement ce symptôme.

Ces travaux pourraient être menés conjointement afin de ne pas répéter inutilement le recueil d'échantillons et les analyses en SPME-GC-FID/MS. Il imposerait également la participation de spécialistes de la perception sensorielle, tels que ceux déjà impliqués dans l'étude réalisée.

### 2.3 B. Développement de topiques anti-odeurs

La solution la plus simple serait de développer des pansements au charbon avec une surface spécifique d'adsorption plus importante (ex : augmentation de l'épaisseur).

Mais nous remarquons aussi que la plupart des molécules odorantes identifiées sont hydrophobes (ex : organo sulfurés, indole, acide carboxylique). Les produits hydrophobes sont souvent lipophiles (solubles dans les corps gras). Ils pourraient donc être neutralisés par des pansements à base de corps gras.

A ce jour, l'utilisation de pansements gras (interfaces ou tulles) est indiquée en phase de bourgeonnement ou d'épithélialisation, à des étapes du processus de cicatrisation pendant lesquelles les plaies sont rarement malodorantes, excepté lors d'épisodes infectieux. Lorsque les premiers signes d'infection apparaissent, ces pansements sont le plus souvent associés à un antimicrobien. Leur efficacité sur les odeurs a donc parfois été relatée, mais imputée à l'action antimicrobienne du produit. L'extension d'une indication de ces pansements pour les plaies malodorantes ne peut être envisagée aussi simplement puisque ces pansements ne sont ni drainants, ni absorbants, et donc peu appropriés

à des applications sur des plaies exsudatives ou nécrotiques. Ils n'ont pas été évalués sur cette indication. Par contre, la conception d'un produit drainant et lipophile pourrait être envisagée.

D'autres substances déjà utilisées en médecine ou cosmétologie tel que le polyéthylène glycol (macrogol) sont hautement hydrophiles et miscibles à l'eau et donc potentiellement intéressantes pour traiter les odeurs.

D'autres solutions pourraient être envisagées en regard des travaux déjà réalisés pour dépolluer l'air dans l'environnement. Par exemple, par l'utilisation de bactéries qui dégradent des COVs tels que *Pseudonocardia asaccharolytica* en cas d'odeur liée au DMTS, DMDS, DMS ou *Thiobacillus sp* pour les odeurs liées au disulfure de carbone [Rappert S. 2005] (Tableau 59). Le développement de ces traitements biologiques, différents des techniques physiques et chimiques habituellement utilisées pour dépolluer l'air, impose bien sûr une parfaite connaissance des micro-organismes susceptibles de dégrader les COVs. La transposition de ces nouvelles technologies (bioréacteurs) à des dispositifs médicaux « anti-odeurs » pourrait être réfléchi, d'autant plus que les bactéries aérobies qui sont utilisées ne sont pas connues pour leur pouvoir pathogène chez l'homme.

Tableau 59 : Seuil de perception des odeurs des composés volatils sulfurés et les microorganismes dégradant ces composés (Rappert S. 2010)

COVs	Seuil perception ( $\mu\text{g} / \text{m}^3$ )	Description de l'odeur	Microorganismes
DMTS	10 <sup>11</sup>	Chou pourri	<i>Pseudonocardia asaccharolytica</i> DSM44247
DMDS	0,1 <sup>13</sup>	Chou pourri	<i>Pseudonocardia asaccharolytica</i> DSM 44247, <i>Hyphomicrobium spp</i> , <i>Thiobacillus spp</i> , <i>Thiobacillus thioparus</i> TK-m
DMS	2,5 <sup>13</sup>	Chou pourri	<i>Pseudonocardia asaccharolytica</i> DSM 44247, <i>Hyphomicrobium spp</i> , <i>Thiobacillus spp</i> , <i>Thiobacillus thioparus</i> TK-m, <i>Thiocapsa roseopersicina</i> , <i>Pseudomonas putida</i> DSI
Méthanethiol	0,024 <sup>3</sup>	Chou pourri	<i>Hyphomicrobium spp</i> , <i>Thiobacillus spp</i> , <i>Thiobacillus thioparus</i> TK-m
Disulfure de carbone	24 <sup>13</sup>	Citrouille pourrie	<i>Paracoccus denitrificans</i> , <i>Thiobacillus spp</i>
Sulfure d'hydrogène	0,029 <sup>3</sup>	Œuf pourri	<i>Thiobacillus spp</i> , <i>Thiobacillus thioparus</i> TK-m, <i>Hyphomicrobium shpp</i> <i>Xanthomonas spp</i> , <i>Methylophage sulfidovorans</i> , <i>Pseudomonas Putida</i>

### **3. Limites de l'étude**

Etant donné le faible nombre de sujets pour un nombre important d'informations cliniques et microbiologiques, les résultats de cette étude doivent être interprétés avec précaution en raison du risque de faux positif.

L'identification des bactéries par PCR (Polymerase Chain Reaction) aurait peut-être permis d'avoir des résultats microbiologiques plus complets comme la détection de bactéries présentes en quantité infime dans les échantillons, de gènes de virulence bactériens ou de détection de la résistance par des méthodes génétiques. De plus, l'analyse des bactéries anaérobies strictes aurait pu être réalisée sur l'ensemble des 32 patients.

Mais la PCR a elle aussi ses limites telles que les faux positifs liés à la contamination des échantillons, ainsi que son coût. Or, l'ensemble de ce travail a été financé par un PHRI (Projet Hospitalier de Recherche Infirmier) dont les budgets restent modestes. C'est en connaissance de ces limites que des échantillons ont été conservés pour d'éventuelles analyses ultérieures.

L'utilisation d'un microscope confocal aurait sans doute donné également plus d'informations sur la structure des biofilms et l'organisation tridimensionnelle des micro-organismes dans ces structures (ex : répartition des populations microbiennes). Cette technique est d'ailleurs celle retenue, en plus de la microscopie à épifluorescence, dans l'étude PANSaBIO.

Malgré ces limites, ce premier travail a déjà permis : 1) d'améliorer des pratiques et réflexions cliniques avec un bénéfice direct pour les patients en terme de qualité de soins, 2) d'ouvrir de nombreuses perspectives, 3) de mettre au point des méthodes, 4) de créer une dynamique de travail transdisciplinaire.

### **4. Conclusion - vers de potentiels biomarqueurs**

L'utilisation des COVs en tant que biomarqueurs a été étudiée dans différentes pathologies et notamment en oncologie où la recherche de tests diagnostiques rapides et non invasifs représente un enjeu majeur de santé publique. Plusieurs études en cours ou déjà publiées ont été réalisées à partir de l'air expiré [Phillips M 2003, Peng G 2010], de prélèvements sur le site de la lésion dans le cancer de

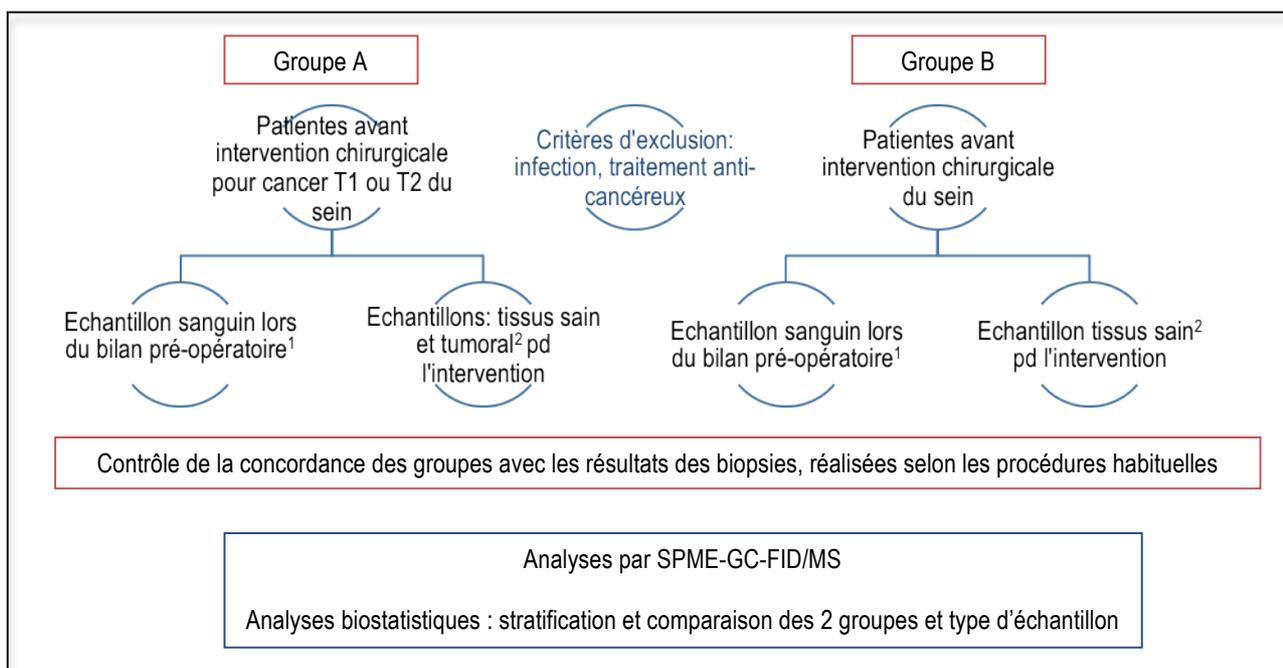
l'estomac [Buszewski B 2008], ou sur d'autres types d'échantillons (sang, plasma, urines) lorsque des détections étaient faites par des chiens dressés [Balseiro SC 2006, Gordon R 2008, Horvath 2010].

Les alcanes, méthyl alcanes et dérivés de benzène semblent être les COVs les plus souvent cités comme étant liés au cancer du sein. Il serait d'ailleurs intéressant de savoir si les chiens ont un odorat particulièrement sensible à ces volatils. Quoiqu'il en soit, cela explique peut-être la présence importante de certains COVs dans les résultats de notre étude tels que les 35% d'heptane, 2, 2, 4, 6,6-pentaméthyl et les 18% de BTH.

Ce travail sur les COVs des plaies tumorales du sein, en collaboration avec le laboratoire LSABM, a permis de mettre au point une méthode analytique reproductible par SPME-GC-FID/MS. L'étude préalable des conditions réelles a tenu compte des impératifs techniques de chacun (cliniciens, chercheurs). La collaboration a par ailleurs été facilitée par la proximité géographique du laboratoire et de l'hôpital (tests, transports des échantillons, échanges).

Compte tenu des compétences et du recrutement de l'Institut Curie, il semblerait intéressant de profiter du travail déjà réalisé pour mettre en place une nouvelle étude ayant pour objectif de progresser sur l'identification de potentiels biomarqueurs du cancer du sein.

Schéma de l'étude :



<sup>1</sup> Prélèvement sur des tubes EDTA, centrifugation, recueil du plasma, congélation à -80° [Horvath G. 2010]

<sup>2</sup> Environ 2g / échantillon, dans flacon SPME, congélation à -80° [Buszewski B 2008]

Les prélèvements sont invasifs mais ne font pas supporter au malade de traumatisme supplémentaire s'ils sont combinés aux prélèvements et chirurgies déjà prévues dans leur parcours thérapeutique. Ils permettent par contre d'avoir des résultats moins dépendants de variations extérieures par rapport aux travaux sur l'air expiré (pics spécifiques à l'haleine, à l'air ambiant).

Le choix du prélèvement sanguin est basé sur le fait que le métabolisme interne produit des VOCs sécrétés dans le sang et éventuellement émis dans l'environnement externe par la respiration ou la sueur [Shirasu M 2011].

Le choix d'inclure uniquement des T1 et T2 (tumeur < 5cm) en dehors d'épisodes infectieux devrait limiter, en théorie, le nombre de COVs émis par les bactéries. De plus, les odeurs (et COVs) semblent être identiques que la tumeur soit évoluée ou non [Horvath G 2010]. Le seul critère limitant pour les T1 est que l'échantillon soit suffisamment important pour pouvoir réaliser les examens histologiques et l'analyse des COVs. Dans une étude ultérieure, des T3 et T4 (> 5cm, ulcérés ou non à la peau) pourraient être également prélevés, afin de faire un différentiel entre les résultats (T1 et T2 *versus* T3 et T4) et tenter d'isoler les COVs émis par les bactéries des COVs plus spécifiques à la tumeur. Ces travaux pourraient être étendus au cancer de l'ovaire.

Deux fibres SPME sont utilisées afin d'extraire le plus grand nombre de composés. La fibre CAR-PDMS, qui permet l'extraction d'un grand nombre d'analytes non polaires et polaires et la fibre PA qui favorise l'extraction de composés polaires plus efficacement que la fibre CAR-PDMS (ex : indole, 1H-indole 3 méthyl). Par contre, l'utilisation de deux fibres rend l'exploitation quantitative des aires de pics difficiles, car différentes d'une fibre à l'autre pour un même composé. Un travail préalable de normalisation, avec la collaboration de biostatisticiens ou de mathématiciens permettrait sans doute de lever cet obstacle.

Ce travail de recherche translationnelle pourrait être conduit au sein de PSL (Paris Sciences Lettres) qui réunit l'ensemble des compétences nécessaires à ce projet.

## BIBLIOGRAPHIE

- Adderley U, Smith R. Topical agents and dressings for fungating wounds. *Cochrane Database Syst Rev.*18;(2):CD003948.
- Akiyama H, Oono T, Saito M, Iwatsuki K. Assessment of Cadexomer Iodine against staphylococcus aureus biofilm in vivo and in vitro using confocal laser scanning microscopy. *J Dermatol.* 2004;31(7): 529-534
- Alandejani T, Marsan J, Ferris W, Slinger R, Chan F. Effectiveness of honey on Staphylococcus aureus et Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Otolaryngol Head Nech Surg.* 2009;141(1):114-118
- Alkawash MA, Soothill JS, Schiller NL Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid Pseudomonas aeruginosa in biofilms. *APMIS.* 2006;114(2):131-8.
- Ammons MC, Ward LS, Fisher ST, Wolcott RD, James GA In vitro susceptibility of established biofilms composed of a clinical wound isolate of Pseudomonas aeruginosa treated with lactoferrin and xylitol. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 33(3):230-6.
- Ammons CB. Anti-biofilm strategies and the need for innovations in wound care. *Recent Patents on anti-infective Drug Discovery.* 2010; 5(1):10-17
- Andriessen AE, Eberlein T. Assessment of a wound cleansing solution in the treatment of problem wounds. *Wounds.* 2008; 20(6): 171-75
- Antoniani D, Bocci P, Maciąg A, Raffaelli N, Landini P. Monitoring of diguanylate cyclase activity and of cyclic-di-GMP biosynthesis by whole-cell assays suitable for high-throughput screening of biofilm inhibitors. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010; 85:1095–1104
- Arrêté du 16 juillet 2010. Modification de la procédure d'inscription et des conditions de prise en charge des articles pour pansements inscrits à la section 1, chapitre 3, titre 1er, de la liste prévue à l'article L. 165-1 (LPP) du Code de la Sécurité sociale. Publié au *Journal officiel (JO)* du 7 août 2010. [www.legifrance.gouv.fr](http://www.legifrance.gouv.fr).
- Ashford RFU, Plant GT, Maher J. Metrodinazole in smelly tumours. *Lancet.*1980; 1:874-5.
- Banin E, Brady KM, Greenberg P. Chelator-Induced Dispersal and Killing of *Pseudomonas aeruginosa* Cells in a Biofilm. *Appl environmen microbiol.* 2006; 72(3) :2064–9
- Barbaud A, Collet E, Le Coz C, Meaume S, Gillois P. Contact allergy in chronic leg ulcers: results of a multicentre study carried out in 423 patients and proposal for an updates series of patch tests. *Contact dermatitis.* 2009; 60(5): 279-87
- Black CE, Costerton JW. Current concepts regarding the effect of wound microbial ecology and biofilms on wound healing. *Surg Clin North Am.* 2010; 90(6): 1147-60

- Bloom HJC, Richardson WW, Harris EJ. Natural history of untreated breast cancer (1803-1933). *Br Med J.* 1962; 2(5299):213-21
- Botta GA, A. Arzese, R. Minisini and G. Trani. Role of structural and extracellular virulence factors in Gram-negative anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis.* 1994 ;18 Suppl 4:S260-4.
- Bower M, Stein R, Evan TRJ, Heldey A, Pert P, Coombes RC. A double blind study of the efficacy of metronidazole gel in the treatment of malodorous fungating tumours. *Eur J Cancer.* 1992 ; 28A :(4-5)888-9
- Bowler PG, Davies BJ. The microbiology of infected and noninfected leg ulcers. *Int. J. Dermatol.* 1999;38 :573-578
- Bowler PG, Duerden B, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clinical Microbiol Rev.* 2001;14(2):244-69
- Boyd A, Chakrabarty AM. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60(7): 2355-2359
- Brimson CH, Nigam Y. The role of oxygen-associated therapies for the healing of chronic wounds, particularly in patients with diabetes. *J. Eur. Acad. Dermatol Venereol.* 2012 Jul 23. Doi: 10.1111/j.1468-3083.2012.04650.x.
- Brook I. Synergic aerobic and anaerobic infections. *Clin Ther.*1987;10 suppl A:19-35
- Buszewski B, Unlanowska A, Ligor T, Jackowski M, Klodzinska E, Szeliga J. Identification of volatile organic compounds secreted from cancer tissues and bacterial cultures. *J. Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008; 868(1-2):88-94
- Carpenter B. Osteomyelitis, wound and ulcer healing. *Am. J. Surg.* 1949; 77:167-171
- Carson CF, Riley TV and Cookson BD. Efficacy and safety of tea tree oil as a topical antimicrobial agent. *J. Hosp Infect.* 1998; 40(3):175-78
- Caubet R, Pedarros-Caubet F, Chu M, Freye E, de Bele´m Rodrigues M, Moreau JM, Ellison WJ. A Radio Frequency Electric Current Enhances Antibiotic Efficacy against Bacterial Biofilms. *Antimicrob agents and chemother.* 2004; 49(12): 4662-4
- CCLIN Sud Ouest. Hygiène des plaies et des pansements – 2004
- Champak C., Moushumi P., Lili X., Van Der Donk WA. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chemical.* 2005; 105:633-683
- Charitansky H. Fromantin I. Cancer wound. *Soins.* 2008;722:51-5.
- Chernomorsky S., Segelman A. Biological activities of chlorophyll derivatives. *New Jersey Medicine.* 1988; 85(8): 669-73

- Chrea C, Valentin D, Sulmont-Rossé C, Hoang Nguyen D, Abdi H. Odeurs et catégorisation : notre représentation mentale des odeurs est-elle universelle ou dépendante de notre culture. In actes de la 3<sup>ème</sup> journée du Sensolier, Paris (France). 2005
- Clark J. Metronidazole gel in managing malodorous fungating wounds. *Br. J. Nurs.* 2002;11(6 Suppl):S54-60
- Collier M. Management of patients with fungating wounds. *Nurs Stand.* 2000 Nov 29-Dec 5;15(11):46-52
- Cornell RS, Meyr AJ, Steinberg JS, Attinger CE. Debridement of the noninfected wound. *J. Am Podiatr Med Assoc.* 2010;100(5):353-9
- Cowan T. Visible biofilms - a controversial issue! *J Wound Care.* 2012;21(3):106.
- Daeschlein G, Assadian O, Kloth LC, Meinel C, Ney F, Kramer A. Antibacterial activity of positive and negative polarity low voltage pulsed current (LVPC) on six topical Gram-positive and Gram-negative bacterial pathogens of chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 2007;15(3): 399–403
- Darbas H. Bactériologie et infection des plaies. Plaies et Cicatrisation. S. Meaume, L. Teot. O. Dereure. Ed Masson 2005
- Davison WM, Pitts B, Stewart PS. Spatial and temporal patterns of biocide action against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* 2010; 54(7): 2920-7
- Del Pozo JL, Rouse MS, Euba G, Kang CI, Mandrekar JN, Steckelberg JM, Patel R. The Electricidal Effect Is Active in an Experimental Model of *Staphylococcus epidermidis* Chronic Foreign Body Osteomyelitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(10): 4064-8
- Desenclos J-C, Brun-Buisson C. La lutte contre les infections associées aux soins: des progrès certes, mais il faut continuer la mobilisation. *Bull Epidemiol Hebd* 2011; N° 15-16-17. Editorial
- Dolbeault S, Flahault C, Baffie A, Fromantin I. Psychological profile of patients with neglected malignant wounds: a qualitative exploratory study. *J Wound Care.* 2010; 19(12): 513-4, 516, 418-21
- Domenico P, Baldassari L, Schoch PE, Kaehler K, Sasatu M, Cunha BA. Activities of bismuth thiols against *Staphylococci* and *Staphylococcal* biofilms. *Antimicrob Agent Chemother.* 2001,45(5) :1417-1421
- Donelli G, Francolini I, Romoli D, et al. Synergistic activity of dispersin B and cefamandole nafate in inhibition of staphylococcal biofilm growth on polyurethanes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(8):2733-40
- Doolittle M.M., Cooney, J.J., Caldwell, D.E. Lytic infection of *Escherichia coli* biofilms by bacteriophage T4. *Can J Microbiol.* 1995; 41(1):12-18.
- Doolittle M.M., Cooney J.J., Caldwell D.E. Tracing the interactions of bacteriophage with bacterial biofilms using fluorescent and chromogenic probes. *J Ind Microbiol.* 1996;16(6) : 331-41

- Dowd SE, Sun Y, Smith E, Kennedy JP, Jones CE, Wolcott R. Effects of biofilm treatments on the multi-species Lubbock chronic wound biofilm model. *J Wound Care*. 2009;18(12):508, 510-12.
- Dowsett C. Malignant fungating wounds: assesement and management. *Bristish J. Nurs*. 2002; 7(8):394-400.
- Dubreuil L. Les infections à anaérobies et leur traitement : arguments microbiologiques. Médecine thérapeutique, 2003 - john-libbey-eurotext.fr
- Dumont JP, Roger S, Cerf P, Adda J. Etude des composés volatils neutres présents dans les fromages à pate molle et à croute lavée. *Le lait, LIV*. 1974;N°531-532, 31
- Dumont JP, Degas Ch, Adda J. L'arôme du Pont l'Evêque. Mise en évidence de constituants volatils quantitativement mineurs. *Le lait*. 1976; N° 553-554
- Edson RS, Rosenblatt J.E, Washington II J.A, Stewart JB. Gas-liquid chromatography of positif blood cultures for rapid presumptive diagnosis of anaerobic bacteremia. *J. of clin microbiol*.1982; 15(6):1059-61
- Escande MC, Fromantin I. Risques infectieux et plaies cancéreuses. *J. Plaies et Cicatrisation*. 2004;Tome IX, N°42
- Facione NC, Miaskowski C, Dodd MJ, Paul SM. The self-reported likelihood of patient delay in breast cancer: new thoughts for early detection. *Prev Med*. 2002;34(4):397-407.
- Feedar J, Kloth LC, Gentzkow GD. Chronic dermal ulcer healing enhanced with monophasic pulsed electrical stimulation. *Phys Ther*. 1991; 71(9):639-49.
- Finlay IG, Bowszyc J, Ramlau C, Gwiedzinski Z. The effect of Topical 0,75% Metrodinazole gel on Malodorous Cutaneous Ulcers. *J Pain Symptom Management*. 1996; 11(3):158-62
- Folsom JP, Baker B, Stewart PS. In vitro efficacy of bismuth thiols against biofilms formed by bacteria isolated from human chronic wounds. *J Appl Microbiol*. 2011; 111(4):989-96
- Fraser JF, Bodman J, Sturgess R, Faoagali J, Kimble RM An in vitro study of the anti-microbial efficacy of a 1% silver sulphadiazine and 0.2% chlorhexidine digluconate cream, 1% silver sulphadiazine cream and a silver coated dressing. *Burns*. 2004;30(1):35-41.
- Fromantin I, Kriegel I, Cuzon F. Les prélèvements bactériologiques des plaies. *Soins*. 2009; (736): 24-30
- Fromantin I, Larreta-Garde V Perspectives. De la clinique à la recherche. *Soins*. 2010;(742):58
- Fromantin I, Larreta-Garde V, Seyer D. Biofilm et détersion. *Soins*. 2011;(752):56.
- Fromantin I, Baffie A, Rollot F. Infection, plaies et soins locaux. *Soins*. 2011 ;(756) : 23-26
- Gilbert P, Das JR, Jones MV, Allison DG. Assessment of resistance towards biocides following the attachment of micro-organisms to, and growth on, surfaces. *J Appl Microbiol*. 2001;91(2):248-254.

- Glinel K, Thebault P, Humblot V, Pradier CM, Jouenne T. Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. *Acta Biomater.* 2012;8(5):1670-84
- Gomes FI, Teixeira P, Azeredo J, Oliveira R. Effect of farnesol on planktonic and biofilm cells of *Staphylococcus epidermidis*. *Curr Microbiol.* 2009;59(2):118-22.
- Grocott P. The management of fungating wounds. *J Wound Care.* 1999;8(5):232-4
- Grocott, P. Developing a tool for researching fungating wounds. *World Wide Wounds.* 2001; [www.worldwidewounds.com/2001/july/Grocott/FungatingWounds.html](http://www.worldwidewounds.com/2001/july/Grocott/FungatingWounds.html)
- Gupta A, Maynes M, Silver S. Effects of halides on plasmid-mediated silver resistance in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64(12): 5042-5
- Hampson JP. The use of Metrodinazole in the treatment of malodorous wounds. *J. Wound Care.* 1996; 5(9): 421-4
- Hampton S. Malodorous fungating wounds: how dressings alleviate symptoms. *Br J Community Nurs.* 2008;13(6):S31-2, S34, S36
- Hancock V, Dahl M, Klemm P. Probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 outcompetes intestinal pathogens during biofilm formation. *J Med Microbiol.* 2010;59(Pt 4):392-9
- Hansson C, Andersson E, Swanbeck G. Leg ulcer epidemiology in Gothenburg. *Acta Chir Scand Suppl.* 1988;544:12-6.
- Harris LG, Bexfield A, Nigam Y, Rohde H, Ratcliffe NA, Mack D. Disruption of *Staphylococcus epidermidis* biofilms by medicinal maggot *Lucilia sericata* excretions/secretions. *Int J Artif Organs.* 2009;32(9):555-64
- Haughton W, Young T. Common problems in wound care: malodorous wounds. *Br J Nurs.* 1995; 4:16,959-963
- Haute Autorité de santé / Service évaluation des dispositifs. Oct 2007. Evaluation des pansements primaires et secondaires. HAS. Les pansements. Indications et utilisation recommandées. Synthèse de rapport 2009, 1- 4
- Heng MC, Harker J, Csathy G, Marshall C, Brasier J, Sumampong S, Paterno Gomez E. Angiogenesis in necrotic ulcers treated with hyperbaric oxygen. *Ostomy Wound Management.* 2000;46(9) :18-28, 30-2
- Heng MC. Wound healing in adult skin: aiming for perfect regeneration. *Int J Dermatol.* 2011;50(9):1058-66
- Hennebert O. 2009. La chimiothérapie : des traitements dits « classiques » aux traitements ciblés. Cours du 12 décembre 2009. Chaire de biologie, CNAM. Paris
- Hentzer M, Riedel K, Rasmussen T.B, Heydorn A, Andersen JB, Parsek M.R, Rice S.A, Rberl L, Molin S, Hoiby N, Kjelleberg S and Givskov M. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas*

- aeruginosa biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Micobiology*. 2002;148(Pt 1), 87-102
- Hentzer M, Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J. clin Invest*. 2003;112 (9):1300-7
  - Hofstad T. Pathogenicity of anaerobic Gram-negative rods: possible mechanisms. *Rev Infect Dis*. 1984;6(2):189-99
  - Hübner NO, Mathhes R, Koban I, Rändler C, Miller G, Bender C, Kindel E, Kocher T, Kramer A. Efficacy of chlorexidine, Polihexanide and Tissue-tolerable Plasma against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on polystyrene and silicone materials. *Skin Pharmacol. Physiol*. 2010;23(suppl 1) 28-34
  - Hughes KA, Sutherland IW, Jones, MV. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Micobiology*.1998;144 (Pt11) 3039 – 47
  - Hurlow J. Response to White and Cutting critique. *J. Wound Care*. 2012;21(4):198.
  - Hurlow J, Bowler PG. Clinical experience with wound biofilm and management: a case series. *Ostomy Wound Manage*. 2009; 55(4):38-49
  - Hyun-Keun S, Striebig BA. Quantification and treatment of sludge odor. *Environ Eng Res*. 2003. 8(5): 252-8
  - Iauk L, Lo Bue AM, Milazzo I, Rapisarda A, Blandino G. Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. *Phytother Res*. 2003;17(6):599-604
  - Ingham HR, Sisson PR, Tharagonnet D, Selkon JB, Codd AA. Inhibition of phagocytosis in vitro by obligate anaerobes. *Lancet*. 1977;17,2(8051):1252-4.
  - Ip M, Lui SL, Poon VK, Lung I, Burd A. Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison. *J Med Microbiol*. 2006;55(Pt 1):59-63.
  - Jaklic D, Lapanje A, Zupancic K, Smrke D, Gunde-Cimerman N. Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria. *J Med Microbiol*. 2008; 57(Pt 5): 617-25
  - James GA, Swogger E, Wolcott R et al. Biofilms in chronic wounds. *Wounds repair Regen*. 2008; 6(1):37-44
  - Jünger M, Arnold A, Zuder D, Stahl HW, Heising S. Local therapy and treatment costs of chronic, venous leg ulcers with electrical stimulation (Dermapulses): A prospective, placebo controlled, double blind trial. *Wound Rep Reg*. 2008;16(4):480–7
  - Kaerhn k, Eberlein T. In-vitro test for comparing the efficacy of wound rinsing solutions. *Br J Nurs*. 2009; 11-24; 18(11): S4, S6-8, S10
  - Kai M, Haustein M, Molina F. Bacterial volatiles and their action potential. *Appli Microbiol Biotechnol*. 2009;81(6): 1001-12

- Kaplan JB. Therapeutic potential of biofilm-dispersing enzymes. *Int J Artif Organs*. 2009;32(9):545-54
- Katsuyama M, Kobayashi Y, Ichakawa S, Ikezawa Z, A novel method to control the balance of skin microflora. Part 1. Attack on biofilm of *Staphylococcus aureus* without antibiotics. *J Dermatol Sci*. 2005; 38(3): 197-205
- Kerihuel JC. Effect of activated charcoal dressings on healing outcomes of chronic wounds. *J. Wound Care*. 2010;19(5):208, 210-2, 214-5.
- Kiran MD, Giacometti A, Cirioni O, Balaban N. Suppression of biofilm related, device-associated infections by staphylococcal quorum sensing inhibitors. *Int J Artif Organs*. 2008;31(9):761-70.
- Kirketerp-Moller K, Jensen P., Fazli M, Madsen KG, Pedersen J, Moser C, Tolker-Nielsen T, Hoiby N, Givskov M, Bjarnsholt T. Distribution, organisation, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J. of clinical microbiology*. 2008; 46(8):2717-22
- Kite GC, Hetterscheid WLA. Inflorescence odours of *Amorphophallus* and *Pseudodracontium* (Araceae). *Phytochemistry*. 1997;46:71-5
- Kite P, Eastwood K, Sugden S, Percival SL. Use of in vivo generated biofilms from hemodialysis catheters to test the efficacy of a novel antimicrobial catheter lock for biofilm eradication in vitro. *J. clin Microbiol*. 200;42(7):3073-6
- Kramer A, Roth B, MFCller G, Rudolph P, Klocker N. Influence of the antiseptic agents polyhexanide and octenidine on FL cells and on healing of experimental superficial aseptic wounds in piglets. A double-blind, randomized, stratified, controlled, parallel-group study. *Skin Pharmacol Physiol*. 2004;17(3):141-146.
- Kuttan R, Sudheeran PC, Josph CD. Tumeric and curcumin as topical agents in cancer therapy. *Tumori*. 1987; 28;73(1):29-31
- Ladas S, Arapajis G, Malamou-ladas H, Palikaris G, Arseni A. Rapid diagnosis of anaerobic infections by gas-liquid chromatography. *J. Clin Pathol*. 1979;32(11): 1163-7
- Landis SJ. Chronic wound infection and antimicrobial use. *Adv Skin Wound Care*. 2008; 21(11):531-40
- Landsdown AB, Williams A. Bacterial resistance to silver in wound care and medical devices. *J. Wound Care*. 2007;16(1):15-9.
- Langemo DK, Anderson J, Hanson D, Hunter S, Thompson P. Managing fungating wounds. *Adv Skin Wound Care*. 2007;20(6):312-4
- Lazareth I; Meaume S; Sigal-Grinberg ML, Combemale P, Le Guyadec T ; Zagnoli A, Perrot JL ; Sauvadet A ; Bohbot S. The Role of a Silver Releasing Lipido-colloid Contact Layer in Venous Leg Ulcers Presenting Inflammatory Signs Suggesting Heavy. *Wounds*. 2008, 20(6):158-166

- Lazelle-Ali C. Psychological and physical care of malodorous fungating wounds. *Br J Nurs*. 2007; 12;16(15):S16-24
- Le dictionnaire des cancers de A à Z. FNCLCC (Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer)
- Lipp C, Kirker K, Agostinho A, James G, Stewart P. Testing wound dressings using an in vitro wound model. *Journal of wound care*. 2010; 19(6): 220-6
- Löfmark S, Edlund Ch, Nord C.E. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Clin infect dis*. 2010;50 Suppl 1: S16-23
- Lookingbill DP, Spangler N, Helm KF. Cutaneous metastases in patients with metastatic carcinoma: A retrospective study of 4020 patients. *J. Am Dermatol*. 1993;29 (2 Pt 1):228-36
- Lund-Nielsen B, Müller K, Adamsen L. Malignant wounds in women with breast cancer: feminine and sexual perspectives. *J. Clin Nurs*. 2005;14(1):56-64.
- Lund-Nielsen B, Müller K, Adamsen L. Qualitative and quantitative evaluation of a new regimen for malignant wounds in women with advanced breast cancer. *J. Wound Care*. 2005;14(2):69-73.
- Lund-Nielsen B, Adamsen L, Gottrup F, Rorth M, Tolver A, Kolmos JK. Qualitative bacteriology in malignant wounds – a prospective, randomized, clinical study compare the effect of honey and silver dressing. *Ostomy Wound Management*. 2011; 57(7):28-36
- Margolin L, Gialanella P. Assessment of the antimicrobial properties of maggots. *Int Wound J*. 2010;7(3):202-4
- Marsollier L et al. Impact of Mycobacterium ulcerans biofilm on transmissibility to ecological niches and Buruli ulcer pathogenesis. *Plos Pathog*. 2007;4;3(5)
- Martineau L, Dosch HM. Biofilm reduction by a new burn gel that targets nociception. *J Appl Microbiol*. 2007;103(2):297-304
- McMurray V. Managing patients with fungating malignant wounds. *Nurs Times*. 2003; 1-7;99(13):55-7.
- Meaume S, Kerihuel JC, Fromantin I, Teot L. Workload and prevalence of open wounds in the community: french Vulnus initiative. *J Wound Care*. 2012; 21(2): 62-73
- Meierhenrich U.J, Golebiowski J, Fernandez X. De la molécule à l'odeur. Les bases moléculaires des premières étapes de l'olfaction. *L'actualité chimique*. 2005;289: 29-40
- Mercier D, Kneivitt A. Using topical aromatherapy for the management of fungating wounds in a palliative care unit. *J Wound Care*. 2005;14(10):497-8, 500-1
- Merckoll P, Jonassen TO, Vad ME, Jeansson SL, Melby KK. Bacteria, biofilm and honey: a study of the effects of honey on 'planktonic' and biofilm-embedded chronic wound bacteria. *Scand J Infect Dis*. 2009;41(5):341-7.

- Merriman HL, Hegyi CA, Albright-Overton CR, Carlos J. Putnam RW, Mulcare JA. A comparison of four electrical stimulation types on *Staphylococcus aureus* growth in vitro. *J Rehab Research Dev.* 2004; 41(2): 139–46.
- Merz T, Klein C, Uebach B, Kern M, Ostgathe Ch, Bükki J. Fungating wounds. Multidimensional challenge in palliative care. *Breast Care.* 2011; 6(1):21-24
- Molan PC. The role of honey in the management of wounds. *J Wound care.* 1999;8(8):415-8 415-417
- Molan PC. The evidence supporting the use of honey as a wound dressing. *Int J Low Extrem Wounds.* 2006;5(1):40-54
- Moore J.G, Jessop L.D, Osborne D.N. Gas-chromatographic and mass-spectrometric analysis of the odor human feces. *Gastroenterology.* 1987;93(6):1321-9.
- Nostro A, Scaffaro R, Ginestra G, D'Arrigo M, Botta L, Marino A, Bisignano G. Control of biofilm formation by poly-ethylene-co-vinyl acetate films incorporating nisin. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;87(2):729-37.
- OMS. Resolution WHA57.1. Ulcère de buruli (infection à *Mycobacterium ulcerans*): surveillance et lutte. Dans cinquante-septième Assemblée mondiale de la santé, Genève, 17-22 mai 2004. Résolution et décisions. Genève, Organisation Mondiale de la Santé, 2004 (WHA57/2004/REC/1): 1-2
- Peng G, Tisch U, Adams O, Hakim M, Shehada N, Brozza YY, Billan S, Abdah-Bortnyak R, Kuten A, Haick. H. Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles. *Nat Nanotechnol.* 2009; 4(10) : 669-73
- Percival SL, Bowler PG. Biofilms and their potential role in wound healing. *Wounds.* [www.woundsresearch.com](http://www.woundsresearch.com)
- Percival SL, Bowler P, Dolman J. Antimicrobial activity of silver-containing dressings on wound microorganisms using in vitro biofilm model. *Int Wound J.* 2007;4(2):186-91
- Percival SL, Woods E, Nutekpor M, Bowler P, Radford A, Cochrane C. Prevalence of silver resistance in bacteria isolated from diabetic foot ulcers and efficacy of silver-containing wound dressings. *Ostomy Wound Manage.* 2008;54(3):30-40
- Phillips M, Ctaneo R.N, Diktoff B.A, Fisher P, Greenberg J, Gunawardena R, Kwon C.S, Rahbari-Oskoui F, Wong C. Volatile markers of breast cancer in the breast. *Breast J.* 2003 Jul-Aug;9(4):345
- Phillips M, Sabas M, Greenberg J. Increase pentane and carbon disulphide in the breath of patients with schizophrenia. *J. Clin Pathol.* 1993;46(9):861-4
- Philips P, Sampson E, Yang Q, Antonelli P, Progulske-Fox A, Schultz G. Bacterial biofilms in wound. *Wound healing southern Africa.* 2008;1(2):10-12

- Philips PL, Wolcott RD, Fletcher J, Schultz GS. Biofilms made easy. *Wounds International* 2010; 1(3): <http://www.woundinternational.com>
- Philips PL, Yang Q, Sampson E, Schultz G. Effects of Antimicrobial Agents on an *In Vitro* Biofilm Model of Skin Wounds. *Advances in Wound Care*. 2010;1:299-304
- Poon VK, Burd A, in vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care. *Burns*. 2004;30(2):140-7
- Powell G. Evaluating Cutimed Sorbact: using a case study approach. *Br J Nurs*. 2009;18(15):S30, S32-6.
- Probst S., Arber A, Faithfull S. Malignant fungating wounds: a survey of nurses' clinical practice in Switzerland. *Eur J Oncol Nurs*. 2009;13(4):295-8.
- Rappert S, Müller R. Microbial degradation of selected odorous substances. *Waste Management*. 2005;25(9):940-54
- Recio MC, Andújar I, Ríos JL. Anti-Inflammatory Agents from Plants: Progress and Potential. *Curr Med Chem*. 2012;19(14):2088-103
- Reid G. How science will help shape future clinical applications of probiotics. *Clin. Infect Dis*. 2008;1;46 Suppl 2:S62-6
- Rotimi VO, Durosinmi Etti FA The bacteriology of infected malignant ulcers. *J. Clin Pathol* 1984;37(5):592-5
- Ryan R.P, Dow J.M. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology*. 2008;154(Pt 7):1845-58
- Sadowska B, Walencka E, Wieckowska-Szakiel M, Rozalka B. Bacteria competing with the adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Folia Microbiol (Praha)*. 2010;55(5):497-501
- Schulz S, Dickshat JS. Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat. Prod Rep*. 2007;24(4):814-42
- Seaman S. Management of malignant fungating wounds in advanced cancer. *Semin Oncol Nurs*. 2006;22(3):185-93
- Seyer D, Lembré P, Di Martino P, Larreta Garde V. Biofilms: formation and characterization. *J Wound Technology* (accepted)
- Shirasu M, Nagai S, Hayashi R, Ochiai A, Touhara K. Dimethyl trisulfide as a characteristic odor associated with fungating cancer wounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2009; 73(9):2117-2120,
- Siddiqui AR, Bernstein JM. Chronic wound infection: facts and controversies. *Clin dermatol*. 2010;28(5) 519-26

- Signe-Picard C, Cerdan MI, Naggara C, Téot L. Flammacérium in the formation and stabilisation of eschar in chronic wounds. *J Wound Care*. 2010;19(9):369-70, 372, 374 passim.
- Silver S, Phung le T, Silver G Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2006;33(7):627-34.
- Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*. 2002; 30;417(6888):552-5.
- Söderling EM, Marttinen AM, Haukioja AL. Probiotic lactobacilli interfere with *Streptococcus mutans* biofilm formation in vitro. *Curr Microbiol*. 2011;62(2):618-22.
- Statheropoulos M, Agapiou A, Spilopoulou C, Pallis GC, Sianos E. Environmental aspects of VOCs evolved in the early stages of human decomposition. *Sci. total environ*. 2007;15;385(1-3):221-7
- Stotzky G, Schenk S. Volatile organic compounds and microorganisms. *CRC Critical review in microbiology*. 1976;4(4):333-82.
- Stotter A, Kroll S, McNeese M, Holmes F, Oswald MJ, Romsdahl M. Salvage treatment for loco-regional recurrence following breast conservation therapy for early breast cancer. *European Journal of surgical Oncology*. 1991;17(3):231-6
- Sun Y, Smith E, Wolcott R, Dowd SE. Propagation of anaerobic bacteria within an aerobic multi-species chronic wound biofilm model. *J Wound Care*. 2009;18(10):426-31
- Thomas AN, Riazanskaia S, Cheun W, Xu Y, Goodacre R, Thomas P, Baguneid M.S, Bayat A. Novel noninvasive identification of biomarkers by analytical profiling of chronic wounds using volatile organic compounds. *Wound Repair Regen*. 2010;18(4):391-400
- Thorn RM, Greenman J, Austin AJ. In vitro method to assess the antimicrobial activity and potential efficacy of novel types of wound dressings. *J Appl Microbiol*. 2005;99(4):895-901
- Thorn RM, Greenman J, Austin A. An in vitro study of antimicrobial activity and efficacy of iodine-generating hydrogel dressings. *J Wound Care*. 2006; 15(7): 305-10
- Trahan L, Mouton C. Selection for *Streptococcus mutans* with an altered xylitol transport capacity in chronic xylitol consumers. *J Dent Res*. 1987;66(5):982-8
- Tran PL, Hammond AA, Mosley T, Cortez J, Gray T, Colmer-Hamood JA, Shashtri M, Spallholz JE, Hamood AN, Reid TW. Organoselenium coating on cellulose inhibits the formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(11):3586-92.
- Ueda A., Attila C, Whiteley M, Wood T.K.. Uracil influences quorum sensing and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and fluorouracil is an antagonist. *Microbial Biotechnology*. 2009;2(1):62-74

- Unnanuntana A, Bonsignore L, Shirtliff ME, Greenfield EM The effects of farnesol on Staphylococcus aureus biofilms and osteoblasts. An in vitro study. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91(11):2683-92.
- Van der Plas MJ, Jukema GN, Wai SW, Dogterom-Ballering HC, Lagendijk EL, van Gulpen C, van Dissel JT, Bloemberg GV, Nibbering PH. Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(1):117-22.
- Van der Plas MJ, Dambrot C, Dogterom-Ballering HC, Kruithof S, van Dissel JT, Nibbering PHJ *Antimicrob Chemother.* Combinations of maggot excretions/secretions and antibiotics are effective against Staphylococcus aureus biofilms and the bacteria derived therefrom 2010 May;65(5):917-23.
- Van Rijswijk L. The fundamentals of wound assessment. *Ostomy Wound Manage.* 1996;42(7):40-2, 44, 46 passim.
- Vass A, Smith R, Thompson C, Burnett M, Dulgerian N, Eckenrode B. Odor analysis of decomposing buried human remains *J Forensic Sci.* 2008;53(2):384-91
- Wellman N, Fortun SM, McLeod B.R. Bacterial Biofilms and the Bioelectric Effect. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 1996;40(9):2012-4
- Vermeulen H, van Hattem JM, Storm-Versloot MN, Ubbink DT. Topical silver for treating infected wounds. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;(1):CD005486
- Wheat LJ, Allen SD, Henry M, Kernek C, Siders J, Kuebler T, Fineberg N, Norton J. Diabetic Foot Infections. Bacteriologic Analysis. *Arch Intern Med.* 1988;146: 1935-40
- White RJ, Cutting KF. Wound biofilms-are they visible? *J Wound Care.* 2012 Mar;21(3):140-1.
- Whittle CL, Fakharzadeh S, Eades J, Preti G. Human breath odors and their use in diagnosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1098:252-66
- Williams C. CliniSorb activated charcoal dressing for odour control. *Br J Nurs.* 2000;13;9(15):1016-9.
- Wilson JR, Mills JG, Prather ID, et al. A toxicity index of skin and wound cleansers used in vitro fibroblasts and keratinocytes. *Adv Skin Wound Care.* 2005;18:373-8
- Wilson M. Bacterial biofilms and human disease. *Sci Prog.* 2001;84(Pt 3):235-54
- Winter GD. Formation of the scab and the rate of epithelisation of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature.* 1962 ;20;193:293-4
- Wolcott RD, Rhoads DD, Bennett ME, Wolcott BM, Gogokhia L, Costerton JW, Dowd SE. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. *J Wound Care.* 2010;19(2):45-6, 48-50, 52-3.

- Wolcott RD, Rumbaugh KP, James G, Schultz G, Yang Q, Watters C, Stewart PS, Dowd SE. Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time-dependant therapeutic window. *J. Wound Care*. 2010;19(8):320-8
- Zayed J, Panisset M, Mergler D (2003) Système nerveux. In : Environnement et santé publique - Fondements et pratiques, pp. 699-712. Gérin M, Gosselin P, Cordier S, Viau C, Quénel P, Dewailly É, rédacteurs. Edisem / Tec & Doc, Acton Vale / Paris
- Zechman J.M, Aldinger S., Labows J.N. Characterization of pathogenic bacteria by automated headspace concentration – gas chromatography. *J Chromatogr*. 1986; 25;377:49-57

## **ANNEXES**

# Annexe 1 – Poster présentant les résultats des tests réalisés *in vitro* sur l'efficacité de pansements à l'argent sur le biofilm. Travail soutenu par le laboratoire Urgo.

## Comparaison de deux techniques de quantification d'un biofilm bactérien en présence d'agents bactéricides

### AUTEURS

Sylvaine QUATRAVAUX,  
Sandra RODRIGUES,  
Nicolas DESROCHE,  
Jean GUZZO  
et Patrice ARBAULT

Nexidia SAS, ENESAD,  
26 Boulevard du Docteur Petitjean,  
21079 DUON Cedex



Les **biofilms bactériens** constituent une forme de résistance des bactéries contre les agents antibactériens. Ces biofilms sont capables de coloniser les plaies et sont reconnus comme étant impliqués dans des infections chroniques en milieu hospitalier. Les nombreuses recherches sur les biofilms ont nécessité la mise au point de techniques de quantification. Notre étude a consisté à mettre en œuvre deux techniques de quantification de biofilm : (i) la **coloration au cristal violet (CV)**, et (ii) le **dénombrement des bactéries par étalement sur boîtes de Pétri** afin de mesurer l'effet bactéricide de pansements TLC-Ag.

### Matériel biologique :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (souche résistante à la méthicilline)
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

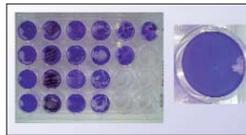
### Modèle expérimental *in vitro* :

- Formation des biofilms à 37°C dans des plaques de polystyrène 24 puits pendant 24h
- Mise en contact avec le pansement **Urgotul®** (Témoin) et pansement TLC-Ag pendant 1 jour, 2 jours et 3 jours

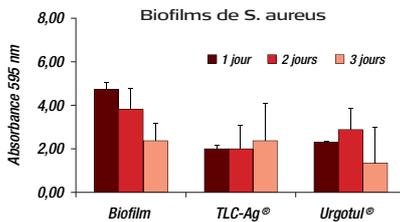
### Quantification du biofilm ayant adhéré par deux techniques

- Méthode semi quantitative par dosage de la quantité de cristal violet relarguée (1)
- Dénombrement des bactéries sur milieu gélosé

#### Coloration au Cristal Violet

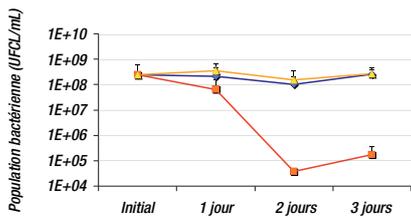
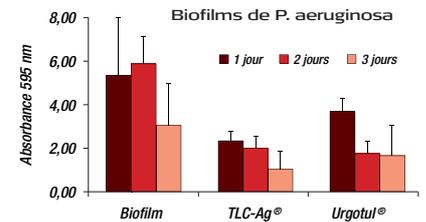


#### Dénombrement sur milieu gélosé



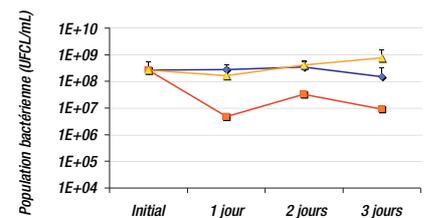
#### Coloration au cristal violet (CV)

- Interférence de la trame TLC avec le cristal violet (absorption aspécifique et aléatoire du colorant)
  - Réduction de la quantité de bactéries au sein du biofilm après contact avec le pansement TLC-Ag (diminution DO595nm)
- ➔ **Effet bactéricide du pansement TLC-Ag**

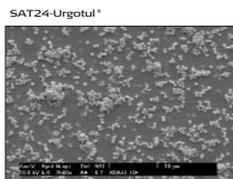


#### Dénombrement en milieu gélosé

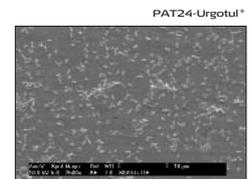
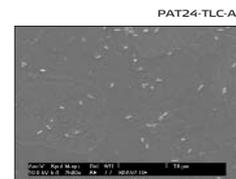
- Destruction à 99,93 % d'un biofilm de *S.aureus* âgé de 24 h. Effet maximum après 2 jours de contact
  - Destruction à 98% d'un biofilm de *Paeruginosa* âgé de 24 h. Effet maximum après 1 jour de contact.
- ➔ **Effet bactéricide du pansement TLC-Ag**



### Confirmation des résultats par observation en MEB sur coupes d'acier (x2500)



- Réduction de la quantité de bactéries et de la formation d'agrégats
  - Effet du pansement TLC-Ag sur la structure des biofilms
- ➔ **Pas de formation de réseau de bactéries en présence de pansement TLC-Ag**



## CONCLUSION

L'effet antimicrobien du pansement TLC-Ag est mis en évidence par les deux techniques de quantification. La méthode au cristal violet permet d'évaluer le biofilm de manière non linéaire et semi quantitative. De plus, la trame TLC induit des interférences en absorbant le cristal violet de façon aspécifique rendant l'interprétation des résultats difficiles. La technique de dénombrement sur milieu gélosé permet, quant à elle, d'évaluer précisément la chute de population bactérienne de façon logarithmique. Cette technique est plus adaptée à l'étude de l'action de pansements antimicrobiens sur le biofilm et est parfaitement corrélée avec l'effet bactéricide important observé en MEB.

Les biofilms bactériens de *S. aureus* et *P. aeruginosa* sont détruits par le pansement TLC-Ag à 99,93% et 98% respectivement. Les observations microscopiques confirment l'effet antimicrobien du pansement TLC-Ag sur les biofilms formés de *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Ces résultats *in vitro* donnent un nouvel éclairage sur les données obtenues en clinique avec les pansements TLC-Ag.

# Clinical effectiveness of polihexanide on biofilms in wounds

E. Lenselink#, A. Andriessen

# Wound and PU consultant, Medical Center Haaglanden, Den Haag, The Netherlands  
Andriessen consultants, Malden, The Netherlands. [anneke.a@tiscali.nl](mailto:anneke.a@tiscali.nl)



## Introduction:

Published studies on the treatment of biofilms in wounds is scarce. This paper presents the results of a literature review looking at antimicrobials, specifically polihexanide (PHMB) used for infected wounds, containing a biofilm, as well as the interim results (N=25) of a real life clinical practice study.

## Literature review method:

A systematic literature review was carried out on diagnosis and treatment of biofilms in wounds, using the following keywords: *biofilm, wound, wound management, antimicrobial, polihexanide, polyhexanide, PHMB and combinations thereof*. We searched published studies, which met the following criteria: Publications from January 1, 1995 to the present (May 2010) in English, German, French or Dutch; in-vitro, in-vivo and with human subjects including reviews, reports, and meta-analyses. Databases searched: Pubmed, Medscape, Medline, Embase, Cinahl and Cochrane. In addition, we searched the EWMA Journal, Dutch Journal of Wound studies and publications issued in congress proceedings.

## Results of the literature review:

For the number of studies and study types see Fig.2. Of non healing chronic and critically colonized wounds, 65-80% is associated with biofilms, leading to chronic inflammation and delayed wound healing [1-4,6,9,10]. A biofilm is an aggregate of microorganisms in which cells adhere to each other and/or to a surface [1,2,5]. These adherent cells are frequently embedded within a self-produced matrix of extracellular polymeric substance (EPS), which is generally composed of extracellular DNA, proteins, and polysaccharides. Fig.1. Bacteria living in a biofilm usually have significantly different properties from free-floating bacteria of the same species, as the dense and protected environment of the film allows them to cooperate and interact in various ways [6,3]. *Pseudomonas aeruginosa* is not only an important opportunistic pathogen but can also be considered a model organism for the study of diverse bacterial mechanisms that contribute to bacterial persistence in relation to biofilms [6,3]. The presence of fibrin in the wound bed is associated with chronic inflammation and is an ideal breeding ground for anaerobic bacteria in particular [6-8]. Interaction between aerobic and anaerobic bacteria in a biofilm, is due to increased pathogenic effect and leads to delayed wound healing [7-9].

Cleansing is easy, but to keep the wound clean and to prevent further biofilm formation, requires a combination of frequent debridement and antibacterial agents [5,10-12,14-18]. Clinical research on the effectiveness of antibacterial agents to treat biofilms in wounds, is scarce and inconclusive. In vitro, the results are often tested on a monoculture [5]. PHMB in vitro and in clinical trials is effective against broad spectrum micro-organisms, such as *Pseudomonas aeruginosa* and HIV [11,12,14-18,19-26]. 87% of biofilm was removed by PHMB in a 3 weeks in vitro study [13]. In a clinical study in 7/10 patients the biofilm in their wounds was removed after 3 weeks treatment with PHMB [14]. HydroBalance dressing + PHMB\* is more effective than 10-15 minutes gauze soaked in PHMB [15]. An RCT on a HydroBalance dressing + PHMB\* compare with standard silver treatment showed a greater pain reduction and improved quality of life (QoL) [16]. PHMB is suitable for critically colonized and infected chronic wounds. A reduction of biofilm was shown, good tissue tolerance and no known resistance [17,18, 21,22]. Wound cleansing with PHMB was faster than standard therapy [19].

## Conclusion:

The treatment of bio-films in wounds is not yet fully explored. The presence of bio-films in infected wounds may further strengthen the pathogenic properties of the bacteria present. Various studies have indicated in-vitro that topical silver and povidone iodine have little effect. Clinical studies indicate that PHMB may have a positive impact on bio-films in infected wounds, however there are few large, conclusive clinical studies to date. It was shown that continuous application of PHMB using a HydroBalance\* dressing was superior over using PHMB for cleansing during dressing changes. PHMB in practice is recommended for critical colonized and infected wounds.

## Interim results (N=25) of a real life clinical practice study

### Aim:

To evaluate clinical efficacy of a \*HydroBalance dressing + PHMB (X+PHMB) in the treatment of chronic wounds that contain a biofilm.

### Methods:

Patients that visit the outpatient clinic, with non healing wounds of various etiologies that showed clinical signs of biofilm, were included. Clinical feature of biofilms in wounds is described as a shiny translucent slimy layer on a non-healing wound surface that mostly do not respond to treatment [7-9]. Wound cleansing is conducted with saline, if required debridement is performed. \*X + PHMB is covered with a \*\*foam dressing. Dressing changes took place 2 to 3 times per week, depending on wound condition and exudate production. Patients were followed until healing. Reduction of the biofilm was scored on a 3 point scale (good/moderate/poor). Reduction in wound size was also scored on a three point scale, using planimetry and photographs.

### Results:

N= 25 were included (12 female) For wound types see Fig.3.

17 Patients completed the study of which n=14 had a good reduction of the biofilm, n=2 scored moderate and n=1 had no reduction. After four weeks of treatment n=4 discontinued due to copious exudate production, n=2 were lost to follow up. 12/17 Patients had a good reduction in wound area., n=2 scored moderate, n=1 scored poor and n=2 did not have their wounds scored.

### Conclusion:

The interim results indicate \*X + PHMB to reduce biofilm in patients with chronic wounds. The dressing seems suitable for moderate to light exuding wounds, hence 4 patients were removed from the study after 4 weeks of treatment due to copious exudate production.



Fig 1: A critically colonized wound with a biofilm. EPS is visible

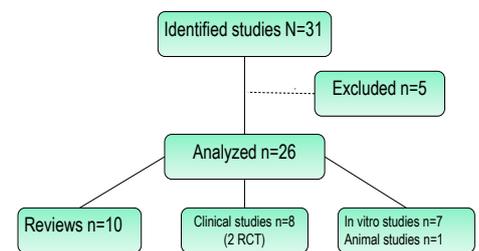


Fig 2: Results of the systematic literature review

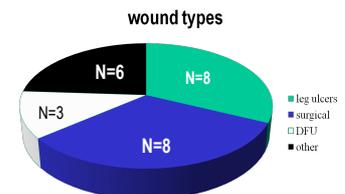


Fig.3: Wound types of patients included in the study (N=25)

## Bibliography:

1. Potera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science*. 1999;283:1837-1839.
2. Singh VA, Barbul A. Bacterial biofilms in Wounds. *Wound Repair Regeneration*. 2008;16:11.
3. James GA, Swogger E, et al Wolcott RD. Biofilms in Chronic Wounds. *Wound Repair Regeneration*. 2008;16:37-44.
4. Wolcott RD, Kennedy JP, Dowd SE. Regular debridement is the main tool for maintaining a healthy wound bed in most chronic wounds. *Journal of Wound Care* 2009; 19(2):54-56.
5. Mertz PH. Biofilms: friend or foe? *Wounds* 2003;15:129-132.
6. Hurlow J, Bowler PG. Clinical experience with wound biofilm and management: A case series. *Ostomy Wound Management* 2009, April; 38-49.
7. Enoch S, Harding K. Wound bed preparation: The science behind the removal of barriers to healing. *Wounds*. 2003;15(7): 213-229.
8. Schielf CF, De la Garza M, Mustoe A, Galiano RD. Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model. *Wound Repair Regeneration*. 2009;17: 354-359.
9. Percival S, Bowler P. Understanding the effects of bacterial communities and biofilms on wound healing. [www.worldwidewounds.com](http://www.worldwidewounds.com). 2004 July; print 26/02/2008.
10. Percival SL, Bowler P, Woods EJ. Assessment of the effect of an antimicrobial wound dressing on biofilms. *Wound Repair Regeneration*. 2008;16:52-57.
11. Ousey K, McIntosh C. Topical antimicrobial agent for the treatment of chronic Wounds. *Wound Care*. 2009, Sept.: S6-S16.
12. White RJ, Cutting K, Kingsley A. Topical antimicrobials in the control of wound bioburden. *Ostomy Wound Manage* 2006 August; 52(8): 26-58.
13. Sepp H-M, Hofmann S, Hack A, et al. Wirksamkeit verschiedener Wundspülösungen gegenüber Biofilmen. *ZfW* 2005; 160-64.
14. A. Horrocks. Prontosan wound Irrigation and gel: management of chronic wounds. *British Journal of Nursing* 2006; 15 (1922) 1222-1228
15. Wild TH, Bruckner M, Payrich M, Schwarz CH, Eberlein TH. Prospective randomized study for eradication of MRSA with polihexanide-containing bioocclusive dressing compared with polihexanide-containing wound solution. Poster presented at a meeting of the European Wound Management Association (EWMA) in Helsinki, Finland, 20-22 May 2009. *EWMA Journal* 2009; 9(2 Suppl):170.
16. Galitz C, Hämmerle G, Signer M et al Prospective Polihexanide wound dressings vs Silver / first interim results of a controlled, prospective, randomized, multi-centric study. 25th DWCS congress. Utrecht, The Netherlands 11/ 2009.
17. Dissmond J, Gerber V, Kramer A, et al Treatment of critically colonized and infected wounds with polyhexanide, a clinical recommendation. *NTW (Dutch Journal of Wound Management)* 2010; 2: 24-30.
18. Andriessen A, Kammerlander G, Eberlein T et al. Antiseptics for wound disinfection: current state of affairs. *NTW (Dutch Journal of Wound Management)*. 2010;1: 22-30.
19. Kaehn K, Eberlein T. Polyhexanide (PHMB) and Betaine in wound care management. *EWMA Journal*. 2008; 8 (2): 13-17.
20. Wiegand C, Abel M, Ruth P, Hipler UC. HaCaT keratinocytes in co-culture with *Staphylococcus aureus* can be protected from bacterial damage by polihexanide. *Wound Repair Regen* 2009; 17(5): 730-38.
21. Daeschlein G, Assadian O, Bruck JC, et al. Feasibility and clinical applicability of polihexanide for treatment of second-degree burn wounds. *Skin Pharmacol Physiol* 2007; 20: 292-96.
22. Mulder GD, Cavorsi JP, Lee DK. Polyhexamethylene biguanide (PHMB): An addendum to current topical antimicrobials. *Wounds* 2007; 19 (7): 173-82.
23. Kammerlander G, Andriessen A, Eberlein T, Zimpler F. Anwendung lokaler Antiseptika in der Wundbehandlung. *pro Vita* 2006
24. Andriessen A, Eberlein TH. Assessment of a wound cleansing solution in the treatment of problem wounds. *Wounds* 2008; 20(6): 171-75.
25. Wiegand C, Abel M, Ruth P, Hipler UC. In vitro evaluation of polihexanide: biocompatible and effective. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* 2009 4(2):Doc15.
26. Kachn K, Eberlein T. In-vitro test for comparing the efficacy of wound rinsing solutions. *British Journal of Nursing* 2009 (Tissue Viability Supplement), Vol 18, No 11.

### **Annexe 3 : Lettre d'information aux patients**

#### **NOTE D'INFORMATION <sup>(1)</sup> DESTINEE AUX PERSONNES PARTICIPANT AU PROTOCOLE DE RECHERCHE BIOMEDICALE**

**IC 2009-09**

**(1) Toutes les pages de cette note d'information doivent être paraphées par le participant à la recherche et l'investigateur.**

**Ce document est réalisé en 2 exemplaires originaux, dont l'un doit être gardé 15 ans par l'investigateur et l'autre remis à la personne donnant son consentement.**

### **Identification de la flore bactérienne des plaies tumorales.**

**Madame, Mademoiselle, Monsieur,**

Le médecin et l'infirmière de l'Unité Plaies et Cicatrisation qui assure le suivi de vos soins vous ont proposé de participer au protocole de recherche biomédicale IC 2009-09 concernant le traitement de votre maladie.

Nous vous proposons de lire attentivement cette note d'information qui essaye de répondre aux questions que vous seriez susceptibles de vous poser avant de prendre votre décision de participation, vous disposez d'un délai de réflexion de 48H pour remettre ce document signé. Vous pourrez à tout moment durant l'essai vous adresser à votre médecin pour lui poser toutes les questions complémentaires.

Votre participation à cette recherche est totalement volontaire. Votre participation ou votre refus ne modifiera en rien les rapports que vous aurez avec votre médecin qui continuera de vous proposer les soins qui lui paraissent les plus adaptés en fonction de votre état de santé.

#### **1) Quel est l'objectif de la recherche ?**

Vous présentez actuellement une plaie liée à votre maladie, pour laquelle vous êtes suivi en consultation Plaies et Cicatrisation, dans le but d'optimiser vos soins locaux.

Nous nous intéressons à ce type de plaie et notamment aux germes qui la colonisent. Le terme «colonisation» signifie que des germes sont présents sur la plaie, sans provoquer pour autant une infection.

En effet, nous cherchons à identifier précisément cette flore bactérienne afin de trouver des solutions plus efficaces que celles qui existent actuellement pour prévenir les éventuels déséquilibres de cette flore (ex : empêcher la multiplication des bactéries et donc l'infection) ou pallier aux symptômes inconfortables liés à la présence de certaines bactéries (ex : mauvaises odeurs).

#### **2) Quelle est la méthodologie ?**

Cette recherche consiste à effectuer 3 séries de prélèvements sur votre plaie afin d'analyser les bactéries et la présence éventuelle de biofilm, non détectables par les examens microbiologiques habituellement réalisés. Le biofilm est un regroupement organisé de bactéries qui adhère à la plaie, se protège à l'aide d'une sorte d'enveloppe, et pourrait être à l'origine de problèmes infectieux récurrents. Par ailleurs, lors des évaluations, votre pansement usager est conservé et congelé dans le but d'en extraire les métabolites volatils par un procédé particulier. Les métabolites volatils sont des composés produits par les bactéries.

L'ensemble de ces résultats sera corrélé à l'aspect et l'évolution de votre plaie grâce aux données recueillies par l'infirmière lors du soin.

### **3) Quels sont les bénéfices attendus ?**

Grâce à cette recherche, nous espérons pouvoir développer dans quelques années des antimicrobiens spécifiquement adaptés à ce type de plaie, pour tous les patients qui les portent.

### **4) Quel est le calendrier et le déroulement des prélèvements ?**

Si vous donnez votre consentement écrit à l'occasion d'une consultation Plaies et Cicatrisation, vous participerez à l'étude après contrôle des critères d'admission. Nous vous en remercions d'ores et déjà. Le 1er bilan de votre plaie sera alors réalisé.

Ce bilan comprend : un examen clinique de votre plaie (avec une photographie numérique centrée uniquement sur la lésion), le recueil de votre dernier pansement usager et deux prélèvements bactériologiques avec une curette. La curette est un petit instrument qui ressemble à une toute petite cuillère et qui permet de racler la surface de la plaie.

Par la suite, ce bilan sera refait deux fois : 21 jours et 42 jours après le bilan initial. (+/- 3j.)

Pendant toute la durée de l'étude, si des signes cliniques d'infection avérée sont identifiés sur votre plaie (ex : pus, majoration de la douleur ou des écoulements, odeurs), un nouveau bilan sera réalisé et complété par une prise de sang afin de doser certains marqueurs biologiques de l'infection.

### **5) Quelle sera la durée de votre participation ?**

La durée de votre participation n'excèdera pas 42j.

**6) Quels sont les risques prévisibles ?** Les risques sont faibles puisqu'il s'agit de prélèvements superficiels. Ils seront évalués et discutés avec vous avant, pendant et après chaque bilan.

S'il y a risque de douleur : un anesthésiant local (Emla®) peut être préalablement appliqué sur votre plaie. Le soin peut aussi être réalisé sous Kalinox® qui est un gaz antalgique associé à un effet anxiolytique et euphorisant, dont l'effet est très rapide et réversible en quelques minutes. Ce risque (faible) de douleur n'est que ponctuel, au moment du prélèvement.

S'il y a risque de saignement, un pansement hémostatique sera positionné à l'endroit où le prélèvement a été effectué.

### **7) Quelles sont les modalités de prise en charge soignante et médicale prévues en fin de recherche ?**

Au terme de votre participation à ce travail, la prise en charge infirmière de votre plaie par l'Unité Plaies et Cicatrisation sera poursuivie.

### **8) Quels sont vos droits en tant que participant à cette recherche ?**

Vous pouvez vous retirer à tout moment de l'essai sans justification, sans conséquence sur la suite de votre traitement ni la qualité des soins qui vous seront fournis et sans conséquence sur la relation avec votre médecin ; vous pourrez être suivi par la même équipe médicale.

Le promoteur de cet essai qui en assure la gestion et la responsabilité est l'Institut Curie, Centre de Lutte contre le cancer, situé au 26, rue d'Ulm, 75005 Paris.

L'Institut Curie a pris toutes les dispositions prévues par la loi relative à la protection des personnes se prêtant à des recherches biomédicales, loi Huriet (n° 88-1138) du 20 décembre 1988 modifiée par la loi de santé publique (n° 2004-806) du 9 août 2004.

L'Institut Curie devant assumer l'indemnisation des éventuelles conséquences dommageables de la recherche biomédicale pour la personne qui s'y prête, a souscrit une assurance de recherches

biomédicales, conformément à la législation en vigueur (n° de contrat .....), auprès de la Société .....

Lorsque la responsabilité du promoteur n'est pas engagée, les participants peuvent être indemnisés auprès de l'ONIAM, (*Office National d'Indemnisation des Accidents Médicaux, 36, Avenue du Général de Gaulle, 93175 BAGNOLET Cedex, N° Vert : 0800 779 887*).

Les modalités de ce protocole ont été soumises à autorisation de 2 instances lesquelles ont pour mission de vérifier la pertinence scientifique de l'essai, les conditions requises pour votre protection et le respect de vos droits :

1) L'Autorité Compétente (Agence française de sécurité des produits de santé-Afssaps) a autorisé cet essai le ..... sous le n° .....

2) Le Comité de Protection des Personnes (CPP) d'Ile de France III a rendu un avis délibératif favorable le ..... Les associations de patients et des usagers font désormais partie de la composition des CPP et ont participé à l'avis qui a été rendu.

Ce protocole a été relu par la Fédération des Comités de Patients pour la Recherche Clinique en Cancérologie (FCPRCC) de la Fédération Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer et de la Ligue Nationale Contre le Cancer.

Votre dossier médical restera confidentiel et ne pourra être consulté que sous la responsabilité du médecin s'occupant de votre traitement ainsi que par les autorités de santé et par des personnes dûment mandatées par le promoteur de l'essai et soumises au secret professionnel.

Dans le cadre de la recherche biomédicale à laquelle il vous est proposé de participer, un traitement automatisé et anonymisé de vos données personnelles va être mis en œuvre pour permettre d'analyser les résultats de la recherche au regard de l'objectif de cette dernière qui vous a été présenté. A cette fin, les données médicales vous concernant seront transmises au Promoteur de la recherche ou aux personnes ou sociétés agissant pour son compte, en France ou à l'étranger. Ces données seront identifiées par un numéro de code et/ou vos initiales. Ces données pourront également, dans des conditions assurant leur confidentialité, être transmises aux autorités de santé françaises ou étrangères.

Conformément aux dispositions de loi relative à l'informatique et aux libertés (loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 modifiée par la loi n° 2004-801 du 6 août 2004) vous disposez d'un droit d'accès, de rectification et d'opposition relatif au traitement de vos données personnelles. Ces droits s'exercent auprès du médecin en charge de la recherche qui seul connaît votre identité. Vous pouvez également accéder directement ou par l'intermédiaire d'un médecin de votre choix à l'ensemble de vos données médicales en application des dispositions de l'article L 1111-7 du Code de la Santé Publique.

Les informations concernant votre identité seront tenues confidentielles par votre médecin.

Conformément à la loi n° 2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique, l'utilisation de vos prélèvements de vos tissus tumoraux est soumise à votre accord écrit et préalable.

De plus selon les dispositions de la loi n° 2002-303 du 4 mars 2002 relative aux droits des malades, vous serez informés, à votre demande, des résultats globaux de l'essai par l'investigateur.

### **11) A qui devez-vous vous adresser en cas de questions ou de problèmes?**

En cas de problèmes, d'événements indésirables en cours d'essai ou de questions, vous pouvez-vous adresser aux personnes suivantes :

<b>Vos contacts dans l'étude</b> <i>(titre, nom, prénom, adresse et téléphone) :</i>
---

..... ..... ..... .....
<b>Coordonnées du médecin référent du patient</b>
..... ..... ..... .....

**Glossaire :**

**\*Examen clinique :** examen pratiqué par un médecin qui, après avoir posé des questions en relation avec la maladie, examine le patient (auscultation, palpation, etc.).

## CAHIER D'OBSERVATION

**IDENTIFICATION DE LA FLORE BACTERIENNE DES PLAIES TUMORALES**  
**Essai n°IC 2009 - 2010**

**Promoteur :** *Institut Curie*  
26, rue d'Ulm  
75005 PARIS

**Equipe :** *Dr M.C Escande, J. Elard, F. Cuzon*  
Laboratoire de microbiologie  
**I. Fromantin, A. Baffie, A. Rivat**  
Equipe P&C  
**M.C. Falcou, Y. de Rycke**  
Biostatistique

**Numéro patient :**              
**Initiales du nom :**         
**Initiales du prénom :**

**Nom et Cachet de l'Investigateur**





PEXT0 **Plaie extériorisée** : (0) non, (1) oui

PSUP0 **Plaie superficielle** : (0) non, (1) oui

PFIST0 **Plaie fistulisée** : **(0) non, (1) oui**

QUALP0 **Qualité de la peau péri lésionnelle** : (0) saine, (1) inflammatoire, (2) irritée, (3) eczématiforme, (4) macérée, (5) autre

PHOTO **Prise photo numérique** : (0) non, (1) oui

### Echelle colorielle

**4 couleurs** : noir (*nécrose*), jaune (*fibrine*), rouge (*bourgeonnement*), rose (*épithélialisation*)  
à coder pour chaque couleur en %

<b>Noir</b>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> %	<b>Rouge</b>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> %
<b>Jaune</b>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> %	<b>Rose</b>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> %

### Présence de biofilm

BIO0 **Présence de biofilm** : (0) non, (1) oui

### EVALUATION J0 - 2/4

NUMET : Numéro patient

NOM Nom : 3 premières lettres

PRENOM Prénom : 2 premières lettres

### Traitements

TTALG0 **Traitement antalgique** : (0) non, (1) oui   
Si oui PAL **Palier** : (1) palier 1 (ex. : *paracétamol*), (2) palier 2 (ex.: *Di antalvic*), (3) palier 3 (*morphinique*)

TTG0 **Traitement général en cours** : (0) non, (1) oui   
Si oui

TTGCT0 **par chimiothérapie** : (0) non, (1) oui

TTCHT0 **par hormonothérapie** : (0) non, (1) oui

TTGTC0 **par thérapeutique ciblée**: (0) non, (1) oui

TTGAT0 **autre traitement** : (0) non, (1) oui   
*si autre : précisez en clair :*

APLA0 **périodes d'aplasie** : (0) non, (1) oui

TTLCO	<b>Traitement local par chimiothérapie</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
TTRT0	<b>Traitement par radiothérapie (ciblé sur la plaie)</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
TTCO0	<b>Traitement par corticothérapie</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
TTATB0	<b>Traitement par antibiotique</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
<u>Si oui</u>	<b>Code antibiotique :</b>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	<b>Code antibiotique :</b>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	<b>Code antibiotique :</b>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

### EVALUATION J0 - 3/4

NUMET :	Numéro patient	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
NOM	Nom : 3 premières lettres	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
PRENOM	Prénom : 2 premières lettres	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

### Soins locaux

NET0	<b>Nettoyage</b> : (1) sérum physiologique, (2) eau, (3) décontamination	<input type="checkbox"/>
PSTP0	<b>Pansement primaire</b> : (1) interface, (2) alginate, (3) hydrofibre, (4) hydrocellulaire, (5) autre <i>Si autre précisez en clair :</i>	<input type="checkbox"/>

#### Pansement(s) secondaire(s) :

**Répondre à toutes les questions**

PSTSC0	Charbon : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
PSTSCAC0	Compresse absorbante : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
PSTSH0	Hydrocellulaire : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
PSTSA0	Alginate : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
PSTSHY0	Hydrofibre : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
PSTSAU0	Autre : (0) non, (1) oui <i>Si autre précisez en clair :</i>	<input type="checkbox"/>

BACLOC0	<b>Bactéricide local</b> : (1) acticoat, (2) release Ag, (3) aquacel Ag, (4) hydrocellulaire Ag, (5) bétadine dermique, (6) bétadine crème, (7) hibitane, (8) PHMB, (9) antibiotique local, (10) autre	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
---------	---	---

### Prélèvements

PCUR0	<b>Prélèvements à la curette</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
RPSU0	<b>Recueil pansement usager</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>

**EVALUATION J0 – 4/4**

NUMET : Numéro patient    
NOM Nom : 3 premières lettres     
PRENOM Prénom : 2 premières lettres

**Risques et complications**

RIVIO **Présence d'un risque vital** : (0) non, (1) oui, (2) modéré   
COCR0 **Colonisation critique** : (0) non, (1) oui   
RINFC0 **Risque d'infection par contiguïté** : (0) non, (1) oui   
EXON0 **Exposition d'organe noble** : (0) non, (1) oui

**Symptômes de la plaie**

ODEU0 **Odeur** : (0) absence, (1) faible, (2) modéré, (3) intense   
Si > 0 **contrôlée par les soins** : (0) non, (1) oui, (2) partiellement   
EXSU0 **Exsudat** : (0) absence, (1) faible, (2) modéré, (3) intense   
Si > 0 **contrôlé par les soins** (0) non, (1) oui, (2) partiellement   
SAISPO **Saignements spontanés** : (0) absence, (1) faible, (2) modéré, (3) intense   
Si > 0 **contrôlés par les soins** : (0) non, (1) oui, (2) partiellement   
SAIPRO **Saignements provoqués** : (0) absence, (1) faible, (2) modéré, (3) intense   
Si > 0 **contrôlés par les soins** : (0) non, (1) oui, (2) partiellement   
DOULO **Douleur lors des soins** : (0) absence, (1) faible, (2) modéré, (3) forte, (4) intense   
Si > 0 **contrôlés par les soins** : (0) non, (1) oui, (2) partiellement   
TTDOULO **Traitement lors des soins** : (0) aucun, (1) emla, (2) xylolaïne, (3) PM, (4) hypno analgésie, (5) MEOPA, (6) autre

**EVALUATION J21 - 1/4**

NUMET : Numéro patient    
NOM Nom : 3 premières lettres     
PRENOM Prénom : 2 premières lettres

DTEVAL21 **Date de l'évaluation**

**Aspect de la plaie**

LONG21 Longueur en cm (la plus grande)

LARG21 Largeur en cm (la plus grande)

PCAV21 **Plaie cavitaire** : (0) non, (1) oui

PEXT21 **Plaie extériorisée** : (0) non, (1) oui

PSUP21 **Plaie superficielle** : (0) non, (1) oui

PFIST21 Plaie fistulisée : **(0) non, (1) oui**

QUALP21 **Qualité de la peau péri lésionnelle** : (0) saine, (1) inflammatoire, (2) irritée, (3) eczématiforme, (4) macérée, (5) autre

PHOT21 **Prise photo numérique** : (0) non, (1) oui

#### Echelle colorielle

**4 couleurs** : noir (*nécrose*), jaune (*fibrine*), rouge (*bourgeonnement*), rose (*épithélialisation*)  
à coder pour chaque couleur en %

Noir	<input type="text"/> %	Rouge	<input type="text"/> %
Jaune	<input type="text"/> %	Rose	<input type="text"/> %

#### Présence de biofilm

BIO21 **Présence de biofilm** : (0) non, (1) oui

#### EVALUATION J21 - 2/4

NUMET : Numéro patient

NOM Nom : 3 premières lettres

PRENOM Prénom : 2 premières lettres

#### Traitements

TTALG21 **Traitement antalgique** : (0) non, (1) oui

Si oui PAL21 **Palier** : (1) palier 1 (ex. : *paracétamol*), (2) palier 2 (ex. : *Di antalvic*), (3) palier 3 (*morphinique*)

TTG21	<b>Traitement général en cours</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
<u>Si oui</u>		
TTGCT21	<b>par chimiothérapie</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
TTCHT21	<b>par hormonothérapie</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
TTGTC21	<b>par thérapeutique ciblée</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
TTGAT21	<b>autre traitement</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
	<i>si autre : précisez en clair :</i>	
APLA21	<b>périodes d'aplasie</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>

TTLC21	<b>Traitement local par chimiothérapie</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
TTRT21	<b>Traitement par radiothérapie (ciblé sur la plaie)</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
TTCO21	<b>Traitement par corticothérapie</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
TTATB21	<b>Traitement par antibiotique</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
<u>Si oui</u>	<b>Code antibiotique :</b>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	<b>Code antibiotique :</b>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	<b>Code antibiotique :</b>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

### EVALUATION J21 - 3/4

NUMET :	Numéro patient	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
NOM	Nom : 3 premières lettres	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
PRENOM	Prénom : 2 premières lettres	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

### Soins locaux

NET21	<b>Nettoyage</b> : (1) sérum physiologique, (2) eau, (3) décontamination	<input type="checkbox"/>
PSTP21	<b>Pansement primaire</b> : (1) interface, (2) alginate, (3) hydrofibre, (4) hydrocellulaire, (5) autre <i>Si autre précisez en clair :</i>	<input type="checkbox"/>

#### Pansement(s) secondaire(s) :

**Répondre à toutes les questions**

PSTSC21	Charbon : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
PSTSCAC21	Compresse absorbante : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
PSTSH21	Hydrocellulaire : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
PSTSA21	Alginate : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
PSTSHY21	Hydrofibre : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
PSTSAU21	Autre : (0) non, (1) oui <i>Si autre précisez en clair :</i>	<input type="checkbox"/>

BACLOC21	<b>Bactéricide local</b> : (1) acticoat, (2) release Ag, (3) aquacel Ag, (4) hydrocellulaire Ag, (5) bétadine dermique, (6) bétadine crème, (7) hibitane, (8) PHMB, (9) antibiotique local, (10) autre	<input type="checkbox"/>
----------	---	--------------------------

### Prélèvements

- PCUR21 **Prélèvements à la curette** : (0) non, (1) oui
- RPSU21 **Recueil pansement usager** : (0) non, (1) oui

#### EVALUATION J21 – 4/4

NUMET : Numéro patient

NOM Nom : 3 premières lettres

PRENOM Prénom : 2 premières lettres

#### Risques et complications

- RIVI21 **Présence d'un risque vital** : (0) non, (1) oui, (2) modéré
- COCR21 **Colonisation critique** : (0) non, (1) oui
- RINFC21 **Risque d'infection par contiguïté** : (0) non, (1) oui
- EXON21 **Exposition d'organe noble** : (0) non, (1) oui

#### Symptômes de la plaie

- ODEU21 **Odeur** : (0) absence, (1) faible, (2) modéré, (3) intense
- Si > 0 **contrôlée par les soins** : (0) non, (1) oui, (2) partiellement
- EXSU21 **Exsudat** : (0) absence, (1) faible, (2) modéré, (3) intense
- Si > 0 **contrôlé par les soins** : (0) non, (1) oui, (2) partiellement
- SAISP21 **Saignements spontanés** : (0) absence, (1) faible, (2) modéré, (3) intense
- Si > 0 **contrôlés par les soins** : (0) non, (1) oui, (2) partiellement
- SAIPR21 **Saignements provoqués** : (0) absence, (1) faible, (2) modéré, (3) intense
- Si > 0 **contrôlés par les soins** : (0) non, (1) oui, (2) partiellement
- DOUL21 **Douleur lors des soins** : (0) absence, (1) faible, (2) modéré, (3) forte, (4) intense
- Si > 0 **contrôlés par les soins** : (0) non, (1) oui, (2) partiellement
- TTDOUL21 **Traitement lors des soins** : (0) aucun, (1) emla, (2) xyloïne, (3) PM, (4) hypno analgésie, (5) MEOPA, (6) autre



**EVALUATION J42 - 2/4**

NUMET : Numéro patient    
NOM Nom : 3 premières lettres     
PRENOM Prénom : 2 premières lettres

**Traitements**

TTALG42 **Traitement antalgique** : (0) non, (1) oui   
Si oui PAL42 **Palier** : (1) palier 1 (ex. : *paracétamol*), (2) palier 2 (ex.: *Di antalvic*),  
(3) palier 3 (*morphinique*)

TTG42 **Traitement général en cours** : (0) non, (1) oui   
Si oui

TTGCT42 **par chimiothérapie** : (0) non, (1) oui

TTCHT42 **par hormonothérapie** : (0) non, (1) oui

TTGTC42 **par thérapeutique ciblée**: (0) non, (1) oui

TTGAT42 **autre traitement** : (0) non, (1) oui

*si autre : précisez en clair :*

APLA42 **périodes d'aplasie** : (0) non, (1) oui

TTLC42 **Traitement local par chimiothérapie** : (0) non, (1) oui

TTRT42 **Traitement par radiothérapie (ciblé sur la plaie)** : (0) non, (1) oui

TTCO42 **Traitement par corticothérapie** : (0) non, (1) oui

TTATB42 **Traitement par antibiotique** : (0) non, (1) oui

Si oui **Code antibiotique** :      
**Code antibiotique** :      
**Code antibiotique** :

**EVALUATION J42 - 3/4**

NUMET : Numéro patient    
NOM Nom : 3 premières lettres     
PRENOM Prénom : 2 premières lettres

**Soins locaux**

NET42 **Nettoyage** : (1) sérum physiologique, (2) eau, (3) décontamination

PSTP42 **Pansement primaire** : (1) interface, (2) alginate, (3) hydrofibre,  
(4) hydrocellulaire, (5) autre   
*Si autre précisez en clair :*

**Pansement(s) secondaire(s) :**

**Répondre à toutes les questions**

PSTSC42 Charbon : (0) non, (1) oui

PSTSCAC42 Comresse absorbante : (0) non, (1) oui

PSTSH42 Hydrocellulaire : (0) non, (1) oui

PSTSA42 Alginate : (0) non, (1) oui

PSTSHY42 Hydrofibre : (0) non, (1) oui

PSTSAU42 Autre : (0) non, (1) oui

*Si autre précisez en clair :*

BACLOC42 **Bactéricide local :**

(1) acticoat, (2) release Ag, (3) aquacel Ag,  
 (4) hydrocellulaire Ag, (5) bétadine dermique, (6) bétadine crème,  
 (7) hibitane, (8) PHMB, (9) antibiotique local, (10) autre

### Prélèvements

PCUR42 **Prélèvements à la curette :** (0) non, (1) oui

RPSU42 **Recueil pansement usager :** (0) non, (1) oui

### EVALUATION J42 – 4/4

NUMET : Numéro patient

NOM Nom : 3 premières lettres

PRENOM Prénom : 2 premières lettres

### Risques et complications

RIVI42 **Présence d'un risque vital :** (0) non, (1) oui, (2) modéré

COCR42 **Colonisation critique :** (0) non, (1) oui

RINFC42 **Risque d'infection par contiguïté :** (0) non, (1) oui

EXON42 **Exposition d'organe noble :** (0) non, (1) oui

### Symptômes de la plaie

ODEU42 **Odeur :** (0) absence, (1) faible, (2) modéré, (3) intense

Si > 0 **contrôlée par les soins :** (0) non, (1) oui, (2) partiellement

EXSU42 **Exsudat :** (0) absence, (1) faible, (2) modéré, (3) intense

Si > 0 **contrôlé par les soins :** (0) non, (1) oui, (2) partiellement

SAISP42 **Saignements spontanés :** (0) absence, (1) faible, (2) modéré, (3) intense

Si > 0 **contrôlés par les soins :** (0) non, (1) oui, (2) partiellement

SAIPR42 **Saignements provoqués :** (0) absence, (1) faible, (2) modéré, (3) intense

Si > 0 **contrôlés par les soins :** (0) non, (1) oui, (2) partiellement

DOUL42 **Douleur lors des soins :** (0) absence, (1) faible, (2) modéré, (3) forte, (4) intense

Si > 0 **contrôlés par les soins :** (0) non, (1) oui, (2) partiellement

TTDOUL42 **Traitement lors des soins** : (0) aucun, (1) emla, (2) xylolaïne, (3) PM,  
(4) hypno analgésie, (5) MEOPA, (6) autre

**EPISODE INFECTIEUX - 1/3**

**fiche répétitive à  
remplir à chaque épisode infectieux**

NUMET : Numéro patient   
NOM Nom : 3 premières lettres   
PRENOM Prénom : 2 premières lettres

**Date d'apparition l'infection de la plaie**

**Aspect plaie**

LONGI **Longueur en cm (la plus grande)**

LARGI **Largeur en cm (la plus grande)**

APL **Patient en aplatie** : (0) non, (1) oui

PUS **Présence de pus** : (0) non, (1) oui

MODIF **Modification inexplicée du lit de la plaie** : (0) non, (1) oui

TEMP **Fièvre** (0) non, (1) oui   
Si oui **Température** :  ,

QUALPI **Qualité de la peau péri lésionnelle** : (0) saine, (1) inflammatoire,   
(2) irritée, (3) eczématiforme, (4) macérée, (5) autre

PHOTI **Prise photo numérique** : (0) non, (1) oui

**Echelle colorielle**

**4 couleurs** : noir (*nécrose*), jaune (*fibrine*), rouge (*bourgeonnement*), rose (*épithélialisation*)  
**à coder pour chaque couleur en %**

<b>Noir</b>	_ _  %	<b>Rouge</b>	_ _  %
<b>Jaune</b>	_ _  %	<b>Rose</b>	_ _  %

### Présence de biofilm

BIO **Présence de biofilm** : (0) non, (1) oui

### EPISODE INFECTIEUX - 2/3

NUMET : Numéro patient   
 NOM Nom : 3 premières lettres   
 PRENOM Prénom : 2 premières lettres

### Traitements

TTALGI **Traitement antalgique** : (0) non, (1) oui   
 Si oui PAL **Palier** : (1) palier 1 (ex. : *paracétamol*), (2) palier 2 (ex.: *Di antalvic*),   
 (3) palier 3 (*morphinique*)

TTATB0 **Traitement par antibiotique** : (0) non, (1) oui   
 Si oui **Code antibiotique** :   
**Code antibiotique** :   
**Code antibiotique** :

### Soins locaux

NET0 **Nettoyage** : (1) sérum physiologique, (2) eau, (3) décontamination

PSTP0 **Pansement primaire** : (1) interface, (2) alginate, (3) hydrofibre,   
 (4) hydrocellulaire, (5) autre  
 Si autre précisez en clair :

**Pansement(s) secondaire(s) :**

**Répondre à toutes les questions**

PSTSC0 Charbon : (0) non, (1) oui   
 PSTSCAC0 Compresse absorbante : (0) non, (1) oui   
 PSTSH0 Hydrocellulaire : (0) non, (1) oui   
 PSTSA0 Alginate : (0) non, (1) oui   
 PSTSHY0 Hydrofibre : (0) non, (1) oui   
 PSTSAU0 Autre : (0) non, (1) oui   
 Si autre précisez en clair :

BACLOC0 **Bactéricide local** :   
 (1) acticoat, (2) release Ag, (3) aquacel Ag,  
 (4) hydrocellulaire Ag, (5) bétadine dermique, (6) bétadine crème,  
 (7) hibitane, (8) PHMB, (9) antibiotique local, (10) autre

**EPISODE INFECTIEUX 3/3**

NUMET	Numéro patient	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
NOM	Nom : 3 premières lettres	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
PRENOM	Prénom : 2 premières lettres	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

**Prélèvements**

PCURI	<b>Prélèvements à la curette</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
RPSUI	<b>Recueil pansement usager</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
NFS	<b>NFS</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
CRP	<b>CRP</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
PCT	<b>PCT</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>

**Risques et complications**

RIVI	<b>Présence d'un risque vital</b> : (0) non, (1) oui, (2) modéré	<input type="checkbox"/>
RINFCI	<b>Infection par contiguïté</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
EXONI	<b>Exposition d'organe noble</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>

**Symptômes de la plaie**

ODEUI	<b>Odeur</b> : (0) absence, (1) faible, (2) modéré, (3) intense	<input type="checkbox"/>
<u>Si &gt; 0</u>	<b>contrôlée par les soins</b> : (0) non, (1) oui, (2) partiellement	<input type="checkbox"/>
EXSUI	<b>Exsudat</b> : (0) absence, (1) faible, (2) modéré, (3) intense	<input type="checkbox"/>
<u>Si &gt; 0</u>	<b>contrôlé par les soins</b> : (0) non, (1) oui, (2) partiellement	<input type="checkbox"/>
SAISPI	<b>Saignements spontanés</b> : (0) absence, (1) faible, (2) modéré, (3) intense	<input type="checkbox"/>
<u>Si &gt; 0</u>	<b>contrôlés par les soins</b> : (0) non, (1) oui, (2) partiellement	<input type="checkbox"/>
SAIPRI	<b>Saignements provoqués</b> : (0) absence, (1) faible, (2) modéré, (3) intense	<input type="checkbox"/>
<u>Si &gt; 0</u>	<b>contrôlés par les soins</b> : (0) non, (1) oui, (2) partiellement	<input type="checkbox"/>
DOULI	<b>Douleur lors des soins</b> : (0) absence, (1) faible, (2) modéré, (3) forte, (4) intense	<input type="checkbox"/>
<u>Si &gt; 0</u>	<b>contrôlés par les soins</b> : (0) non, (1) oui, (2) partiellement	<input type="checkbox"/>
TDDOULI	<b>Traitement lors des soins</b> : (0) aucun, (1) emla, (2) xyloïne, (3) PM, (4) hypno analgésie, (5) MEOPA, (6) autre	<input type="checkbox"/>

**VALIDATION DES DONNEES**

NUMET :	Numéro patient	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
NOM	Nom : 3 premières lettres	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
PRENOM	Prénom : 2 premières lettres	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

ARRET	<b>Arrêt prématuré de l'étude</b> : (0) non, (1) oui	<input type="checkbox"/>
-------	--	--------------------------

Si oui

DATAR : **Date d'arrêt**

|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_2\_|\_|\_|\_|\_|

CAUSE : **Cause de l'arrêt** :

|\_|

- (1) refus du patient de poursuivre
- (2) PDV
- (3) Décès
- (4) autre : à préciser

*Je soussigné(e), Docteur* \_\_\_\_\_,

***Investigateur (trice), certifie l'exactitude des données qui ont été reportées dans le cahier d'observation.***

**Date** |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_2\_|\_|\_|\_|\_| **Signature :**

**Examen bactériologique J0 – 1/2**

NUMET :	Numéro patient	_ _
NOM	3 premières lettres	_ _
PRENOM	2 premières lettres	_
DATNAI	Date de naissance	_ _ _ _ _ _ _

DATPRE : Date du prélèvement |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

TTFLA : Traitement par Flagyl : (0) non, (1) oui per os, (2) oui local |\_|

**Si oui** DATFLA : Date du début du traitement |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

**TTANT** Antibiothérapie associée : (0) non , (1) oui |\_|

**Si oui :**

Traitement	Date début de traitement	Code infection en cause
_ _ _	_ _ _ _ _ _ _	_ _ _
_ _ _	_ _ _ _ _ _ _	_ _ _
_ _ _	_ _ _ _ _ _ _	_ _ _
_ _ _	_ _ _ _ _ _ _	_ _ _

**TTFUNG** Traitement antifongique : (0) non , (1) oui |\_|

Germes aerobie et/ou anaerobie : (0) non , (1) oui <span style="float:right"> _ </span> <b>si oui :</b>		Germes anaerobie : (0) non , (1) oui <span style="float:right"> _ </span> <b>si oui :</b>	
Code germe	Quantité	Code germe	Quantité
_ _ _ _ _	_1_ _0_ _	_ _ _ _ _	_1_ _0_ _
_ _ _ _ _	_1_ _0_ _	_ _ _ _ _	_1_ _0_ _
_ _ _ _ _	_1_ _0_ _	_ _ _ _ _	_1_ _0_ _
_ _ _ _ _	_1_ _0_ _	_ _ _ _ _	_1_ _0_ _
_ _ _ _ _	_1_ _0_ _	_ _ _ _ _	_1_ _0_ _
_ _ _ _ _	_1_ _0_ _	_ _ _ _ _	_1_ _0_ _

**Examen bactériologique J0- 2/2**

**LEV** Présence de levures : (0) non , (1) oui |\_|

**Si oui :**

Code germe	Code germe

**Examen bactériologique J 21      1/2**

NUMET :	Numéro patient	
NOM	3 premières lettres	
PRENOM	2 premières lettres	
DATNAI	Date de naissance	

DATPRE :      Date du prélèvement     

TTFLA :      Traitement par Flagyl : (0) non, (1) oui     

**Si oui**      DATFLA : Date du début du traitement     

**TTANT**      Antibiothérapie associée : (0) non , (1) oui     

**Si oui :**

Traitement	Date début de traitement	Code infection en cause

**TTFUNG**      Traitement antifongique : (0) non , (1) oui     

Germes aerobie et/ou anaerobie : (0) non , (1) oui <input type="text"/>		Germes anaerobie : (0) non , (1) oui <input type="text"/>	
<b>si oui :</b>		<b>si oui :</b>	
Code germe	Quantité	Code germe	Quantité



si oui :		si oui :	
Code germe	Quantité	Code germe	Quantité
□□□□□□	□1□0□□	□□□□□□	□1□0□□
□□□□□□	□1□0□□	□□□□□□	□1□0□□
□□□□□□	□1□0□□	□□□□□□	□1□0□□
□□□□□□	□1□0□□	□□□□□□	□1□0□□
□□□□□□	□1□0□□	□□□□□□	□1□0□□
□□□□□□	□1□0□□	□□□□□□	□1□0□□

**Examen bactériologique J 42      2/2**

**LEV**      Présence de levures : (0) non , (1) oui      □□  
**Si oui :**

Code germe	Code germe
□□□□□□	□□□□□□
□□□□□□	□□□□□□

## Annexe 5 – Publications (en rapport avec le sujet de thèse)

- 2 publications en cours de rédaction, pour des soumissions dans des revues avec un comité de lecture international.
- Meaume S, Kerihuel JC, Fromantin I, Téot L. Workload and prevalence of open wounds in the community: French Vulnus initiative. *J Wound Care*. 2012 ; 21(2):62, 64, 66
- Fromantin I, Seyer D. Biofilm et ulcère. *Soins*. 2012;(762):53
- Cottu PH, Fourchette V, Vincent-Salomon A, Kriegel I, Fromantin I. Necrosis in breast cancer patients with skin metastases receiving bevacizumab-based therapy. *J Wound Care*. 2011; 20(9):403-4, 406, 408
- Fromantin I, Baffie A, Rollot Trad F. Infection, plaies et traitements locaux. *Soins*. 2011;(756):23-4, 26-7
- Fromantin I, Larreta Garde V, Seyer D. Biofilm et détersion. *Soins*. 2011;(752):56
- Fromantin I. Détersion des plaies tumorales. *Soins*. 2011;(752):53.
- Dolbeault S, Flahault C, Baffie A, Fromantin I. Psychological profile of patients with neglected malignant wounds: a qualitative exploratory study. *J Wound Care*. 2010; 19(12): 513-4, 516, 418-21
- Ferris FD, Al Khateib AA, Fromantin I, Hoplamazian L, Hurd T, Krasner DL, Maida V, Price P, Rich-Vanderbij L. Palliative wound care: managing chronic wounds across life's continuum: a consensus statement from the International Palliative Wound Care Initiative. *J Palliat Med*. 2007; 10(1):37-9.