

UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



FACULTÉ DE MÉDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE



Année 2018

N° 25

**Micro méthodes : applications dans l'identification
et la sensibilité des cocci à Gram positif**

MASTER DE MICROBIOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUÉE

PRÉSENTÉ ET SOUTENU PUBLIQUEMENT LE 03 Mars 2018

PAR M^{lle} Aminata DIOP NÉE LE 27 Décembre 1991 à THIÈS

MEMBRES DU JURY

Présidente :	Mme KANE Ndeye Coumba TOURE	Professeur
Membres :	M. Makhtar CAMARA	Maître conférence agrégé
	M. Babacar MBENGUE	Maître conférence agrégé
Directeur mémoire :	M. Cheikh Saad-Bouh BOYE	Professeur
Co-directeur :	M. Assane DIENG	Assistant

*‘‘Au nom d’Allah Le Tout Puissant, le Clément,
le Miséricordieux. Louange à Toi, Seigneur de
l’univers, Maître du Jour de la rétribution,
Guide-nous dans le droit chemin, celui de ceux
que Tu as comblé de faveurs et non pas de ceux
qui ont encouru Ta colère, ni des égarés. » Paix et
Salut sur Son Prophète Mouhamed’’*

DÉDICACES

Je dédie ce travail à :

À mon papa El Hadj Abdou Aziz DIOP :

À toi dont la bonté ne cessera jamais de me surprendre, tu es ma force, mon plus grand amour, mon armure contre vents et marées. Ton amour me rend forte et ta tristesse me fait souffrir. Tu représentes pour moi, ce petit rayon de soleil qui apparaît après une pluie intense. Sois assuré de mon amour, de ma reconnaissance...

À Papa Amadou DIOP

Je ne fais aucune distinction entre Pa Abdou et toi. Aucun mot ne saurait suffire pour te témoigner ma reconnaissance pour toutes ces années. Tu m'as vu naître et grandir. Témoin de mes échecs et de mes réussites, tu as toujours su trouver les mots justes. Merci de prendre aussi bien soin de moi et de t'impliquer autant dans ma vie. Que le bon DIEU te garde...

À ma mère Coumba et à mes tantes : Aminata NDIAYE et Mame Awa SAMB

Chacune à sa manière a su m'inculquer une éducation, un sens moral, des valeurs. Merci pour tout cela. Je vous aime.

À mes frères et sœurs

Vous m'avez éduquée et avaient fait de moi ce que je suis aujourd'hui. J'ai toujours su trouver soutien et amour en chacun de vous. Aucun mot ne saurait définir toute la tendresse et le respect que j'ai pour vous. Soyez assurés de ma gratitude et de mon éternel amour. Vous êtes mon trésor le plus précieux.

À mes oncles Magatte NDIAYE, Atoumane FALL, Ndiouga SOCK et Abdoulaye GAYE

Mention spéciale pour vous. Je ne saurais même pas quels mots utilisés afin de vous témoigner ma gratitude pour toutes ces années où vous n'avez cessé de m'accompagner. Chacun de vous est d'une certaine manière l'artisan de ceci. Merci.

À ma cousine et grande amie Aida DIOP

Ce qui nous lie l'une à l'autre va au-delà des liens du sang. Durant toutes ces années tu m'as accompagnée, soutenue et supportée mes plaintes sans jamais t'en plaindre. Sois donc assurée de ma reconnaissance, ma loyauté et surtout de mon éternel amour.

Tu es ma meilleure...

À la famille SECK

Vous m'avez adoptée et accueillie sans rien attendre en retour. Avec vous j'ai compris qu'être sœurs ne voulait pas forcément dire partager les mêmes liens du sang. Laissez-moi donc vous témoigner toute ma gratitude.

À ma marraine Ndeye Magatte BEYE

Symbole de vertu, femme de conviction, tu incarnes l'image d'un modèle à suivre tant dans la religion que du point de vu professionnel. Merci de m'avoir autant accompagnée durant ces deux années et surtout merci de m'inciter autant à être dans le droit chemin. Puisse le tout puissant veiller sur toi.

À toute l'équipe Micro-CSB : Amadou DIOP, Ablaye DIOP, Nafissatou SAMB, Dior, Amina

J'ai l'intime conviction qu'un jour, quelque chose de vraiment merveilleux s'attachera à vos noms. Votre abnégation et votre sérieux dans le travail me pousse à toujours me remettre en question. En deux ans j'ai énormément appris avec vous et j'espère que ça continuera à être le cas. Merci, ce travail est aussi le vôtre.

À tous mes amis et surtout à vous mes chères Anita, Mamy et Sofia

Vous m'avez toujours encouragé et de pris soin de moi. Votre amour et votre soutien n'ont cessé de m'accompagner et cela depuis que nous nous sommes connues.

Vous avez toute ma reconnaissance.

À ma sœur et amie Fa Gueye SOW

Même les aveugles sont capables de voir cet amour si fort que tu me portes. Merci d'être tout le temps à mon chevet, je te porte au plus profond de mon cœur.

À mes camarades de promo : Awa, Fatou, Ibrahima, Bernice, Islamiath...

J'ai adoré vous côtoyer durant ces années. Nos échanges et discussions m'ont énormément servis. Je vous souhaite le meilleur.

À mes tantes, oncles, cousins et cousines...

Ce travail est aussi le vôtre, merci pour votre soutien sans faille...

Toutes mes pensées à mon ami et frère : Papa Mamadou SOW

Je donnerai cher afin que tu sois à mes côtés en ce moment. Parler de toi me noie dans une douleur tellement profonde. Plus que mon ami, tu as été un frère pour moi, un refuge pendant des moments de tristesse, une échappatoire à chacune de mes peines.

Reposes en paix cher et tendre Ami.

Tu seras à jamais gravé dans mon cœur.

REMERCIEMENTS

Mes vives remerciements vont à l'endroit du :

-Professeur Cheikh Saad-Bouh BOYE

Pour m'avoir adoptée et accompagnée depuis le début. Vous avez été d'une grande aide en m'ouvrant les portes de votre laboratoire et en me faisant découvrir ce monde merveilleux qu'est la recherche. Le savoir est l'un des trésors les plus précieux au monde et seuls les plus humbles sont capables de le partager. MERCI.

-Docteur Assane Dieng

Malgré votre emploi du temps chargé vous avez pris le temps de m'encadrer et de corriger mon travail. Aucun mot ne me semble assez éloquent pour vous témoigner ma reconnaissance pour chaque minute passée à rendre ce document meilleur. Laissez-moi donc-vous témoigner toute ma gratitude. Que le gardien de la foi soit votre éternel compagnon.

-Professeur Ndeye Coumba KANE TOURE

Votre amabilité, vos qualités intellectuelles et votre rigueur nous a énormément marqué. La clarté et la richesse de vos enseignements ont largement contribué à la réalisation de ce document. C est un honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury malgré votre emploi du temps chargé. Permettez nous donc de vous exprimer toute notre reconnaissance.

-Professeur Babacar MBENGUE

Votre simplicité, votre disponibilité et votre rigueur dans le travail forcent l'admiration et le respect. Recevez nos sincères remerciements et le témoignage de notre gratitude.

-Professeur Makhtar CAMARA

Votre sérieux dans le travail vous vaut une très bonne réputation. En acceptant de juger ce travail, vous nous faites un grand honneur.

Soyez assuré très cher maître, de notre haute considération et de notre reconnaissance.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

µg : Micro gramme

µl : Micro litre

ABG : Antibiogramme

ADH : Arginine Dihydrolase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine Diphosphate

AMC : Acétyl-Méthyl-Carbinol

AMD : Amidon

API : Appareil et Procédé d'Identification

ARA : Arabinose

ARN : Acide Ribonucléique

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine Triphosphate

BAC : Bacitracine

BCP : Bromocrésol Pourpre

BGT : Bouillon Glucosé Tamponné

BHS : Bouillon Hypersalé

BTS : Bouillon Trypticase Soja

C : Cytosine

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

Cat : Catalase

CCI : Concentration Critique Inférieure

CCS : Concentration Critique Supérieure

CIP : Ciprofloxacine

CO₂ : Dioxyde de Carbone

Coag : Coagulase

CSB : Conscience Scientifique pour le Bien-être

DNase : Désoxyribonucléase

E : Erhthromycine

ESC : Esculine

G : Guanine

GEN : Gentamicine

GLU : Glucide

GSO : Gélose au Sang Ordinaire

H : Heure

INU : Inuline

KOH : Hydroxyde de potassium

LAC: Lactose

LVX: Lévoﬂoxacine

MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight mass

MAN : Mannitol

MEVAG : Milieu d'Etude de la Voie d'Activation du Glucose

MH : Mueller-Hinton

ml : millilitre

MNE : Mannose

NaCl : Chlorure de sodium

NI : Non Interprétable

NIT : Nitrate

NOV : Novobiocine

ODC : Ornithine Décarboxylase

OMA : Otites Moyen Aigues

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONPG : Ortho-Nitro-Phényl bêta-D-Galactopyranoside

P : Pénicilline

pH : Potentiel hydrogène

R : Résistant

RAF : Raffinose

RIB : Ribose

RP : Rouge de phénol

S : Staphylocoques ou Streptocoques

SAC : Saccharose

SCN : Staphylocoques à Coagulase Négative

SOR : Sorbitol

SOS : Sorbose

ST : Solution de Travail

T : Temps

TC : Témoin Control

TDC : Témoin de décarboxylase

TE : Tétracycline

TEC : Teicoplanine

TRE : Tréhalose

UCAD : Université Cheikh Anta DIOP

VA : Vancomycine

VP : VogesProskauer

VP1 : alpha naphtol à 6%

VP2 : hydroxyde de potassium KOH à 40%

α : Alpha

β : Bêta

Table des matières

INTRODUCTION	1
PREMIÈRE PARTIE :REVUE DE LA LITTÉRATURE	1
I. Généralités sur les staphylocoques :	1
I.1. Phylogénie, taxonomie et classification :	1
I.2. Caractères bactériologiques :	2
I.2.1. Caractères morphologiques :	2
I.2.2. Caractères cultureux :	2
I.2.3. Caractères biochimiques :	5
I.3. Habitat et pouvoir pathogène :	11
II. Généralités sur les streptocoques :	12
II.1. Définition, Historique et Classification :	12
II.2. Habitat et pouvoir pathogène naturel :	14
II.3. Caractères bactériologiques :	16
II.3.1. Caractères morphologiques :	16
II.3.2. Caractères cultureux :	17
II.3.2.1. Culture sur milieux usuels :	17
II.3.2.2. Culture sur milieux enrichis	17
II.3.3. Caractères biochimiques :	18
II.3.3.1. Utilisation des hydrates de carbone :	18
II.3.3.2. Paroi et constitution antigénique	19
II.3.3.3. Absence de catalase	20
II.3.3.4. Sensibilité à la bacitracine:	20
II.3.3.5. Sensibilité à l'optochine :	21
II.3.3.6. Hydrolyse de l'esculine :	21
III. Rappels sur les antibiotiques et méthodes d'étude de la sensibilité :	22
III.1. Les antibiotiques :	22
III.1.1. Définition d'un antibiotique :	22
III.1.2. Mécanismes d'action des antibiotiques :	22
III.1.2.1. Action sur la paroi bactérienne :	22
III.1.2.2. Action sur la membrane des cellules :	22
III.1.2.3. Action sur l'ADN :	23
III.1.2.4. Action sur le ribosome bactérien :	23

III.1.3. Classification des antibiotiques :	23
III.1.3.1. LES β -LACTAMINES :	23
III.1.3.1. Les aminosides :	24
III.1.3.3. Macrolides, Lincosamides, Streptogramines (MLS) :	24
III.1.3.4. Les cyclines :	24
III.1.3.5. Les phénicolés :	25
III.1.3.6. Les quinolones :	25
III.1.3.7. Les polypeptides :	25
III.2. Méthodes d'étude de la sensibilité aux antibiotiques:	25
III.2.1. Méthode de diffusion : antibiogramme standard	25
III.2.2. E-test® (epsilon-meter-test)	26
III.2.3. Les Micro méthodes d'étude <i>in vitro</i> de la sensibilité :	26
DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE	30
I. Cadre d'étude	31
II. Souches bactériennes	31
III. Matériel et réactifs	31
III.1. Matériel pour l'identification	31
III.2. Matériel pour la préparation de l'inoculum	32
III.3. Matériel pour l'étude de la sensibilité	32
III.4. Matériel pour la conservation des souches	32
III.5. Milieux pour l'isolement, l'enrichissement et la conservation des souches	32
III.6. Milieux pour l'identification et l'étude de la sensibilité	33
III.7. Réactifs pour l'identification des souches	33
IV. Méthodologie	34
IV.1. Ré-isolement et ré-identification des souches bactériennes par méthodes classiques	34
IV.2. Identification par la micro méthode micro-CSB®	34
IV.2.1. Préparation des milieux de culture liquides	34
IV.2.1.1. Contrôle de qualité des milieux liquides	34
IV.2.1.2. Distribution et déshydratation des milieux	35
IV.2.1.2.1. Distribution des milieux liquides	35
IV.2.1.2.2. Déshydratation des milieux	36
IV.2.1.3. Contrôle qualité des microplaques déshydratées	37
IV.2.2. Mode opératoire de la microplaque CSB® pour l'identification des souches	37

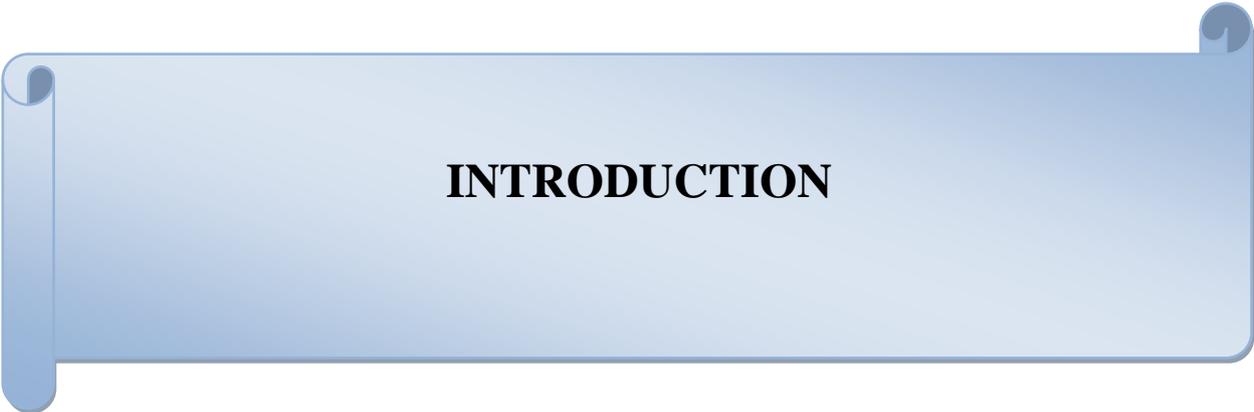
IV.2.2.1. Ensemencement et incubation.....	37
IV.2.2.2. Lecture et interprétation	38
IV.2.2.3. Calcul de probabilités.....	40
IV.2.2.4. Validation de la méthode	41
IV.3. Étude de la sensibilité aux antibiotiques par micro méthode Micro-CSB®	42
IV.3.1. Préparation du bouillon MH	42
IV.3.2. Contrôle qualité du bouillon	43
IV.3.3. Préparation des solutions d'antibiotiques	43
IV.3.4. Mode opératoire de la microplaque CSB® pour l'étude de la sensibilité des souches	44
IV.3.4.1. Distribution et déshydrations des solutions d'antibiotiques :	44
IV.3.4.2. Préparation de l'inoculum	45
IV.3.4.3. Inoculation de la microplaque	45
IV.3.4.4. Lecture et interprétation des résultats	45
IV.3.4.5. Détermination de la sensibilité par ABG standard.....	46
IV.3.4.6. Validation de la méthode	46
IV.3.4.7 Analyses statistiques des données	46
RÉSULTATS	31
DISCUSSION	48
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	56
RÉFÉRENCES	60
ANNEXES	a

Liste des figures

Figure 1 : Caractères morphologiques des staphylocoques [web 1]	2
Figure 2: Différentes manières d'utilisation des glucides [35]	5
Figure 3: Représentation graphique de la glycolyse [web 2]	6
Figure 4: Représentation graphique de la voie d'Entner-Doudoroff [web 3]	7
Figure 5: Représentation graphique de la voie des pentose-phosphates (en parallèle avec la glycolyse) [web 4]	8
Figure 6: Mise en évidence de la production d'acétoïne [21]	8
Figure 7: Mise en évidence de l'action de la β -galactosidase [44]	9
Figure 8: Réaction de décarboxylation des acides aminés [25]	10
Figure 9 : Réaction d'hydrolyse de l'urée [9]	10
Figure 10: Mise en évidence de la nitrate réductase [17]	11
Figure 11: Caractères morphologiques des streptocoques [web 5]	16
Figure 12: Représentation graphique de la fermentation homolactique [45]	19
Figure 13 : Réaction d'hydrolyse de l'esculine [17]	21
Figure 14: Disposition de la microplaque CSB® d'identification des staphylocoques	36
Figure 15 : Disposition de la microplaque CSB® d'identification des streptocoques	36

Liste des tableaux

Tableau I : Classification des staphylocoques (d'après Baird.Parker, 1974) (DUBOIS D, 2010).....	3
Tableau II : Classification simplifiée des staphylocoques cutanés d'origine.....	4
Tableau III: Souches témoins utilisées pour le contrôle d'efficacité des milieux liquides	35
Tableau IV : Lecture et Identification des caractères sur micro-galerie CSB Staph®.....	39
Tableau V: Lecture et Identification des caractères sur micro-galerie CSB Strepto®	40
Tableau VI : Préparation des antibiotiques pour l'étude de la sensibilité des streptocoques...	44
Tableau VII : Préparation des antibiotiques pour l'étude de la sensibilité des staphylocoques	44
Tableau VIII : Profil d'identification de la souche X1 probable <i>S. aureus</i>	48
Tableau IX: Probabilités d'appartenance de souche X1 aux autres espèces	48
Tableau X : Profil d'identification de la souche X2 probable <i>S. saprophyticus</i>	49
Tableau XI : Probabilités d'appartenance de souche X2 aux autres espèces	49
Tableau XII : Profil d'identification de la souche X3 probable <i>S. epidermidis</i>	50
Tableau XIII : Probabilités d'appartenance de la souche X3 aux autres espèces	50
Tableau XIV : Caractères d'identification de la souche X4 probable <i>E. faecalis</i>	51
Tableau XV: Probabilités d'appartenance de la souche X4 aux autres espèces	51
Tableau XVI : Caractères bactériologiques de la souche X5 probable <i>S.agalactiae</i>	52
Tableau XVII: Probabilités d'appartenance de la souche X5 aux autres espèces.....	52
Tableau XVIII: Caractères d'identification de la souche X6 probable <i>S.pyogenes</i>	53
Tableau XIX : Probabilités d'appartenance de la souche X6 aux autres espèces	53
Tableau XX: Profil de sensibilité de <i>Staphylococcus aureus</i> par Micro méthode.....	54
Tableau XXI : Profil de sensibilité de <i>Staphylococcus aureus</i> par ABG standard	54
Tableau XXII : Profil de sensibilité de <i>Streptococcus agalactiae</i> par Micro méthode.....	55
Tableau XXIII : Profil de sensibilité de <i>Streptococcus agalactiae</i> par ABG standard.....	55
Tableau XXV: Composition milieu Esculine.....	67
Tableau XXVII: Composition milieu BHS	68
Tableau XXIX: Composition milieu Clark et Lubs	69
Tableau XXXI : Composition milieu Moeller : décarboxylases	70
Tableau XXXIII: Composition milieu nitrate	71
Tableau XXXV : Composition milieu urée-tryptophane	72
Tableau XXXVII: Composition milieu ONPG	73
Tableau XXXIX : Composition milieu MEVAG Staph/ Strepto.....	73
Tableau XLI : Méthode de stérilisation des sucres (annexe 9)	74



INTRODUCTION

La microbiologie médicale s'intéresse énormément aux germes dits pathogènes causant de façon très fréquente des infections. Les infections bactériennes dues aux staphylocoques, streptocoques et entérocoques sont diverses, du point de vue de leurs manifestations cliniques.

En effet, les staphylocoques sont responsables, chez l'homme, d'infections qui peuvent être localisées et de propagation directe en atteignant essentiellement le revêtement cutané ; elles peuvent aussi diffuser par voie sanguine en prenant un caractère septicémique avec un polymorphisme symptomatique extrême [18].

Les streptocoques et les entérocoques jouent aussi un rôle important dans la pathologie infectieuse humaine. La plupart, sont des commensaux habituels des cavités naturelles ou des téguments. Cette flore commensale peut devenir pathogène et être responsable d'infections qui sont parmi les plus sévères et les plus fréquentes [1,20].

La récurrence des infections dues aux cocci témoigne non seulement des difficultés liées à leur identification mais aussi à la multi-résistance de plusieurs souches.

En milieu hospitalier, il est donc impératif d'identifier de manière fiable et rapide les germes à l'origine des infections et d'établir leur profil de sensibilité aux antibiotiques pour une bonne prise en charge des patients.

Ainsi, plusieurs méthodes d'identification et d'étude de la sensibilité (méthodes automatisées ou semi automatisées) ont déjà été créées et leur fiabilité ainsi que leur efficacité ne sont plus à démontrer. Seulement le coût est assez élevé par rapport au niveau de vie dans les pays en développement comme le nôtre [35].

Face à l'inaccessibilité financière de la majorité des laboratoires de pays à ressources limitées à ces méthodes, l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du Laboratoire de Bactériologie et Virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec a mis au point des micro-méthodes d'identification et d'étude de la sensibilité, simples, fiables et peu onéreuses : les plaques micro-CSB.

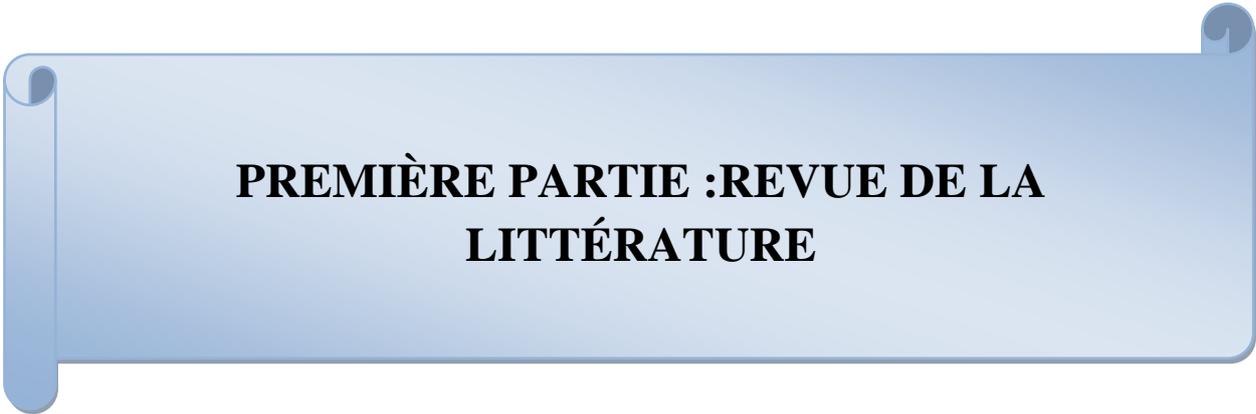
La fiabilité de ces plaques n'est aujourd'hui plus à prouver. Le seul handicap auquel elles font face est le délai de lecture (12-24 heures) [9, 25,35].

C'est dans ce contexte que nous avons mené cette étude dont l'objectif principal était d'étudier les possibilités de réduire de 12 à 6 heures le délai d'identification et d'étude de la sensibilité des cocci Gram positif par galeries MicroCSB®.

Les objectifs spécifiques étaient donc de valider les méthodes utilisées aussi bien pour l'identification que pour l'étude de la sensibilité des germes étudiés.

Ce présent travail s'articule autour des points suivants :

- Une première partie relative aux généralités sur les cocci à Gram positif et les antibiotiques.
- Une seconde partie où seront exposés la méthodologie et les différents résultats et commentaires de nos travaux.



**PREMIÈRE PARTIE :REVUE DE LA
LITTÉRATURE**

PREMIÈRE PARTIE : REVUE DE LA LITTÉRATURE

Les cocci à Gram positif sont des bactéries de forme sphérique, appartenant à la famille des micrococcaceae. Ces bactéries regroupent des germes pathogènes parmi lesquels on peut citer les staphylocoques et les streptocoques [17].

I. Généralités sur les staphylocoques :

I.1. Phylogénie, taxonomie et classification :

Les staphylocoques, cocci à Gram positif ont été découverts par d'imminents microbiologistes, comme : Koch, Pasteur, Ogston, Rosenbach [42].

Dans la classification actuelle, on distingue 36 espèces et 9 sous-espèces [12] selon les critères suivants :

- le taux d'hybridation ADN/ADN ;
- la stabilité des hybrides ;
- les caractères phénotypiques [26].

Les espèces de staphylocoques sont ainsi regroupées en six principaux groupes :

- groupe *S. epidermidis* ;
- groupe *S. saprophyticus* ;
- groupe *S. simulans* ;
- groupe *S. sciuri* ;
- groupe *S. hyicus* ;
- groupe *S. intermedius*[17]

Les staphylocoques peuvent être classés selon plusieurs caractères : biochimiques, antigéniques, pathogéniques, enzymatiques [26], etc., mais aussi par le pourcentage (Guanine+Cytosine) [17]. Il n'existe pas une classification unique universelle mais des classifications [39].

La classification de **Baird-Parker** ne reconnaît que *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus* comme espèces de staphylocoques bien déterminées avec 4 biotypes pour chaque espèce [48].

La classification de **Kloos** et **Schleifer** ne reconnaît que dix espèces dans le genre staphylocoque avec 15% des espèces de staphylocoques non classés [48].

I.2. Caractères bactériologiques :

I.2.1. Caractères morphologiques :

Ce sont des cocci à Gram positif de 0,8 à 1 µm de diamètre, de forme sphéroïde isolés ou groupés en diplocoques, en courtes chaînettes ou en amas, ayant la forme de grappe de raisin. Ils sont immobiles, non sporulés mais parfois encapsulés [29, 32].



Figure 1 : Caractères morphologiques des staphylocoques [web 1]

I.2.2. Caractères cultureux :

La culture des staphylocoques se fait dans une atmosphère aérobie et humide [15].

Staphylococcus aureus est un germe aéro-anaérobie facultatif. Il croit abondamment sur milieu gélosé ; sur milieux ordinaires, la culture est obtenue en 18 à 24h. *S. aureus* pousse en présence de fortes concentrations salines (milieu sélectif Chapman).

En bouillon ordinaire, les staphylocoques se multiplient en quelques heures, formant un trouble homogène ou un dépôt. Sur gélose, les colonies sont lisses, bombées, brillantes et régulières avec un diamètre de 1-3 mm [15].

La plupart des souches de *S. aureus* élaborent un pigment qui donne une couleur jaune-orangé aux colonies, les colonies de *Staphylococcus epidermidis* donnent un pigment « blanc porcelaine ».

La température de croissance est entre +30°C et +45°C avec un optimum à 37°C et le pH varie entre 4,8 à 9,4 avec un optimum à 7,5 [16].

Il existe des colonies naines de *S. aureus* provenant de milieux contenant certains sels minéraux (chlorure de lithium ou de baryum), certains colorants (violet de gentiane, acrydine orange), certains antibiotiques (methicilline, aminoside) ou provenant de prélèvements de patients mis sous antibiotiques. Ces souches retrouvent généralement leurs caractères cultureux normaux après une ou deux subcultures [19].

Les caractères cultureux, physiologiques et métaboliques des espèces de staphylocoques ont été donnés dans les tableaux I et II.

Tableau I : Classification des staphylocoques (d'après Baird.Parker, 1974) (**DUBOIS D, 2010**)

<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Coagulase	+	-	-
Acidification aérobie du mannitol	+	d	d
Acidification anaérobie du mannitol	+	-	-
Production d' α - toxine	+	-	-
Nucléase thermostable	+	-	-
Exigence en biotine	-	+	NT
Acide ribitolteichoïque pariétal	+	-	+
Acide glycérol teichoïque pariétal	-	+	+
Protéine A pariétale	+	-	-
Sensibilité à la novobiocine	S	S	R

Légende : + : 90p.100 ou plus de souches positives ; - : 90p.100 ou plus de souches négatives ; d : moins de 50p.100 de souches positives ou négatives ; NT : non teste ; S : sensible ; R : résistant.

Tableau II : Classification simplifiée des staphylocoques cutanés d'origine humaine (d'après Kloos et Schleifer 1975)(DUBOIS D, 2010)

<i>Staphylococcus</i>	Diamètres des colonies (5j>5mm)	Croissance anaérobie en thioglycate	lystostaphine (R à 50 µg/ml)	Hémolyse (érythrocytes de bœuf)	Réduction du nitrate	Phosphatase	Novobiocine (R à 1,6µg/ml)	Coagulase	Fructose	Galactose	Mannose	Xylose/Arabinose	Ribose	Maltose	Lactose	Saccharose	Tréhalose	Turanose	Mélezitose	Mannitol	Xylitol
<i>Aureus</i>	+	+	-	(+)	+	+	-	+	+	+	(+)	-	+	+	(+)	+	+	(+)	-	+	-
<i>Saprophyticus</i>	+	+/-	+	-	-	(-)	+	-	+	-	-	-	-	+	(+)	+	+	+	-	+	+/-
<i>Epidermidis</i>	-	+	+	+/-	+/-	+	-	-	+	(+)	(+)	-	-	+	(+)	+	-	V	(-)	-	-
<i>Haemolyticus</i>	(+)	±C	+	(+)	+	(-)	-	-	-+	V	-	-	(-)	+	-+	+	+	V	-	+/-	-

Légende : + positif ; ± faible ; - : négatif ; V : variable ; ces signes indiquent une fréquence de 90 à 100p.100 ; entre () ils indiquent une fréquence de 70 à 89 p.100 ; ±C : gradient avec de grosses colonies. Dans l'ensemble, *S. epidermidis* a un métabolisme beaucoup plus faible que *S. aureus*.

I.2.3. Caractères biochimiques :

La détermination de l'espèce peut être réalisée à l'aide de galeries biochimiques d'identification. Ces systèmes utilisent des tests d'acidification ou d'assimilation des sucres et des tests enzymatiques [35].

I.2.3.1. Métabolisme glucidique :

Le catabolisme glucidique correspond à la dégradation des molécules de glucose permettant la formation de molécules riches en énergie ou dans un but de synthèse de constituants cellulaires [35].

-Utilisation des hydrates de carbone :

Les glucides sont utilisés de trois manières différentes par les staphylocoques : soit après conversion par l'action d'isoméras, soit après hydrolyse en sucre simple, soit encore, directement s'ils sont fournis sous forme simple (glucose, fructose, etc.).

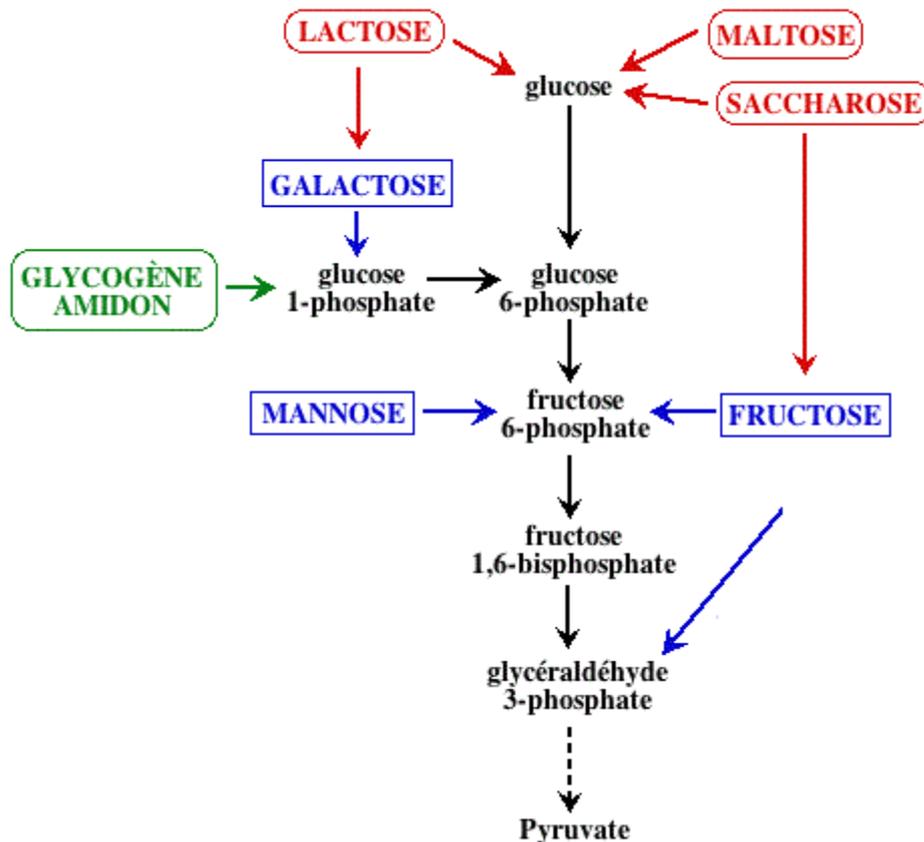


Figure 2: Différentes manières d'utilisation des glucides [35]

L'assimilation étudiée par voie fermentaire, mais également par voie oxydative se traduit presque toujours par l'accumulation de dérivés acides quelle que soit la voie de dégradation. Ces acides sont responsables d'une variation de pH détectée par le virage de la coloration du milieu grâce à un indicateur coloré qui peut être le bromocrésolpoupre (BCP), le rouge de phénol (RP) [35].

Il existe différentes voies de dégradation du glucide que sont :

-La glycolyse (ou voie d'Embden-Meyerhof) : c'est la première chaîne du catabolisme des glucides, elle s'effectue en anaérobie et aboutit à la formation du pyruvate et de molécules riches en énergie. La glycolyse est la principale voie de dégradation du glucide [27].

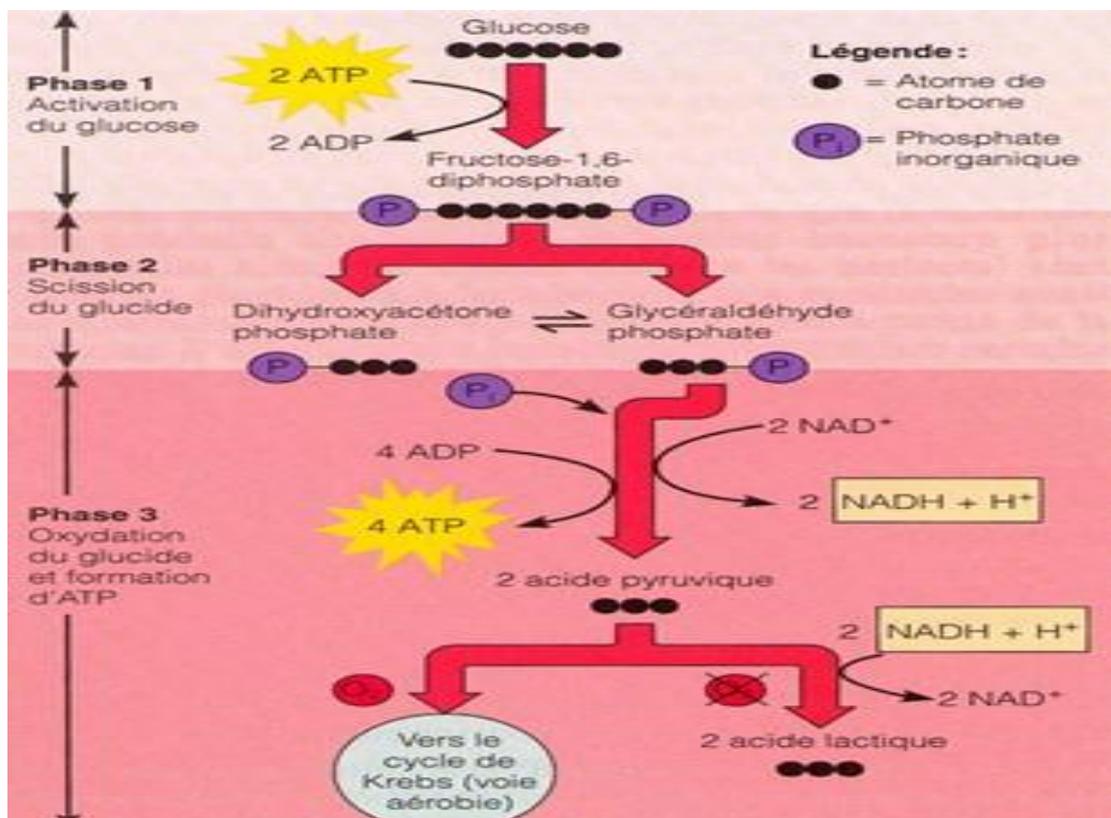


Figure 3: Représentation graphique de la glycolyse [web 2]

-La voie d'Entner-Douroroff : bien que la glycolyse soit la voie la plus commune pour la conversion des hexoses en pyruvate, la voie d'Entner-Douroroff joue un rôle similaire [19].

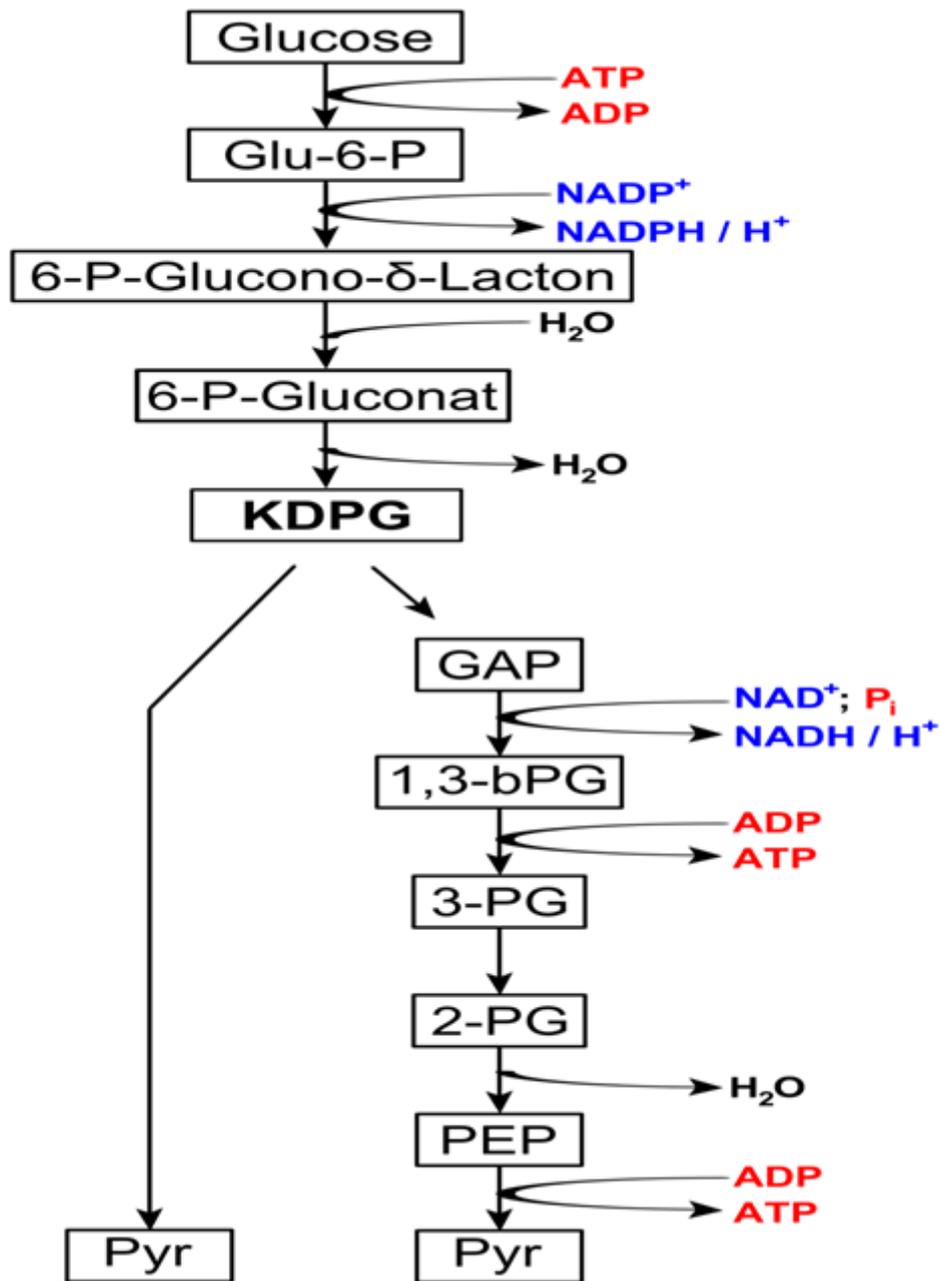


Figure 4: Représentation graphique de la voie d'Entner-Doudoroff [web 3]

-La voie des pentoses-phosphates : La voie des pentoses-phosphates se réalise en parallèle à la glycolyse et permet la formation de **pentose-phosphates** indispensables à la biosynthèse d'acides nucléiques (ADN et ARN) et la formation de **NADPH, H⁺** pour les réactions de biosynthèse [35].

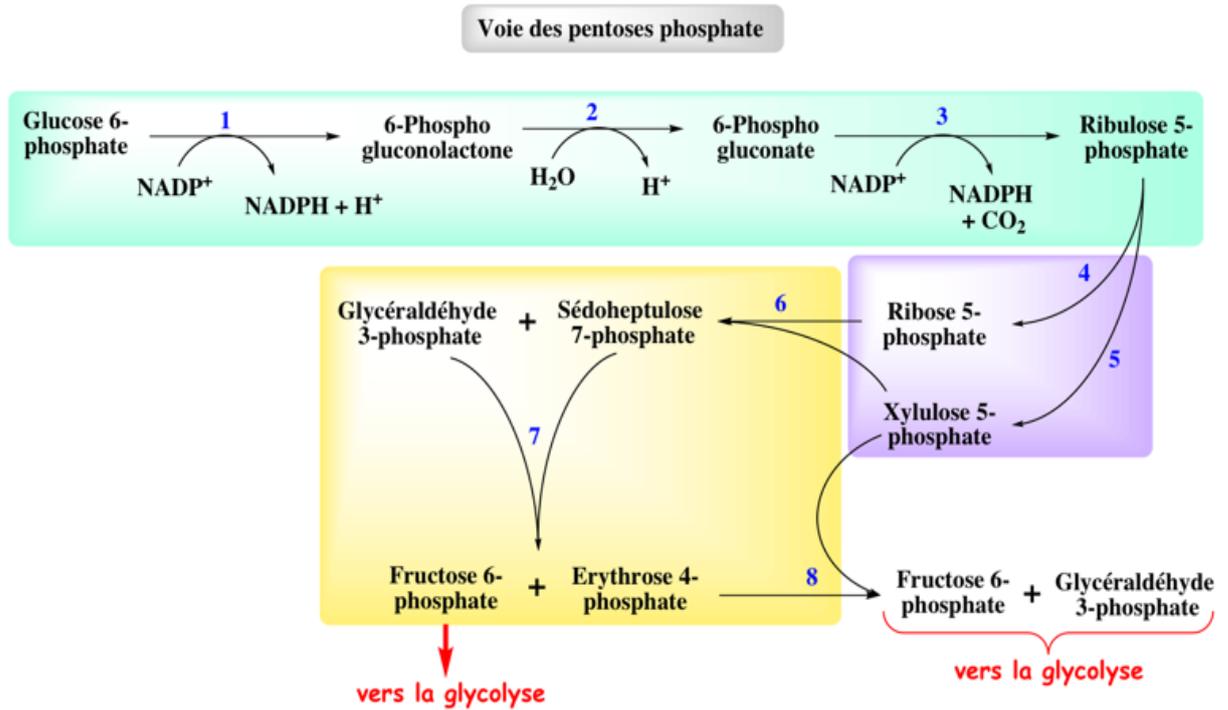


Figure 5: Représentation graphique de la voie des pentose-phosphates (en parallèle avec la glycolyse) [web 4]

-Recherche de la production d'acétoïne

L'acétoïne est un produit de dégradation du glucose au cours de la fermentation du 2-3 butylène glycolique en passant par l'acétolactate et le diacétyl. Elle peut également être obtenue par condensation de deux molécules de pyruvate [3].

En présence d'une base forte, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné (oxydation en diacétyl) [21].

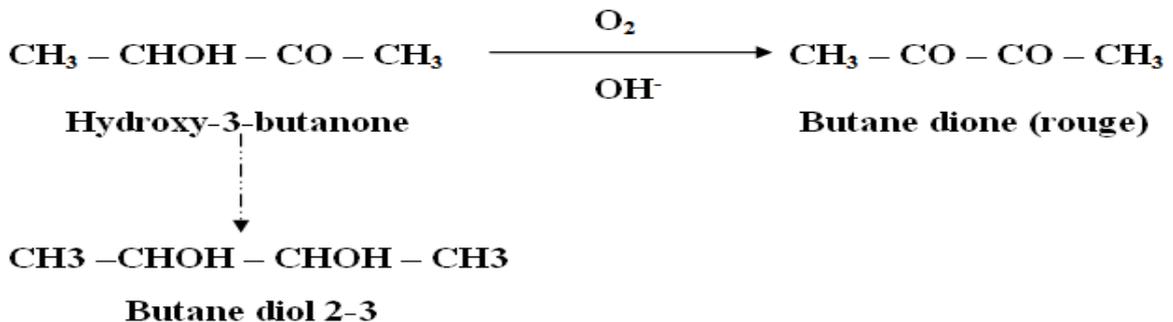


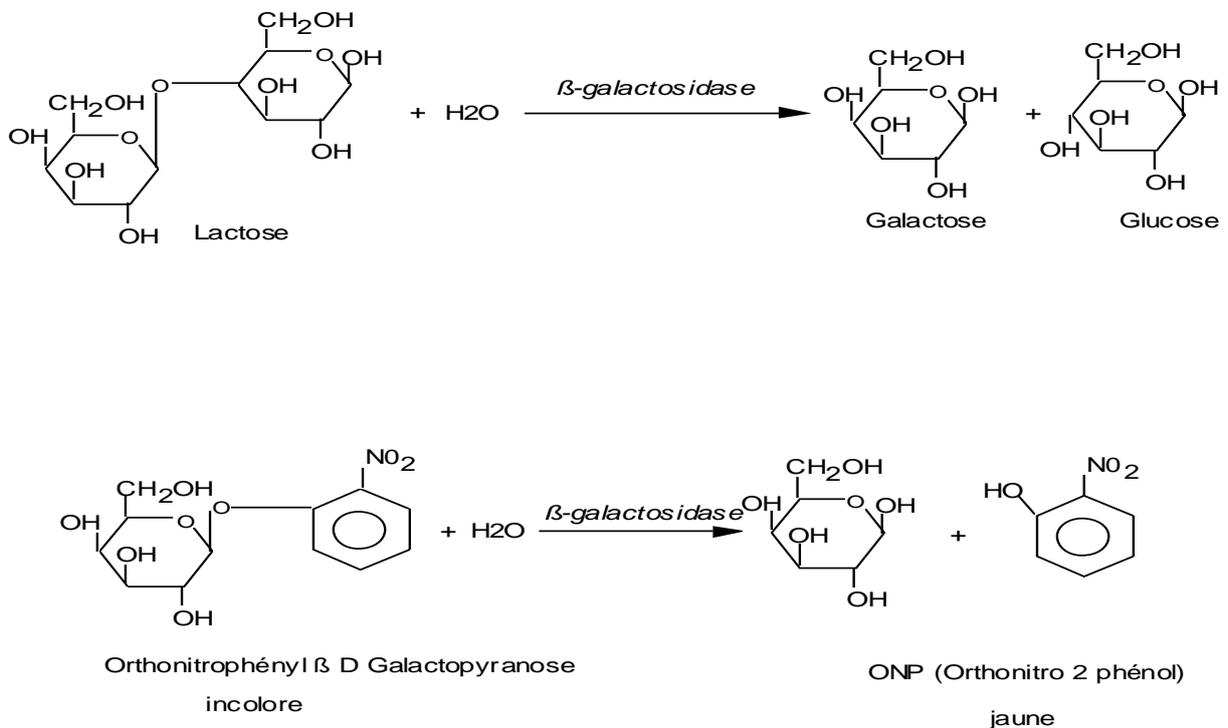
Figure 6: Mise en évidence de la production d'acétoïne [21]

-Recherche de la production de la bêta-galactosidase

Il s'agit d'une recherche particulière de l'étude de la dégradation du lactose, appelée « recherche de la β -galactosidase ».

Les β -galactosidases (lactases) sont des enzymes intracellulaires inductibles. Elles catalysent l'hydrolyse du lactose en galactose et glucose.

L'ONPG, dérivé β -galactoside incolore, est scindé par des ONPG-hydrolases dont les β -galactosidases. Cette réaction libère de l'orthonitrophénol, composé soluble jaune, inductible de la réaction, et une molécule de galactose [44].



I.2.3.1. Métabolisme protidique

-Recherche de décarboxylases

Les décarboxylases sont des enzymes actives à pH acide. Le milieu d'étude sera donc acidifié par la fermentation du glucose, puis ré-alcalinisé par l'action des décarboxylases sur le substrat qui est un acide aminé. Elles scindent les acides aminés au niveau du groupement carboxylique entraînant ainsi la formation de l'amine correspondante avec libération de dioxyde de carbone selon la réaction suivante [25, 48].

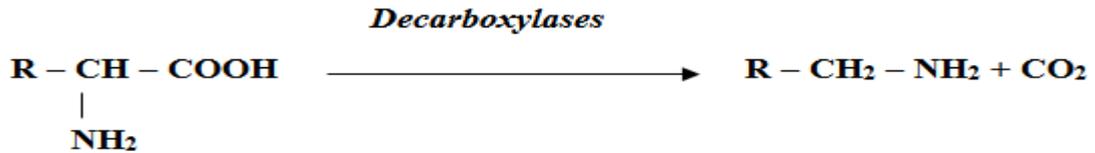


Figure 8: Réaction de décarboxylation des acides aminés [25]

- **Recherche de l'uréase**

L'uréase est une enzyme inductible et son action aboutit à la formation d'ions ammoniums, entraînant le virage du rouge de phénol du jaune au rose framboise [9].

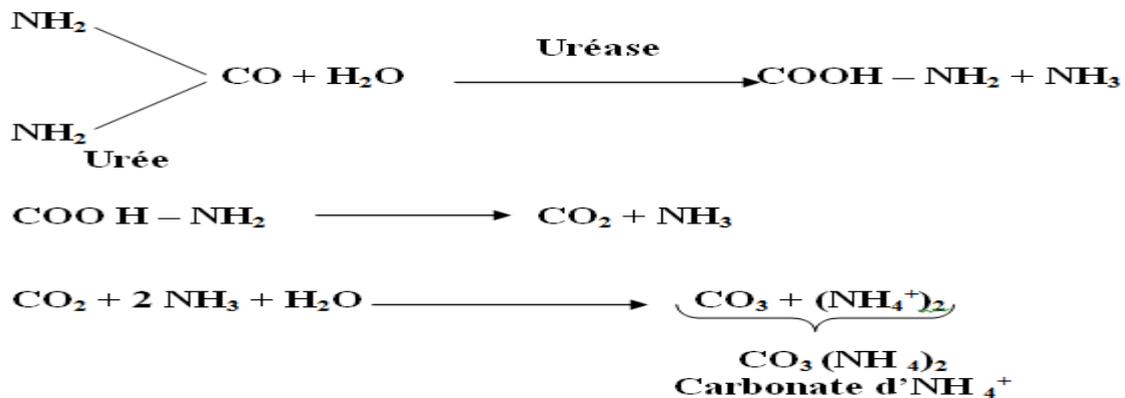


Figure 9 : Réaction d'hydrolyse de l'urée [9]

I.2.3.2. Métabolisme respiratoire : production de la nitrate réductase :

Les bactéries, lorsqu'elles possèdent une nitrate réductase, sont capables de transformer les nitrates (NO_3^-) en nitrites (NO_2^-) et éventuellement en azote (N_2) [27], donnant une coloration rouge en présence d'acide sulfanilique et d' α naphthylamine (Réaction de Griess) [36].

La nitrate réductase est produite par certaines souches de staphylocoques et constitue un des caractères biochimiques et taxonomiques utilisés pour leur identification.

Staphylococcus aureus a un système respiratoire associé à la nitrate réductase, celle-ci utilise le L-lactate comme donneur d'hydrogène. L'essentiel de l'activité nitrate réductase utilisant le L-lactate a été localisée au niveau de la membrane plasmique où elle est souvent couplée à des déshydrogénases. Cependant, elle peut être rencontrée au niveau du cytoplasme [17].



Figure 10: Mise en évidence de la nitrate réductase [17]

I.2.3.3. La résistance à la novobiocine :

Les staphylocoques à coagulase négative sont habituellement classés selon le critère de sensibilité ou de résistance à la novobiocine.

La novobiocine est un antibiotique bactériostatique peu utilisé en thérapeutique, pouvant s'avérer très actif sur les bactéries à Gram positif, en particulier les staphylocoques. Ce sont généralement les souches de *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus cohniiurealyticum* et *Staphylococcus xylosus* qui sont résistantes à la novobiocine [46].

I.3. Habitat et pouvoir pathogène :

Le réservoir naturel des staphylocoques est l'homme et les animaux à sang chaud. Cependant, éliminées dans le milieu extérieur, ces bactéries très résistantes sont fréquemment retrouvées dans l'environnement [16].

La plupart des staphylocoques sont inoffensifs et résident normalement sur la peau et les muqueuses de l'homme et d'autres organismes [14].

Les espèces de staphylocoques peuvent causer une grande variété de maladies chez les humains et chez d'autres animaux. *S. aureus* est un des pathogènes majeurs dans les infections humaines. Plusieurs autres espèces de staphylocoques sont également impliquées dans les infections humaines, notamment *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* and *S. schleiferi*[14].

L'un des principaux défis du travail de diagnostic quotidien est donc d'identifier les espèces de staphylocoques.

Les CoNS peuvent contaminer les prélèvements ; ils sont en règle générale des bactéries opportunistes essentiellement responsables d'infections nosocomiales [34]. Il est important de

distinguer *S. aureus* des CoNS. *S. aureus* a un potentiel de pathogénicité très important et est responsable aussi bien d'infections nosocomiales que communautaires [43].

S. aureus est responsable d'infections suppuratives superficielles et profondes ainsi que de syndromes liés à l'action de toxines. Il est devenu un problème majeur de santé publique en raison de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques [19].

II. Généralités sur les streptocoques :

II.1. Définition, Historique et Classification :

Les streptocoques sont des cocci à Gram positif ; les cellules peuvent être ovoïdes, sphériques ou rarement allongées en bâtonnets, et se divisent en un seul plan pour former des paires ou plus souvent des chaînettes. Ils sont dépourvus de cytochrome et de catalase. Le contenu en (G + C) est compris entre 33 et 42 [41].

Le nom *Streptococcus* (streptus : flexible ; coccus : grain) fut pour la première fois attribué par BILBROTH et EHRLICH à des coques formant des chaînettes observées dans les prélèvements provenant de blessures infectées [45].

PASTEUR, CHAMBERLAND et ROUX (1881) rendirent compte d'une infection septicémique obtenue chez les lapins inoculés avec de la salive humaine [45].

FAHLEISEN (1883) décrivit une coque similaire comme agent de l'érysipèle.

Le nom de *Streptococcus pyogenes* fut donné par ROSENBAACH (1884) à des coques groupées en chaînettes et isolées de lésions suppuratives chez l'homme [45].

NOCARD et MOLLEREAU (1887) découvrirent le "*Streptococcus* de la mammite de Nocard" qui ensuite fut appelé *Streptococcus agalactiae*[45].

LANCEFIELD, en 1933 décrivit les groupes sérologiques de A à F.

Les souches de référence de streptocoques du groupe B étaient d'origine bovine. Les infections néonatales dues à ce groupe ont été plus récemment signalées en 1962 par REITEL et collaborateurs et par WAHL et collaborateurs en 1964 par EICKHOFF et coll [45].

SCHULTZ décrivit les streptocoques isolés de lésions de pneumonie et de gourme chez les chevaux [45].

SCHLEIFER réalisa la séparation des deux genres *Streptococcus* et *Enterococcus* en 1984. Les infections à streptocoques qui autrefois étaient considérées comme propres aux pays froids et humides sont maintenant fréquentes en zone tropicale particulièrement en Afrique de l'Ouest [45].

Plusieurs caractères sont utilisés pour la classification des streptocoques mais les trois principaux sont : la capacité d'hémolyser les érythrocytes, la présence d'antigènes polysaccharidiques spécifiques de groupe dans la paroi cellulaire et l'utilisation des réactions biochimiques spécifiques [2, 10, 16, 40].

Le pouvoir hémolytique:

L'hémolyse peut être :

- complète dans le cas de streptocoques bêta-hémolytiques ;
- incomplète pour les streptocoques alpha-hémolytiques ;
- absente dans le cas de streptocoques gamma-hémolytiques[45].

Le groupe antigénique :

Lancefield R. a classé les espèces de streptocoques en fonction de leur polysaccharide C en groupes antigéniques : A, B, C, D, E, F, G, K, L, M, N, O, P, R, S, T, U [45].

Propriétés bactériologiques :

Les propriétés bactériologiques sont importantes pour différencier les espèces, elles permettent ainsi de différencier des espèces appartenant au même groupe ou ayant le même pouvoir hémolytique.

L'application des techniques d'hybridation et de séquençage des acides nucléiques aux streptocoques a donné naissance à une nouvelle classification. Ainsi le genre original fut scindé en trois genres différents : *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Lactococcus*.

Le genre *Streptococcus* contient toujours la plupart des espèces pathogènes pour l'homme alors que les genres *Enterococcus* et *Lactococcus* correspondent grossièrement aux groupes des enterocoques et des streptocoques lactiques de la classification traditionnelle.

Le genre *Enterococcus* comprend aujourd'hui 18 espèces dont les plus isolées des infections humaines sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*[22].

II.2. Habitat et pouvoir pathogène naturel :

Les streptocoques sont des germes ubiquitaires rencontrés un peu partout.

Les Streptocoques du groupe D sont retrouvés dans l'intestin et ceux du groupe B dans les voies génitales.

Dans la bouche on a les streptocoques non groupables appelés *salivarius*, *sanguis*, *mitis*, *mutans* ; qui donnent des dextranes jouant un rôle dans les caries dentaires.

Les streptocoques du groupe A vivent sur la peau et les membranes des muqueuses en particulier au niveau de la cavité buccale et des voies aériennes supérieures de l'homme et des animaux. Le germe diffuse d'une personne à une autre probablement à travers les gouttelettes salivaires ; il pourrait également être transmis par le fait de mettre les mains contaminées dans la bouche [30].

Les principales espèces pathogènes sont :

- *S. pyogenes* ou streptocoques β -hémolytiques du groupe A,
- *S. agalactiae* ou streptocoques β -hémolytiques du groupe B,
- *S. pneumoniae* ou pneumocoques,
- Streptocoque C : *S. equi*, *S. dysgalactiae*,
- Commensaux opportunistes : *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. salivarius*,
- Entérocoques : *E. faecalis*, *E. faecium*[46].

Lorsque ces bactéries pathogènes sont présentes transitoirement et en faible quantité sur les muqueuses ou les téguments, on parle de "portage" et de porteurs sains. Parmi les streptocoques, les espèces commensales appartiennent à la flore normale des muqueuses de l'homme. Ce sont les streptocoques oraux (commensaux de l'oropharynx) et les streptocoques du groupe D (commensaux de l'intestin). Dans certaines circonstances ces bactéries commensales deviennent pathogènes opportunistes et peuvent être responsables d'infections, notamment de septicémies ou d'endocardites [46].

- Le streptocoque β -hémolytique du groupe A a une grande importance en bactériologie médicale car ce germe est responsable de la majorité des infections humaines à streptocoque [38].

Les angines streptocoques sont fréquentes chez les enfants avec une prédilection entre 5 – 10 ans.

Les infections de la sphère rhinopharyngée non traitées peuvent provoquer de graves complications telles que :

- Rhumatisme articulaire aigu (RAA) avec atteinte cutanée et surtout cardiaque (endocardite, myocardite, péricardite et risque de séquelles valvulaires),
- Glomérulonéphrite aiguë post-streptococcique, pouvant provoquer une insuffisance rénale chronique [31].

Les infections à streptocoques hémolytiques du groupe A occupent la 2^e place des statistiques cardiaques dans les villes africains [46].

- *S. agalactiae* est un hôte normal du tube digestif, des voies respiratoires supérieures et des voies génitales féminines.

S. agalactiae peut causer la méningite, la septicémie néonatale et la pneumonie chez les nouveau-nés, les adultes peuvent éprouver la vaginite, la fièvre puerpérale, infection des voies urinaires, infection de la peau et l'endocardite [36].

Le streptocoque B est responsable, chez les sujets immunodéprimés ou atteints d'affections fragilisantes d'infections opportunistes (pneumopathies, arthrites, méningites, cellulites, endocardites) [45].

- *S. pneumoniae* est une des premières causes bactériennes dans le monde de pneumonies, de méningites, d'otites moyennes aiguës (OMA), et de sinusites [14].

Elle est responsable d'une morbi-mortalité importante en particulier dans les infections pulmonaires et les méningites [51].

- *E. faecalis* peut être isolé seul ou en association avec d'autres bactéries dans les infections suivantes : otites, sinusites, péritonites, suppurations de plaies chirurgicales d'origine abdominale, septicémies ayant comme points de départ des infections urinaires ou génitales ; les infections urinaires représentent aussi la porte d'entrée d'endocardites surtout chez les personnes âgées [17].

II.3. Caractères bactériologiques :

II.3.1. Caractères morphologiques :

Ils se présentent sous forme de coques ovoïdes ou sphériques à Gram positif groupées en chaînette. Les chaînettes résultent de la non-séparation des paires de coques en division et se présentent comme une succession de diplocoques.

Par contre, la formation de chaînettes est de rigueur dans les milieux artificiels et dans les exsudats purulents des lésions ouvertes.

Les Streptocoques des groupes A, C, G caractérisés par de longues chaînettes donnent sur milieux liquides une culture en dépôt.

Les autres donnent un trouble homogène du bouillon et se présentent alors sous la forme de diplocoques (*S. pneumoniae*) ou de courtes chaînes (streptocoques du groupe B, *S. bovis*).

Le phénomène de capsulation peut être observé avec les streptocoques du groupe A et surtout du groupe C dans la phase exponentielle de croissance.

Dans les cultures âgées les coques deviennent Gram négatif.

Les streptocoques déficients présentent des anomalies morphologiques constantes lors de l'isolement. D'une manière générale, les streptocoques du groupe A sont constitués de cellules bien arrondies.

Ceux du groupe D ont une forme de ballon de rugby et *Streptococcus pneumoniae* possède un aspect en flamme de bougie [24, 50].

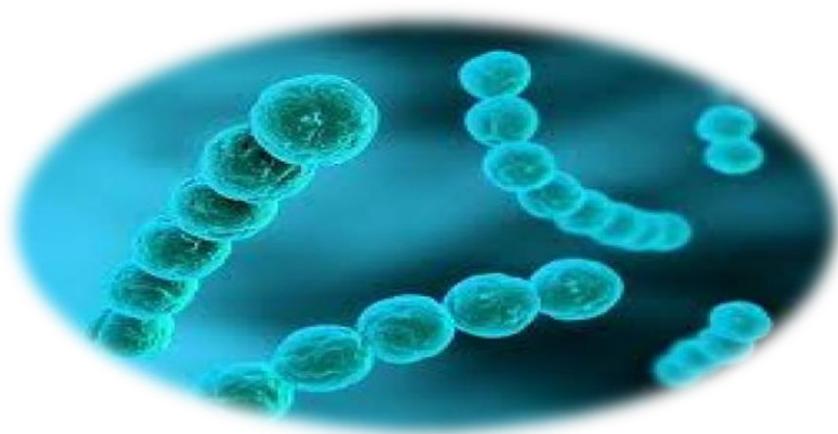


Figure 11: Caractères morphologiques des streptocoques [web 5]

II.3.2. Caractères culturels :

Les streptocoques sont dans la plupart des cas aéro-anaérobies facultatifs et supportent l'oxygène malgré l'absence de catalase et de cytochrome ; néanmoins ce sont des germes très fragiles. La température idéale de croissance est comprise entre 20 et 42°C avec un optimum à 35-37°C. La croissance est optimale en anaérobiose ou en présence de 10 % de CO₂[46].

La culture de nombreuses espèces de streptocoques exige des milieux nutritifs enrichis de sang ou de sérum. Les milieux gélosés nutritifs (gélose nutritive ordinaire, gélose trypticase soja, milieu de Müeller Hinton, gélose Columbia additionnés de 5 % de sang de cheval ou de mouton) conviennent très bien [46].

Les entérocoques ont la particularité de se multiplier dans des milieux usuels à base de peptone ou en l'absence de facteurs de supplémentation et de croître aussi sur milieu hyper salé contenant 6,5 g/l de NaCl [28].

II.3.2.1. Culture sur milieux usuels :

La plupart des streptocoques poussent sur ces milieux et réalisent sur gélose nutritive des colonies très fines transparentes dispersées à la surface en grain de semoule avec une couleur légèrement bleutée.

Cette culture étant difficile, il est préférable de la réaliser sur milieux enrichis.

II.3.2.2. Culture sur milieux enrichis

Certaines substances sont habituellement utilisées pour enrichir les milieux. Ce sont les peptones, les extraits de viande ou infusion de cœur-cerveau, le sang, le sérum et / ou l'ascite.

Les milieux peuvent se présenter soit sous forme liquide, soit sous forme solide.

- Milieux liquides d'enrichissement

Les Streptocoques supportent très mal les milieux glucosés. En effet, le glucose par voie fermentative donne de l'acide lactique avec un abaissement du pH qui rend le milieu hostile. C'est la raison pour laquelle on utilise le bouillon glucosé tamponné (B.G.T.).

On peut également utiliser le bouillon streptosel. Les Streptocoques donnent soit un trouble homogène avec ou sans dépôt (groupe B, D), soit une pousse granulaire avec sédimentation rapide, le surnageant pouvant être limpide ou légèrement trouble (A, C, G) [24].

- Milieux solides d'isolement

Les milieux les plus généralement utilisés sont les géloses enrichies au sang (sang de mouton ou de cheval). Ces milieux permettent de voir la capacité des streptocoques à lyser les hématies.

On peut observer une pousse des streptocoques 24 heures après incubation à l'étuve sous une atmosphère enrichie en CO₂.

L'aspect de la zone d'hémolyse et sa dimension sont fonction de l'hémolysine élaborée par la souche, du sang utilisé mais également du milieu.

Sur ces milieux enrichis, on distingue différents types d'hémolyse.

o Hémolyse bêta

C'est une hémolyse complète. Les hématies sont complètement lysées sur un diamètre d'environ 3 à 4 mm autour des colonies.

Cette hémolyse s'observe en général avec les streptocoques des groupes A, C, G double et quelque fois quadruple celle de la zone en question.

Les streptocoques du groupe B quant à eux présentent une zone d'hémolyse très petite et par conséquent pas claire.

o Hémolyse alpha

Elle est incomplète. Les globules rouges ne sont que partiellement lysés sur un diamètre d'environ 1 à 2 mm. Cette hémolyse peut quelque fois être accompagnée d'un verdissement du milieu.

On parle alors d'une hémolyse alpha viridans. Le mécanisme de cette coloration est mal connu.

o Hémolyse gamma ou absence d'hémolyse

Il n'existe aucune trace d'hémolyse. On utilise plus couramment le terme streptocoque non hémolytique. *S. salivarius* et *S. milleri* présentent une telle hémolyse [5,24].

II.3.3. Caractères biochimiques :

II.3.3.1. Utilisation des hydrates de carbone :

L'acide pyruvique issu de la glycolyse sert d'accepteur d'électrons. Sous l'action de la lactate déshydrogénase, il est réduit en acide lactique par le NADH, H⁺ dans l'étape glycéraldhyde-3-

P/ 1, 3-bisphosphoglycerate. Les espèces des genres *Streptococcus* et *Enterococcus* réalisent cette voie homofermentaire [45].

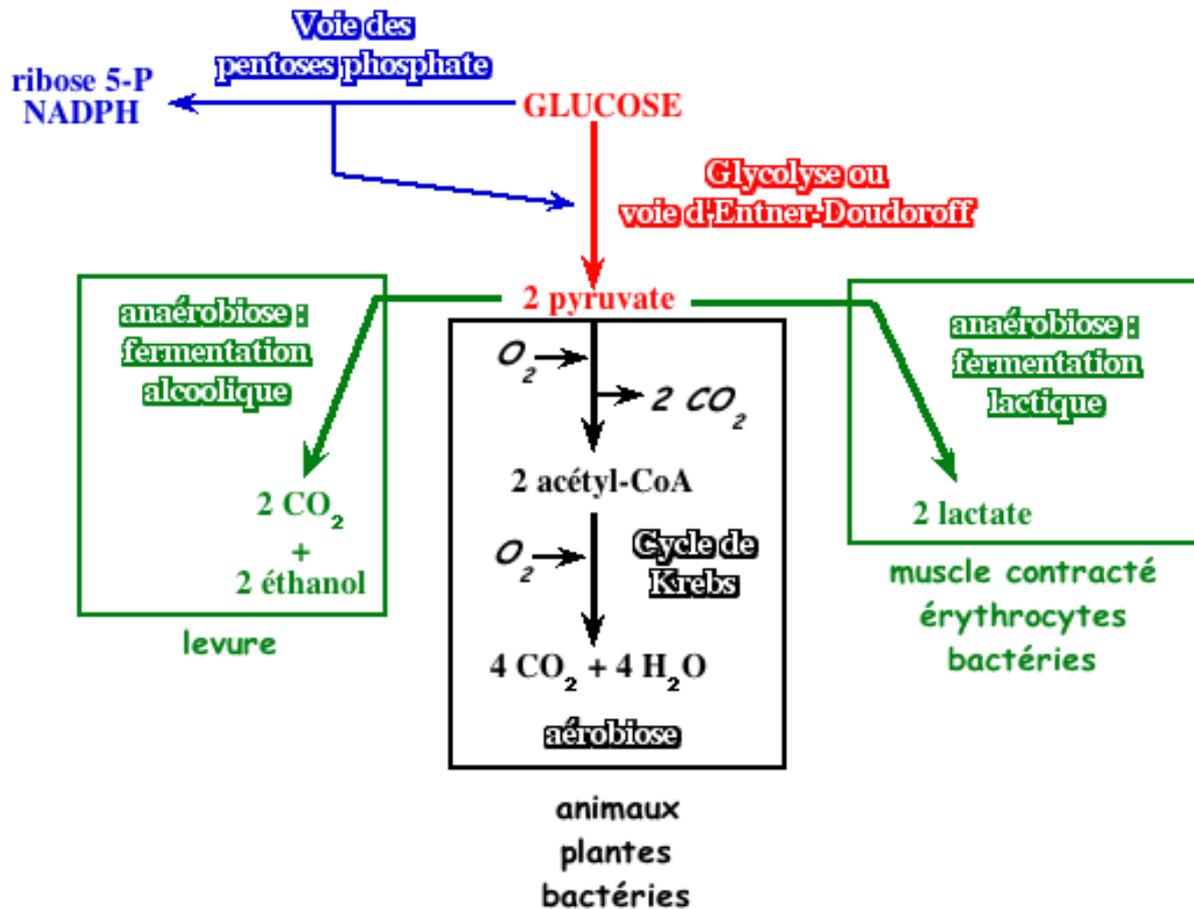


Figure 12: Représentation graphique de la fermentation homolactique [45]

II.3.3.2. Paroi et constitution antigénique

La paroi cellulaire des streptocoques est responsable de la forme et de la rigidité de la cellule mais elle porte également les facteurs les plus importants dans l'interaction hôte-parasite.

Elle est constituée de trois couches séparées et légèrement décalées ; de la surface vers l'intérieur : les protéines, le polysaccharide et le mucopeptide [12, 46].

- **Les protéines**

La partie la plus externe de la paroi cellulaire est la couche protéique constituée d'antigènes majoritaires M, T, R et X.

La protéine M est l'antigène le plus important de la paroi cellulaire des streptocoques du groupe A ; elle est spécifique de type.

- **Le polyoside C**

Le polyoside C est situé entre la couche protéique et le mucopeptide. Il s'agit d'un polyoside multiramifié formé de deux ou plusieurs monomères selon le groupe.

Il est l'antigène spécifique de groupe utilisé dans le schéma de Lancefield pour la classification des streptocoques en sérogroupes. On distingue 16 groupes sérologiques (A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, M, O, P, R, S, T, U) différenciables par leur polyoside C.

Les streptocoques des groupes D et N ont comme antigène spécifique de groupe l'acide téichoïque.

Les streptocoques non groupables sont des espèces de streptocoques qui ne possèdent pas de polyoside C.

- **Le mucopeptide**

Encore appelé peptidoglycane, le mucopeptide est responsable de la rigidité de la paroi streptococcique. Il est le substrat d'enzymes muralytiques (lysozymes, protéases) qui attaquent la paroi cellulaire et produisent la lyse de la bactérie [12, 45].

II.3.3.3. Absence de catalase

En présence de peroxyde d'hydrogène 3%, les streptocoques développent une réaction négative, ils sont donc dépourvus de catalase. Il peut y avoir des faux positifs lorsque la colonie utilisée pour effectuer le test est issue d'un milieu additionné de sang.

Cette absence de catalase constitue un caractère biochimique important ; il permet de faire le diagnostic différentiel entre streptocoques et staphylocoques [50].

II.3.3.4. Sensibilité à la bacitracine:

Les streptocoques du groupe A se distinguent parmi les streptocoques bêta-hémolytiques par leur sensibilité à la bacitracine.

On utilise des disques de bacitracine à 0,04UI. Cette dose est suffisante pour provoquer sur une culture de *Streptococcus pyogenes* sur gélose au sang, une zone d'inhibition.

Mais ce test a été très critiqué car c'est une épreuve mal standardisée : la charge des disques n'est pas toujours précisée par les fabricants : la densité de l'inoculum varie ; le diamètre de la zone d'inhibition considéré comme significatif n'est pas toujours le même [41].

II.3.3.5. Sensibilité à l'optochine :

L'optochine est un dérivé proche de la quinine. 0,5 à 5% des pneumocoques sont résistants à l'optochine et quelques streptocoques viridans sont sensibles à l'optochine.

Les autres streptocoques sont résistants à l'optochine et se multiplient jusqu'au contact du disque [23].

II.3.3.6. Hydrolyse de l'esculine :

L'esculine est un glucoside dérivé de la coumarine (dioxycoumarine et glucose). Les streptocoques du groupe D hydrolysent l'esculine en aglycone qui, en présence de sels de fer, donne une coloration noire [17].

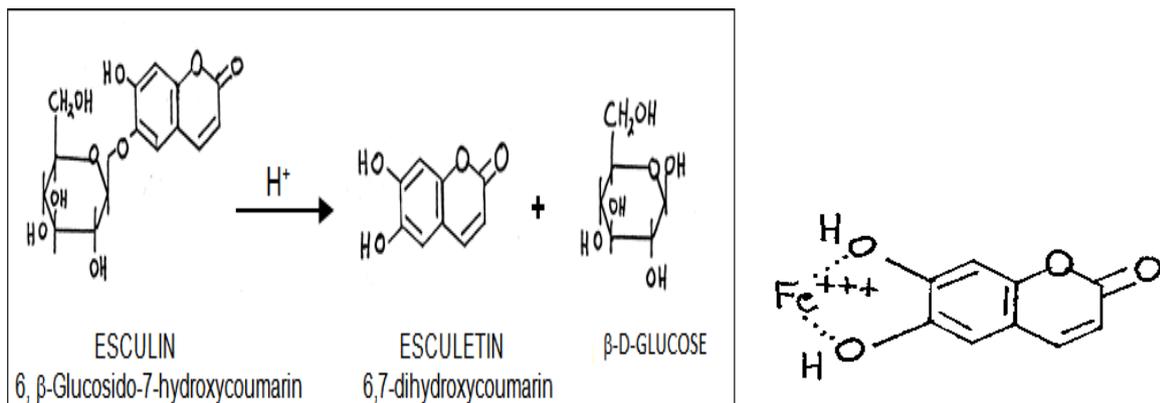


Figure 13 : Réaction d'hydrolyse de l'esculine [17]

III. Rappels sur les antibiotiques et méthodes d'étude de la sensibilité :

III.1. Les antibiotiques :

III.1.1. Définition d'un antibiotique :

Les antibiotiques sont des substances chimiques ou hémi synthétiques élaborées par des micro-organismes et qui ont le pouvoir de s'opposer à la multiplication de bactéries en les détruisant ou en inhibant leur multiplication.

Pour être efficace, l'antibiotique doit satisfaire aux trois conditions suivantes :

- pénétration à l'intérieur de la bactérie ;
- intervention au niveau d'une cible à l'intérieur de cette bactérie ;
- l'antibiotique ne doit pas être inactivé par des enzymes pouvant être synthétisées par cette bactérie.

L'action de l'antibiotique sur la bactérie se traduit par :

- ❖ des modifications de la croissance : dans ce cas l'antibiotique est bactériostatique.
- ❖ des modifications de la capacité de survie : dans ce cas l'antibiotique est bactéricide [7, 8,15].

III.1.2. Mécanismes d'action des antibiotiques :

III.1.2.1. Action sur la paroi bactérienne :

Les antibiotiques agissant par ce mécanisme extracellulaire ne le sont que sur les germes en croissance. Les cellules qui sont au repos ne sont pas perturbées par l'action de ces molécules. Les antibiotiques bloquent la synthèse de la paroi, la cellule s'allonge sans faire de paroi (cloison) et explose sous l'effet de la pression osmotique interne. Si on ajoute un stabilisant osmotique, on obtient un protoplaste.

Exemple : la pénicilline, les céphalosporines[7, 15].

III.1.2.2. Action sur la membrane des cellules :

Les antibiotiques bloquent la synthèse du peptidoglycane qui est un constituant de la paroi des bactéries. Elles inhibent les transpeptidases et carboxypeptidases qui sont essentielles à la synthèse de la paroi [7, 15].

III.1.2.3. Action sur l'ADN :

Les sulfamides par exemple sont des analogues structurels de molécules biologiques. La cellule va les reconnaître, les insérer dans son métabolisme, bloquant ainsi les voies métaboliques. Ceci provoque une inhibition de la synthèse des bases nucléiques indispensables à la synthèse de l'ADN [7].

III.1.2.4. Action sur le ribosome bactérien :

Approximativement, la moitié des antibiotiques utilisés en thérapeutique ont pour cible le ribosome bactérien, organe cellulaire responsable de la synthèse des protéines.

Ces antibiotiques se répartissent en plusieurs classes, de nature chimique et d'actions différentes. La plupart interagissent avec l'ARN ribosomique.

- Les aminoglycosides ou aminosides se fixent sur les sous unités 30S et 50S des ribosomes, empêchant ainsi la traduction de l'ARNm.
- Les phénicolés bloquent la formation de la liaison peptidique. Ils se fixent, sur la sous unité 50S du ribosome bactérien mais pas sur celle des ribosomes eucaryotiques.
- Les cyclines, en se fixant sur la sous unité (30S), bloquent l'élongation de la chaîne polypeptidique.
- Les macrolides agissent sur la partie (50S) du ribosome et bloquent l'élongation de la chaîne polypeptidique [15, 30, 33].

III.1.3. Classification des antibiotiques :

III.1.3.1. LES β -LACTAMINES :

Leur structure chimique comprend un cycle β -lactame responsable de l'activité antibactérienne.

On distingue trois familles principales :

- Les pénicillines
- Les céphalosporines
- Les monobactams

- ***Les pénicillines***

Dans cette famille on distingue :

- Les pénicillines naturelles (les groupes G et V)
- Les pénicillines du groupe M. (oxacilline)

- Les aminopénicillines (ampicilline, Amoxicilline)
- Les carboxypénicillines (carbénicilline, ticarcilline)
- Les acylureidopénicillines (piperacilline, mezlocilline)
- Les amidino-pénicillines (pivmécillinam)

- ***Les céphalosporines***

Elles sont constituées de 4 générations :

- Céphalosporines de 1ère génération (Céfotolatine, Céfacétrile, Céfadroxil, Céfradine).
- Céphalosporines de 2ème génération (Céfuroxime, Céfamendole, Céfoxitine)
- Céphalosporines de 3ème génération (Céftriaxone, latomoxef, Céfotaxime)
- Céphalosporines de 4ème génération (Céfépine, Cefpirome, Céfozoprane)

- ***Les monobactams***

L'Aztreonam appartient à cette sous famille.

III.1.3.1. Les aminosides :

Ce sont des antibiotiques bactéricides à large spectre possédant une structure aminoglycosidique.

Les aminosides sont divisés en 3 grands groupes :

- **Aminosides de 1ère génération** : Streptomycine, Kanamycine, Néomycine...
- **Aminosides de 2ème génération** : Amikacine, Gentamicine, Tobramycine...
- **Aminosides de 3ème génération** : Nétilmicine

III.1.3.3. Macrolides, Lincosamides, Streptogramines (MLS) :

Les MLS ont un spectre limité comprenant les bactéries à Gram positif, les cocci Gram négatif, les mycoplasmes et les bacilles négatifs anaérobies.

- Macrolides (Erythromycine, Oléandromycine, Josamycine)
- Lincosamides (Lincomycine, Clindamycine)
- Streptogramines ou Synergistine (Pristinamycine, Virginiamycine).

III.1.3.4. Les cyclines :

Les principaux produits sont : les tétracyclines, doxycyclines, minocyclines. Les tétracyclines ont une activité antibiotique large, seulement bactériostatique.

III.1.3.5. Les phénicolés :

Ce sont des bactériostatiques à large spectre, dérivés de l'acide dichloro-acétique. Nous distinguerons le chloramphénicol, le thiamphénicol.

III.1.3.6. Les quinolones :

On peut les diviser en deux groupes :

- Les anciens qui ne sont pratiquement actifs que sur les bacilles à Gram négatif, principalement les entérobactéries et ne sont indiqués que dans le traitement des infections urinaires (acide nalidixique, acide piromidique, fluméquine).
- Les produits plus récents ont une grande activité par leur spectre large et leur pharmacocinétique (Ciprofloxacine, péfloxacin, norfloxacine).

III.1.3.7. Les polypeptides :

Ce sont des antibiotiques bactériostatiques (polymyxine) [7, 8, 11, 15, 33].

III.2. Méthodes d'étude de la sensibilité aux antibiotiques:

Il existe plusieurs techniques d'évaluation de l'activité des antibiotiques qui peuvent être mises en œuvre dans un laboratoire de bactériologie.

III.2.1. Méthode de diffusion : antibiogramme standard

Les disques d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose préalablement ensemencée avec une suspension de bactéries en phase exponentielle de croissance. L'antibiotique imprégnant le disque va diffuser dans la gélose, la concentration diminue au fur et à mesure que l'on s'éloigne du disque (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à 37° C), on constate que chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication bactérienne a une concentration supérieure ou égale à la CMI.

La CMI est la concentration minimale d'antibiotiques inhibant en 18 heures à 24 heures la multiplication des bactéries (bactériostase).

Pour chaque antibiotique, on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur approchée de la CMI. En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre le diamètre d'inhibition et la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives portant sur un grand nombre d'espèces différentes.

En fonction de la CMI, on classera la souche en 3 catégories :

- Résistante lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vivo* sans atteindre les doses toxiques,
- Sensible, lorsque la CMI est inférieure à la concentration obtenue après administration d'une dose thérapeutique,
- Intermédiaire si la CMI se situe entre ces deux extrêmes. L'effet inhibiteur est obtenu soit par une forte concentration de l'antibiotique au niveau du siège de l'infection, soit par une administration par voie générale avec des doses élevées.

Standardisation

La fiabilité des résultats d'un antibiogramme est influencée par de nombreux paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés. La standardisation est régie par des documents émanant de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et des divers Comités Nationaux. Selon les pays, il peut exister des variations techniques et il est important de respecter une technique identique à celle utilisée pour l'établissement des courbes de concordance [8, 25,32].

III.2.2. E-test® (epsilon-meter-test)

Le E-test® est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone continue de 0,016 à 256mg/l ou 0,002 à 32mg/l en fonction des molécules.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes de 5mm de large et de 80mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier. Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par d'une ellipse dont le point d'intersection avec la bandelette définit la CMI. Une échelle de lecture imprimée sur la face supérieure de la bandelette permet une lecture rapide [13, 25].

III.2.3. Les Micro méthodes d'étude *in vitro* de la sensibilité :

Les appareils utilisés par cette méthode fonctionnent schématiquement selon deux principes :

- Ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité ;
- Ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou de plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'un indice propre à chaque machine.

Dans tous les cas, l'antibiogramme reste un test permettant de collecter en routine des données sur l'aptitude de bactéries à croître en présence d'antibiotiques dans des conditions précises de milieu, d'inoculum et de temps.

❖ **Méthode utilisant deux concentrations critiques**

Les concentrations en antibiotiques qu'il est possible d'obtenir dans l'organisme se définissent par une zone des taux thérapeutiques délimitée par deux valeurs critiques exprimées en g/ml.

- La concentration critique inférieure (CCI) correspond au taux sanguin moyen obtenu aux posologies habituelles.

- La concentration critique supérieure (CCS) correspond au taux sanguin maximal obtenu par l'administration de fortes doses. Certains systèmes utilisent ces concentrations critiques pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques. Ces méthodes sont à l'origine des premiers appareils automatiques. Avec elles, on peut interpréter directement les résultats de l'antibiogramme. En effet, lorsque la croissance est étudiée par mesure d'une activité enzymatique, on utilise les concentrations critiques supérieure et inférieure fixées par les Comités Nationaux d'Antibiogramme.

Le résultat obtenu est logique :

- La croissance en présence de la plus forte concentration d'antibiotique est le fait de souches résistantes ;
- La croissance en présence de la plus faible concentration seulement est caractéristique des souches intermédiaires ;
- L'inhibition de la croissance aux deux concentrations d'antibiotiques est spécifique des souches sensibles.

La croissance est décelée par photométrie et / ou néphélométrie. La lecture se fait à l'œil nu pour certaines méthodes.

Il existe différents systèmes, les plus utilisés sont les systèmes ABAC, ATB-API et les CSB.

Seules les bactéries non exigeantes et à croissance rapide peuvent être étudiées par ces méthodes.

❖ **Méthode utilisant une concentration critique**

Ces méthodes étudient la croissance de la bactérie en présence d'une seule concentration d'antibiotique adaptée pour discriminer les bactéries sensibles des résistantes. Cette concentration n'est pas liée aux concentrations critiques.

L'inoculum bactérien est de 10⁶ bactéries /ml.

❖ **Système effectuant une analyse cinétique de la croissance :**

L'analyse cinétique de la croissance bactérienne a été la base du premier système d'antibiogramme automatique qui a été commercialisé. Le principe du fonctionnement ne diffère cependant pas fondamentalement des systèmes utilisant une concentration.

Ces systèmes donnent des réponses précoces et permettent quelquefois l'estimation de la CMI.

- Soit en utilisant plusieurs concentrations d'antibiotiques;
- Soit en utilisant un calcul spécifique (propre à chaque fabricant).

❖ **Dilution en bouillon :**

Les méthodes de dilution en bouillon MH pour la détermination de la CMI peuvent être réalisées en plaques de microtitration. Cette Micro méthode est plus adaptée pour la pratique de l'antibiogramme grâce à une automatisation possible

Les systèmes pour l'antibiogramme ont trouvé leur place dans les laboratoires de microbiologie.

Leurs performances sont comparables à celles des technologies conventionnelles. Certains permettent aussi l'obtention rapide de résultats, ce qui assure aux biologistes un suivi plus fiable de leurs patients.

Avantages et inconvénients

❖ **Avantages**

Ces Micro méthodes d'étude de la sensibilité présentent plusieurs avantages. Les évaluations récentes des divers systèmes d'antibiogramme automatiques montrent que la concordance avec la CMI (méthode de référence) existe dans plus de 85% des cas. Ce pourcentage de concordance peut varier selon le système. Ces miro méthodes ont permis de réduire (en tout cas pour certains) les délais de réponse.

❖ Inconvénients

Les Micro méthodes présentent néanmoins des inconvénients :

- Seules les bactéries non exigeantes et à croissance rapide peuvent être étudiées par ces méthodes ;
- Aucun système actuellement disponible ne mérite au sens strict le qualificatif d'automatique, c'est à dire ne réalise de façon automatique l'ensemble des phases de la détermination de la sensibilité d'une souche bactérienne aux antibiotiques ;
- Le nombre d'antibiotique testé par antibiogramme est limité par le nombre de cupules des plaques [4, 5, 11,13].

DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

I. Cadre d'étude

Cette étude a été réalisée au niveau de l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec et au niveau du Laboratoire de Bactériologie-Virologie fondamentale et appliquée de l'UCAD II.

II. Souches bactériennes

Nous avons travaillé sur 6 souches qui avaient déjà été identifiées et conservées au sein de l'hôpital Aristide Le Dantec. Ces germes étaient :

- *S. aureus*
- *S. epidermidis*
- *S.saprophyticus*
- *E.faecalis*
- *S.pyogenes*
- *S.agalactiae*

III. Matériel et réactifs

III.1. Matériel pour l'identification

- Bec BUNSEN
- Etuve
- Four à micro-ondes
- Jarre d'incubation + bougie
- Micropipettes
- Filtre millipores
- Violet de gentiane
- Lugol
- Alcool 95 °C
- Fuschine
- Microscope optique
- Microplaques
- Embouts stériles
- Becher rempli d'eau de javel

- Plateau
- Anse de platine
- Lame porte-objet

III.2. Matériel pour la préparation de l'inoculum

- Autoclave
- Boîtes de Pétri
- Tubes à vis stériles
- Densitomètre

III.3. Matériel pour l'étude de la sensibilité

- Boites de Pétri
- Ecouvillons stériles
- Tubes à hémolyse
- Pincés
- Microplaques
- Antibiotiques en poudre et en disque :
 - Erythromycine
 - Pénicilline G
 - Ciprofloxacine
 - Vancomycine
 - Levofloxacine
 - Teicoplanine
 - Gentamicine
 - Tétracycline

III.4. Matériel pour la conservation des souches

- Tubes Nunc
- Tubes stériles à vis
- Portoirs
- Anse de platine

III.5. Milieux pour l'isolement, l'enrichissement et la conservation des souches

- Gélose Chapman

- Gélose au sang ordinaire
- Gélose Müller Hinton
- Bouillon thioglycolate
- Bouillon streptoSel

III.6. Milieux pour l'identification et l'étude de la sensibilité

- Milieu Urée Tryptophane
- Milieu Clark et Lubs
- Milieu Nitrate
- Milieu Moeller
- Milieu pour la recherche de la β -galactosidase
- Milieu pour l'hydrolyse de l'esculine
- Bouillon Hyper salé
- Bouillon Müeller Hinton
- Solution de $MgCl_2$
- Solution de $CaCl_2$
- Glucose
- Rouge de phénol
- Milieu MEVAG /staph/ strepto
- Les sucres : glucose, mannitol, mannose, sorbitol, sorbose, xylose, saccharose, lactose, raffinose, tréhalose, arabinose, inuline, lactose, ribose.
- Huile de paraffine

III.7. Réactifs pour l'identification des souches

- Eau oxygénée
- Alpha-naphtol
- KOH
- Créatine
- Alpha-naphtylamine
- Acide sulfanilique
- Gélose à la DNase
- Kit de latex strepto et staph (Bio Mérieux)

IV. Méthodologie

IV.1. Ré-isolément et ré-identification des souches bactériennes par méthodes classiques

Nous avons utilisé des souches de staphylocoques, de streptocoques et d'entérocoques qui avaient déjà été identifiées et conservées à -20°C. Les souches de staphylocoques ont été régénérées dans du bouillon glucosé tamponné puis repiquées sur gélose Chapman. Les streptocoques et entérocoques ont été régénérés dans du bouillon streptosel puis repiqués sur de la gélose au sang sous atmosphère enrichie en CO₂.

L'incubation s'est faite à l'étuve à 37°C pendant 24H. Suite à cela, nous avons fait des tests afin de nous assurer de la stabilité des caractères des espèces bactériennes étudiées.

Il s'agissait des tests de : Catalase, Coloration de Gram, DNase, Coagulase, Latex staph et strepto.

IV.2. Identification par la micro méthode micro-CSB®

IV.2.1. Préparation des milieux de culture liquides

Afin de réduire le temps d'incubation des microplaques MicroCSB®, nous avons ajouté du pyruvate dans certains milieux (voir annexe).

IV.2.1.1. Contrôle de qualité des milieux liquides

Des contrôles d'efficacité et de stérilité ont été effectués sur chaque milieu préparé.

Contrôle de stérilité

Pour chaque milieu préparé, un millilitre a été prélevé et déposé dans un tube à hémolyse stérile puis incubé à 37°C à l'étuve pendant 24 heures. Les milieux étaient considérés comme stériles en l'absence de trouble ou de virage de l'indicateur coloré.

Contrôle d'efficacité

Chaque milieu préparé a été testé avec une souche de contrôle (**tableau III**) dont la pousse dans le milieu de culture était considérée comme étant un résultat positif.

Tableau III: Souches témoins utilisées pour le contrôle d'efficacité des milieux liquides

Tests	Témoins positifs	Témoins négatifs
ADH	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
ODC	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UREE	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Escherichia coli</i>
NITRATE	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
VP	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
BHS	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
ESCULINE	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
ONPG	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
AMIDON	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
ARABINOSE	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
INULINE	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
LACTOSE	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
MANOSE	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
RAFFINOSE	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
RIBOSE	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SORBOSE	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
SORBITOL	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
TREHALOSE	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
GLUCOSE	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
MANNITOL	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
SACCHAROSE	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
XYLOSE	<i>Staphylococcus xylosum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

IV.2.1.2. Distribution et déshydratation des milieux

IV.2.1.2.1. Distribution des milieux liquides

Les milieux liquides préparés (cf. annexe) ont été distribués dans les microplaques à raison de 100µl par puits (figures 14 et 15).

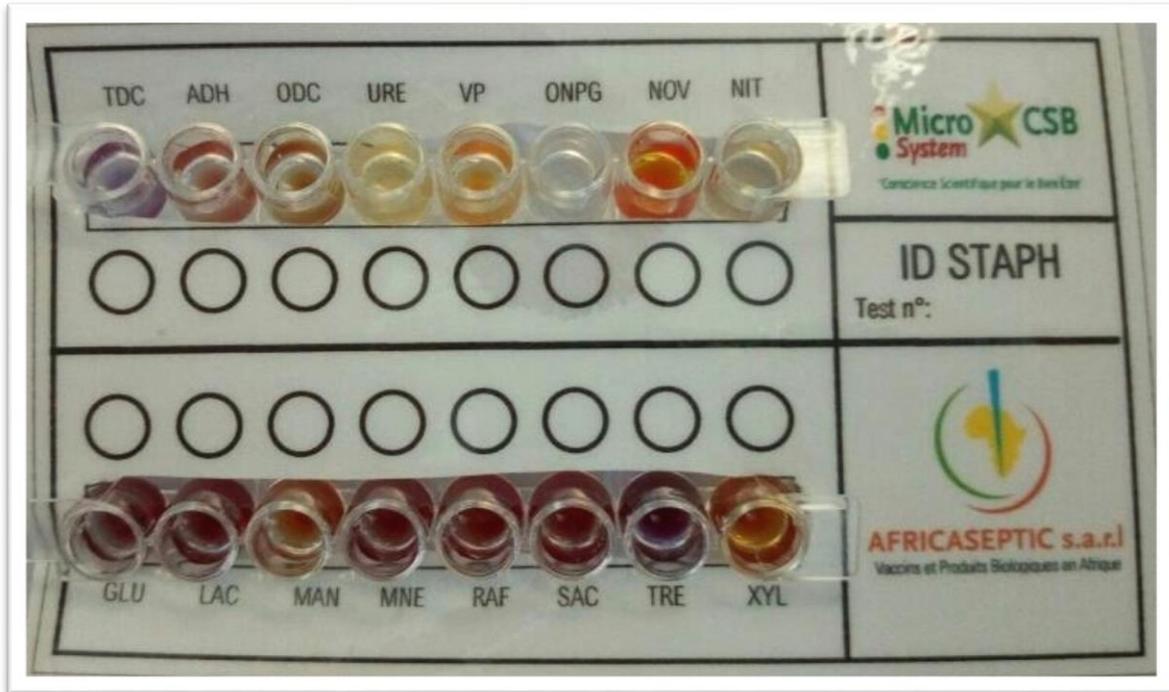


Figure 14: Disposition de la microplaque CSB® d'identification des staphylocoques

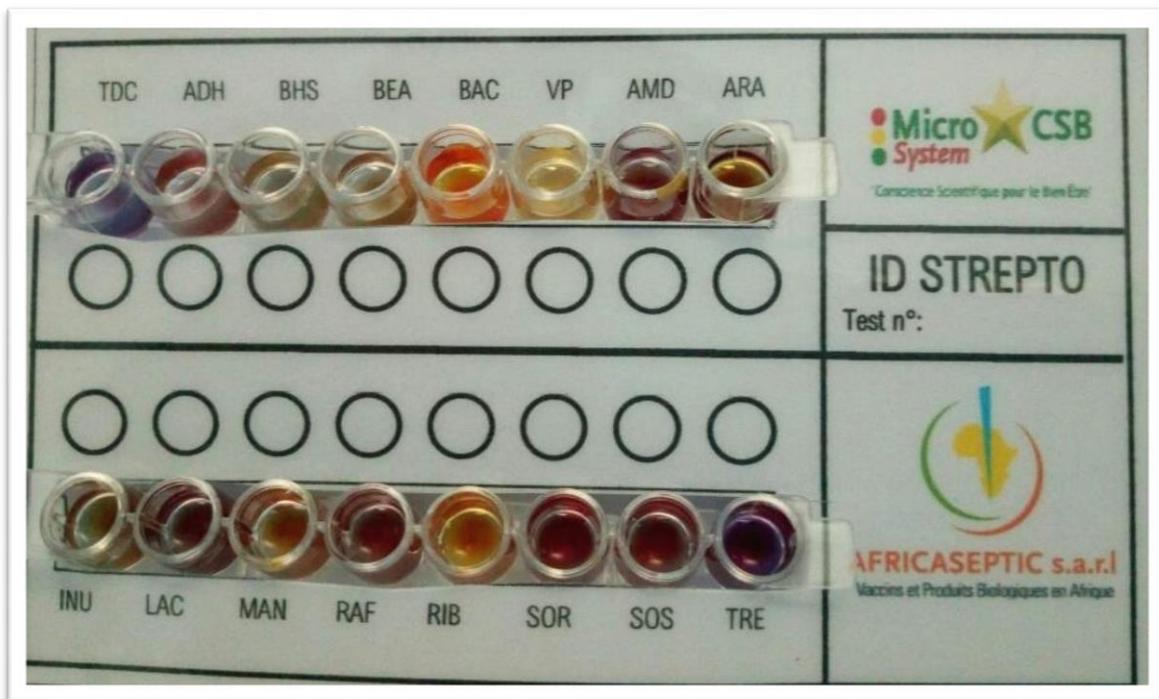


Figure 15 : Disposition de la microplaque CSB® d'identification des streptocoques

IV.2.1.2.2. Déshydratation des milieux

Après répartition dans les cupules, les milieux liquide sont été déshydratés à l'étuve pendant 48 heures à une température de 43°C en présence de dessiccateur afin de permettre une déshydratation totale.

IV.2.1.3. Contrôle qualité des microplaques déshydratées

Pour chaque lot de milieux déshydratés préparés, des tests de stérilité et d'efficacité ont été effectués.

Contrôle de stérilité

Ce test a consisté à mettre en évidence l'absence de contamination des milieux. Les cupules ont été inoculées avec de l'eau physiologique, puis recouvertes de para film avant d'être incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

Contrôle d'efficacité

Ce test a été réalisé afin de s'assurer que les milieux n'ont pas été dénaturés lors de la déshydratation. Ainsi nous avons utilisé des souches de référence en procédant à leur ré-identification à partir des milieux déshydratés.

IV.2.2. Mode opératoire de la microplaque CSB® pour l'identification des souches

L'identification des souches a été faite par ensemencement des galeries Micro-CSB staph / strepto. Ces galeries sont composées de 16 tests biochimiques qui mettent en évidence des activités enzymatiques et l'assimilation de substrats carbonés.

IV.2.2.1. Ensemencement et incubation

-Pour les staphylocoques

Un volume de 100µl d'inoculum bactérien à 4 Mac Farland a été distribué dans chaque cupule. Pour celles destinées à la recherche de décarboxylases, d'urease et à la fermentation des sucres, deux gouttes d'huile de paraffine y ont été rajoutées afin de permettre l'anaérobiose nécessaire à ces réactions.

L'incubation a été faite à l'étuve à 37°C sur un plateau recouvert de papier buvard imbibé d'eau pendant 6 heures.

-Pour les streptocoques et entérocoques

Un volume de 100µl d'inoculum bactérien à 4 Mac Farland a été distribué dans chaque cupule. Pour celles destinées à la recherche de décarboxylases, d'urease et à la fermentation

des sucres, deux gouttes d'huile de paraffine y ont été rajoutées afin de permettre l'anaérobiose nécessaire à ces réactions.

L'incubation a été faite à l'étuve à 37°C sur un plateau recouvert de papier buvard imbibé d'eau pendant 6 heures.

IV.2.2.2. Lecture et interprétation

La lecture reposait sur le changement ou non de la coloration initiale des différents milieux soit directement ou après l'addition de réactifs de révélation.

L'interprétation des résultats a été faite en fonction des tableaux IV et V :

Tableau IV : Lecture et Identification des caractères sur micro-galerie CSB Staph®

Tests	Substrats	Réactions / Enzymes	Réactifs à ajouter	Résultats Positifs	Résultats Négatifs
URE	Urée	Uréase		Rose framboise	Orangé
ADH	Arginine	Arginine décarboxylase		Violet	Jaune
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase		Violet	Jaune
VP	Glucose +Pyruvate	Production d'acétoïne	1 goutte de créatine 1 goutte de VP1 1 goutte de VP2	Rose-rouge	Jaune
ONPG	ONPG	β -galactosidase		Jaune	Incolore
NIT	Nitrate de K	Nitrate réductase	1 goutte de griess I 1 goutte de griess II	Rouge	Incolore
Nov	Novobiocine			Jaune	Rouge
GLU TRE MAN XYL SAC MNE LAC RAF	Glucose Trehalose Manitol Xylose Saccharose Mannose Lactose Raffinose	Fermentation		Jaune	Rouge

Tableau V: Lecture et Identification des caractères sur micro-galerie CSB Strepto®

Tests	Substrats	Réactions / Enzymes	Réactifs à ajouter	Résultats Positifs	Résultats Négatifs
VP	Glucose +Pyruvate	Production d'acétoïne	1 goutte de créatine 1 goutte de VP1 1 goutte de VP2	Rose-Rouge	Incolore
ADH	Arginine	Arginine décarboxylase		Violet	Jaune
BHS	Glucose	Croissance en milieu hypersalé		Jaune	Violet
BAC	Bacitracine			Jaune	Rouge
ARA MAN SOR TRE RAF SOS INU LAC RIB AMD	L-Arabinose Mannitol Sorbitol Tréhalose Raffinose Sorbose Inuline Lactose Ribose Amidon	Fermentation		Jaune	Rouge

IV.2.2.3. Calcul de probabilités

Ce procédé nous avait permis d'avoir une orientation vers une espèce dont l'identification est basée sur la mesure de similitude entre son profil et celui des espèces identifiables à l'aide des résultats obtenus après incubation.

Nous avons alors utilisé les résultats de la galerie Api staph / strepto [réf20590 ; réf 20690] ; mais également les données du livre Précis de bactériologie –Frenet *et al.* « Tableaux : Activités enzymatiques utiles à la discrimination des principales bactéries en fonction des groupes taxonomiques ; Recherche de l'assimilation ou de la fermentation de sucres polyalcools ; Recherche des métabolites intermédiaires » comme références pour pouvoir calculer ces probabilités d'identification des souches.

Dans les tables diagnostiques, il est attribué pour chaque taxon les probabilités de positivité (f) ou de négativité (1-f) aux différents tests.

Si un test est positif pour une souche, on retient f

Si un test est négatif pour une souche, on retient 1 – f.

Le produit des valeurs (probabilité cumulée) donne la fréquence théorique de la souche dans l'espèce ou probabilité absolue.

Cette fréquence théorique est ensuite divisée par la somme des fréquences théoriques pour chaque taxon soumis à la comparaison. Le résultat (*100) donne la probabilité d'appartenance à l'espèce ou probabilité relative.

Probabilité absolue = produit des valeurs obtenues pour chaque espèce = $f \times (1-f) \dots$

$$\text{Probabilité relative} = \frac{\text{Probabilité absolue}}{\text{Somme des probabilités absolues}} \times 100$$

On considère généralement les seuils suivants :

> 99,9 % : excellente identification

> 99 % : très bonne identification

> 90 % : bonne identification

> 80 % : identification acceptable

< 80 % : identification inacceptable

NB : dans le calcul des probabilités nous avons exclu 0 et 1 pour les tests positifs.

IV.2.2.4. Validation de la méthode

Nous avons procédé par la répétabilité et la reproductibilité pour valider notre méthode.

➤ La répétabilité

Technique :

Dans un délai très court, nous avons :

- Pour chaque souche de contrôle, préparé trois inocula à partir des colonies prélevées sur la gélose.
- Et effectué le test d'identification Micro CSB avec le même lot de milieux déshydratés pour les trois inocula de la souche de contrôle.

➤ La reproductibilité

Technique :

- Nous nous sommes munis de plusieurs plaques que nous avons conservées au frais.
- Chaque mois, nous avons refait l'identification des souches d'étude à partir des milieux conservés.

Les souches avaient présenté le même profil biochimique lors de l'identification pour tous les lots de milieux testés par différentes personnes du laboratoire.

IV.3. Étude de la sensibilité aux antibiotiques par micro méthode Micro-CSB®

Nous avons utilisé la méthode de dilution en milieu liquide.

Les solutions d'antibiotiques étaient préparées au préalable puis distribuées dans les cupules. Pour chaque antibiotique correspondant, on a eu deux concentrations différentes (CCS et CCI). Les cupules contenant les différentes concentrations d'antibiotiques à tester ont été placées au four à 40°C en présence de Sulfate de cuivre pendant 24H afin de permettre une déshydratation totale.

Pour chaque microplaque, il y a eu deux cupules qui ne contenaient pas d'antibiotique et qui étaient considérées comme des témoins (témoin positif et témoin négatif).

IV.3.1. Préparation du bouillon MH

Dans le bouillon MH, nous avons ajouté du Ca^{2+} , du Mg^{2+} , un indicateur coloré : le rouge de phénol et du glucose. (Voir annexe)

IV.3.2. Contrôle qualité du bouillon

-Contrôle de stérilité

Nous avons prélevé 1 ml du bouillon que nous avons incubé sans inoculum à l'étuve à 37° pendant 24H.

Le milieu était considéré comme stérile en l'absence du virage de l'indicateur coloré après incubation à 37 C pendant 24 heures.

-Contrôle d'efficacité

Des souche de référence ont été inoculées dans le bouillon puis incubées à l'étuve à 37° pendant 24 H.

Le milieu a été considéré comme efficace en cas du virage de l'indicateur coloré.

-Contrôle du pH

Le pH de chaque milieu préparé était vérifié à l'aide d'un pH-mètre et devait être égal à $7,4 \pm 0,2$.

IV.3.3. Préparation des solutions d'antibiotiques

Ce principe était basé sur la préparation d'une solution mère plus concentrée que la concentration critique supérieure de l'antibiotique dans le solvant considéré.

Les masses d'antibiotiques à peser dépendaient de leur activité.

La masse d'antibiotique requise était dissoute dans le volume exigé de solvant stérile pour obtenir la concentration de la solution mère qui était ensuite conditionnée en cryotubes puis conservée à moins 70°C.

Cette solution mère est donc 100 fois plus concentrée que la solution de travail de la concentration critique initiale (ST CCS).

L'activité d'un antibiotique est le principe actif (en µl) contenu dans 1 mg de produit.

$$\text{Quantité à peser} = \frac{V \text{ (ml)} \times C \text{ (mg/ml)}}{\text{Activité (}\mu\text{g/mg)}}$$

Tableau VI : Préparation des antibiotiques pour l'étude de la sensibilité des streptocoques

Antibiotiques	Concentrations (µg/ml)			Vol déshydraté (µl)
VA	2	1	0.5	100
TEC	2	1	0.5	100
P	0,25	0,12	0,06	100
TE	1	4		100
LVX	1	4		100
GEN	250			100

Tableau VII : Préparation des antibiotiques pour l'étude de la sensibilité des staphylocoques

Antibiotiques	Concentrations (µg/ml)			Vol déshydraté (µl)
P	0,12	0,06	0,03	100
TEC	4	2	1	100
TE	1	4		100
CIP	1	2		100
GEN	1	2		100
E	1	4		100

IV.3.4. Mode opératoire de la microplaque CSB® pour l'étude de la sensibilité des souches

IV.3.4.1. Distribution et déshydrations des solutions d'antibiotiques :

Pour chaque antibiotique à tester, nous avons distribué un volume de 100 µL,

Les microplaques ont ensuite été portées à l'étuve pendant 24 heures à 40°C en présence d'un dessiccateur.

Les microplaques déshydratées et munies d'un support ont été scellées dans des sachets stériles avec un dessiccateur et gardées à l'abri de la poussière.

IV.3.4.2. Préparation de l'inoculum

La suspension a été préparée en mettant quelques colonies de chaque souche à étudier dans 1mL d'eau distillée stérile.

Cette suspension fut ensuite ajustée de façon à obtenir une opacité équivalente à 2 sur l'échelle Mac Farland pour les streptocoques et entérocoques et 5 Mac Farland pour les staphylocoques.

L'inoculum fut dilué à son tour dans le milieu d'étude de la sensibilité de façon à obtenir un inoculum final de 10^5 à 10^6 bactérie/ml (dilution au $100^{ième}$).

IV.3.4.3. Inoculation de la microplaque

Dans chaque cupule, 100 μ l de l'inoculum bactérien ont été distribués puis recouverts avec du papier adhésif.

Les microplaques ont par la suite été incubées à l'étuve pendant 6 à 18 heures à 37 ° sous papier buvard imbibé d'eau pour éviter la déshydratation du milieu.

Pour chaque microplaque, 2 cupules ont été considérées comme témoins (TC) et ne contenaient pas d'antibiotiques.

-La première contenait 100 μ l de l'inoculum bactérien (témoin positif).

-La seconde contenait 100 μ l du bouillon (témoin négatif).

IV.3.4.4. Lecture et interprétation des résultats

La lecture a été faite à l'œil nu au bout de 4 à 6 h d'incubation à 37°C.

Pour plus de précision elle a été faite par intervalle de 2 h.

Soit $T_1= 2$ h ; $T_2= 4$ h ; $T_3= 6$ h d'incubation.

Il s'agissait de vérifier s'il y avait croissance ou non dans les cupules. En fonction de cela, nous avons pu catégoriser les souches **sensibles**, **intermédiaires** ou **résistantes**.

Selon le changement de coloration du milieu initial, les souches étaient considérées comme :

-Sensible : milieu rouge dans les cupules supérieure (CCS) et inférieure (CCI).

-Intermédiaire : milieu inférieur (CCI) : jaune ; milieu supérieur (CCS) : rouge.

-Résistante : milieu jaune dans les cupules supérieure et inférieure.

IV.3.4.5. Détermination de la sensibilité par ABG standard

Un inoculum a été préparé à partir d'une culture pure de 18 h à 24 h, dans 2 ml d'eau physiologique pour chaque souche testée. Cette suspension était ajustée à 0,5 Mac Farland à l'aide d'un densitomètre.

L'ensemencement était réalisé par écouvillonnage (méthode de Kirby Bauer). Les boîtes étaient ensuite séchées à température ambiante pendant 15 mn.

Les disques d'antibiotique étaient déposés à l'aide d'un distributeur de disques.

Les boîtes étaient ensuite incubées à 37°C à l'étuve pendant 18 à 24 h, pour mesurer ensuite les diamètres d'inhibition. L'interprétation des diamètres a été réalisée suivant les règles édictées par le CA-SFM (version 2017).

IV.3.4.6. Validation de la méthode

La validation a été réalisée par une corrélation entre les résultats obtenus avec la micro méthode et ceux obtenus avec la méthode d'antibiogramme standard. Nous avons également procédé par la répétabilité et la reproductibilité pour valider la méthode.

➤ La répétabilité

Procédure :

Pour chaque souche nous avons :

- Préparé trois inocula à partir des colonies prélevées sur la gélose.
- Puis effectué le test d'étude de la sensibilité Micro CSB avec le même lot de milieux déshydratés pour les trois inocula de la souche de contrôle.

➤ La reproductibilité

Procédure :

- Nous nous sommes munis de plusieurs plaques que nous avons conservées au frais.
- A des intervalles de temps, nous avons refait l'étude de la sensibilité à partir des milieux conservés.

IV.3.4.7 Analyses statistiques des données

Pour cette étude, la corrélation était réalisée par le test exact de Fisher, à partir du logiciel "R".

Le test exact de Fisher est un test statistique utilisé pour l'analyse des tables de contingence. C'est un test utilisé en général avec des faibles effectifs mais il est valide pour toutes les tailles d'échantillon.

Ainsi, pour chaque souche, nous avons établi une table de contingence entre la micro méthode et la méthode d'antibiogramme standard à partir du coefficient attribué en fonction du profil obtenu (sensible = 1 ; intermédiaire = 0 ; résistant = -1).



RÉSULTATS

✚ Résultats de l'identification

Identification de *S. aureus*

Dans le tableau VIII nous avons les résultats des tests majeurs d'identification de l'espèce X1.

Tableau VIII : Profil d'identification de la souche X1 probable *S. aureus*

ESPECES	Gram	Cat	Coag	DNase	Urée	ADH	VP	Nit	GLU	LAC	MAN	RAF	SAC	TRE	MNE
<i>S. aureus</i>	100	100	100	100	80	80	78	83	100	88	80	0	97	91	80
<i>S. saprophyticus</i>	100	100	0	0	65	30	79	35	100	90	88	1	96	99	2
<i>S. epidermidis</i>	100	100	0	0	88	73	68	80	100	81	0	1	97	2	70
Espèce X1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+

Le calcul des probabilités d'appartenance de la souche X1 en se basant sur son profil d'identification a permis d'obtenir les probabilités absolues et relatives représentées dans le tableau IX.

Tableau IX: Probabilités d'appartenance de souche X1 aux autres espèces

Espèces probables	Espèce X1	
	Probabilités absolues	Probabilités relatives
<i>S. aureus</i>	0,051	98%
<i>S. saprophyticus</i>	0,001	2%
<i>S. épidermidis</i>	0,000	0%

La souche X1 étudiée a été identifiée comme l'espèce *S. aureus* avec une probabilité relative de 98%.

Identification de *S. saprophyticus*

Le tableau X montre les résultats des tests d'identification de l'espèce X2.

Tableau X : Profil d'identification de la souche X2 probable *S. saprophyticus*

ESPECES	Gram	Cat	Coag	DNase	Urée	ADH	VP	Nit	GLU	LAC	MAN	RAF	SAC	TRE	XYL
<i>S. aureus</i>	100	100	100	100	80	80	78	83	100	88	80	0	97	91	0
<i>S. saprophyticus</i>	100	100	0	0	65	30	79	35	100	90	88	1	96	99	0
<i>S. epidermidis</i>	100	100	0	0	88	73	68	80	100	81	0	1	97	2	0
Espèce X2	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-

Le calcul des probabilités d'appartenance de la souche X2 en se basant sur son profil d'identification a permis d'obtenir les probabilités absolues et relatives resumées dans le tableau XI.

Tableau XI : Probabilités d'appartenance de souche X2 aux autres espèces

Espèces probables	Espèce X2	
	Probabilités absolues	Probabilités relatives
<i>S. aureus</i>	0	0%
<i>S. saprophyticus</i>	0,093	97,89%
<i>S. épidermidis</i>	0,002	2,1%

A travers le tableau XI, il apparait clairement que la souche X2 a été identifiée comme l'espèce *S. saprophyticus* avec une probabilité relative de 97,89%.

Identification de *S. epidermidis*

Le tableau XII correspond aux résultats des tests d'identification de l'espèce X3.

Tableau XII : Profil d'identification de la souche X3 probable *S. epidermidis*

ESPECES	Gram	Cat	Coag	DNase	Urée	ADH	VP	Nit	GLU	LAC	MAN	RAF	SAC	TRE	MNE
<i>S. aureus</i>	100	100	100	100	80	80	78	83	100	88	80	0	97	91	80
<i>S. saprophyticus</i>	100	100	0	0	65	30	79	35	100	90	88	1	96	99	2
<i>S. epidermidis</i>	100	100	0	0	88	73	68	80	100	81	0	1	97	2	70
Espèce X	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+

Le calcul des probabilités d'appartenance de la souche X3 en se basant sur son profil d'identification a permis d'obtenir les probabilités absolues et relatives résumées dans le tableau XIII.

Tableau XIII : Probabilités d'appartenance de la souche X3 aux autres espèces

Espèces probables	Espèce X3	
	Probabilités absolues	Probabilités relatives
<i>S. aureus</i>	0	0%
<i>S. saprophyticus</i>	0,000	0%
<i>S. épidermidis</i>	0,012	100%

Les résultats du calcul des probabilités nous montrent que la souche X3 a été très bien identifiée comme l'espèce *S. epidermidis* avec une probabilité relative de 100%.

Identification d'*Enterococcus faecalis*

Les résultats des tests d'identification de l'espèce X4 sont résumés dans le tableau XIV.

Tableau XIV : Caractères d'identification de la souche X4 probable *E. faecalis*

ESPECES	Gram	Cat	ADH	ESC	BHS	B-hem	VP	MAN	SOR	RAF	TRE	RIB	INU	AMD	LAC
<i>S. pyogenes</i>	100	0%	99	5	0	98	0	8	1	1	98	0	64	61	99
<i>S. agalactiae</i>	100	0	99	1	0	75	100	1	1	1	87	98	0	35	50
<i>E. faecalis</i>	100	2	97	99	99	0	99	98	0	0	100	98	0	96	94
Espèce X4	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-

Le calcul des probabilités d'appartenance de la souche X4 en se basant sur son profil d'identification a permis d'obtenir les probabilités absolues et relatives représentées dans le tableau XV.

Tableau XV: Probabilités d'appartenance de la souche X4 aux autres espèces

Espèces probables	Espèce X4	
	Probabilités absolues	Probabilités relatives
<i>S. pyogenes</i>	0,000	0%
<i>S. agalactiae</i>	0,000	0%
<i>E. faecalis</i>	0,002	100%

La souche X4 a été très bien identifiée comme l'espèce *E. faecalis* avec une probabilité relative de 100%.

Identification *S. agalactiae*

Les résultats des tests d'identification de l'espèce X5 sont résumés dans le tableau XVI.

Tableau XVI : Caractères bactériologiques de la souche X5 probable *S.agalactiae*

ESPECES	Gram	Cat	ADH	ESC	BHS	B-hem	VP	MAN	SOR	RAF	TRE	RIB	INU	AMD	LAC
<i>S. pyogenes</i>	100	0	99	5	0	98	0	8	1	1	98	0	64	61	99
<i>S. agalactiae</i>	100	0	99	1	0	75	100	1	1	1	87	98	0	35	50
<i>E. faecalis</i>	100	2	97	99	99	0	99	98	0	0	100	98	0	96	94
Espèce X5	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-

Le calcul des probabilités d'appartenance de la souche X5 en se basant sur son profil d'identification a permis d'obtenir les probabilités absolues et relatives résumées dans le tableau XVII.

Tableau XVII: Probabilités d'appartenance de la souche X5 aux autres espèces

Espèces probables	Espèce X5	
	Probabilités absolues	Probabilités relatives
<i>S. pyogenes</i>	0,001	0,5%
<i>S. agalactiae</i>	0,199	99,5%
<i>E. faecalis</i>	0,000	0%

La souche X5 a été très bien identifiée comme l'espèce *S. agalactiae* avec une probabilité relative de 99,5%.

Identification de *Streptococcus pyogenes*

Le tableau XVIII nous renseigne sur les résultats des tests d'identification de l'espèce X6.

Tableau XVIII: Caractères d'identification de la souche X6 probable *S.pyogenes*

ESPECES	Gram	Cat	ADH	ESC	BHS	B-hem	VP	MAN	SOR	RAF	TRE	RIB	INU	AMD	LAC
<i>S. pyogenes</i>	100	0	99	5	0	98	0	8	1	1	98	0	64	61	99
<i>S. agalactiae</i>	100	0	99	1	0	75	100	1	1	1	87	98	0	35	50
<i>E. faecalis</i>	100	2	97	99	99	0	99	98	0	0	100	98	0	96	94
Espèce X6	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+

Le calcul des probabilités d'appartenance de la souche X6 en se basant sur son profil d'identification a permis d'obtenir les probabilités absolues et relatives résumées dans le tableau XIX.

Tableau XIX : Probabilités d'appartenance de la souche X6 aux autres espèces

Espèces probables	Espèce X6	
	Probabilités absolues	Probabilités relatives
<i>S. pyogenes</i>	0,292	99,31%
<i>S. agalactiae</i>	0,02	0,68%
<i>E. faecalis</i>	0,000	0%

Avec une probabilité relative de 99,31%, nous pouvons affirmer que la souche X6 a été bien identifiée comme l'espèce *S. pyogenes*.

Résultats de l'étude de la sensibilité

Etude de la sensibilité de *Staphylococcus aureus* par Micro méthode

Les résultats de l'étude de la sensibilité de *S. aureus* par Micro méthode sont matérialisés dans le tableau suivant.

Tableau XX: Profil de sensibilité de *Staphylococcus aureus* par Micro méthode

Antibiotiques	Durée d'incubation (H)		
	2	4	6
Ciprofloxacine	NI	NI	R
Gentamicine	NI	NI	S
Pénicilline	NI	NI	R
Témoin contrôle positif	Rouge	Rouge	Jaune
Témoin contrôle négatif	Rouge	RougeRouge	

R : résistant ; S : sensible ; NI : non interprétable

La souche est sensible à la gentamicine mais résistante à la ciprofloxacine et à la pénicilline.

1. Etude de la sensibilité de *Staphylococcus aureus* par ABG standard

Les résultats obtenus pour *S. aureus* avec l'ABG standard sont décrits dans le tableau (tableau XXI) qui suit.

Tableau XXI : Profil de sensibilité de *Staphylococcus aureus* par ABG standard

Antibiotiques	Diamètres obtenus (mm)	Profil
Ciprofloxacine	6	R
Gentamicine	18	S
Pénicilline	7	R

R : résistant ; S : sensible

D'après les diamètres obtenus après incubation, la souche a été catégorisée sensible pour la gentamicine et résistante pour la ciproflaxine et la pénicilline.

L'analyse statistique des données montre qu'il n'y a pas eu de différence statistiquement significative entre les deux méthodes ($P > 0,05$).

Étude de la sensibilité de *Streptococcus agalactiae* par Micro méthode

Le tableau XXII représente les résultats de l'étude de la sensibilité de *S. agalactiae* par Micro méthode.

Tableau XXII : Profil de sensibilité de *Streptococcus agalactiae* par Micro méthode

Antibiotiques	Durée d'incubation (H)		
	2	4	6
Lévofoxacine	NI	NI	R
Tétracycline	NI	NI	S
Pénicilline	NI	NI	R
Témoin contrôle positif	Rouge	Rouge	Jaune
Témoin contrôle négatif	Rouge	RougeRouge	

S : sensible ; R : résistant ; NI : non interprétable

Les résultats résumés dans le tableau XXII montrent une sensibilité de la souche à la tétracycline et une résistance à la pénicilline et à la lévofoxacine.

Étude de la sensibilité de *Streptococcus agalactiae* par ABG standard

Le tableau XXIII décrit les résultats obtenus pour *S. agalactiae* avec l'ABG standard.

Tableau XXIII : Profil de sensibilité de *Streptococcus agalactiae* par ABG standard

Antibiotiques	Diamètres obtenus (mm)	Profil
Levofloxacin	15	R
Tétracycline	11	R
Pénicilline	17	R

R : résistant

La souche a présenté une résistance à tous les antibiotiques testés.

L'analyse des résultats de la Micro méthode et l'ABG standard pour *S. agalactiae* montre également une absence de différence statistiquement significative avec un $P > 0,05$.



DISCUSSION

✓ Résultats de l'identification

Toutes les souches de staphylocoques ont été bien identifiées avec des probabilités relatives de 98% pour *Staphylococcus aureus*, 97,89% pour *Staphylococcus saprophyticus* et 100% pour *Staphylococcus epidermidis*.

Pour l'identification de *S. saprophyticus*, nous avons eu des discordances au niveau du nitrate. La souche a donné un résultat positif alors que 65% sont négatifs (API STAPH Ident System).

D'autres discordances au niveau de l'ADH ont aussi été notées pour l'identification de *Staphylococcus aureus*. La souche a été testée négative alors que 80% des *S. aureus* sont positifs à l'ADH (API STAPH Ident System).

En effet, il existe des données qui montrent que 17 à 20% des *S. aureus* peuvent ne pas produire d'ADH [52].

Les staphylocoques à coagulase négative sont habituellement classés selon le critère de sensibilité ou de résistance à la novobiocine [46]. Le test de sensibilité à la novobiocine qui a été intégré dans la galerie a été d'une importance majeure. Il est considéré comme étant un caractère indispensable à l'identification de *S. saprophyticus*[35].

Pour les streptocoques, nous avons fait de très bonnes identifications avec des probabilités relatives de 100% pour *Enterococcus faecalis*, 99,5% pour *Streptococcus agalactiae* et 99,31% pour *Streptococcus pyogenes*.

Le test de sensibilité à la bacitracine nous a permis de faire la différence entre les streptocoques du groupe A et les autres streptocoques groupables.

Cependant, quelques discordances ont été notées au niveau des sucres tels que l'Arabinose et l'Esculine. Ces mêmes discordances ont été notées dans les travaux antérieurs [6, 17, 48].

✓ Étude comparative de la micro méthode Micro-CSB avec d'autres méthodes automatisées

Notre méthode d'étude nous a permis de raccourcir de 12 à 6 heures le délai de lecture des staphylocoques, streptocoques et entérocoques.

Cependant, avec l'avènement des automates tels que le MALDI-TOF ou le VITEK 2, il est nécessaire de passer à la prochaine étape c'est-à-dire de jouer sur la densité de l'inoculum bactérien, les substrats et un catalyseur afin de réduire de 6 à 4 heures le délai de lecture des galeries Micro-CSB®.

LeMALDI-TOF permet l'identification en quelques minutes de la quasi-totalité des staphylocoques [web 6].

LeVITEK 2permet d'identifier en 3 à 7 heures la quasi-totalité des microorganismes les plus courants [web 7].

✓ **Densité de l'inoculum**

Au niveau de cette partie de notre étude, nous avons travaillé avec une densité de 4 Mac Farland pour toutes les souches bactériennes.

Dans d'autres études, il a été prouvé que lorsque la turbidité était de 0,5 Mac Farland, l'incubation nécessiterait un temps d'incubation d'au moins 24 heures et qu'une augmentation de la densité de l'inoculum diminuerait le délai de lecture. Cette modification permettrait donc une identification aussi performante et en un temps plus court [6, 35].

✓ **Choix de l'indicateur coloré pour les sucres**

Nous avons opté pour l'utilisation d'un indicateur coloré : le BCP.

Les quantités utilisées lors de la déshydratation étaient très petites et avec un milieu incolore il était très facile de se tromper d'où le choix d'utiliser un indicateur coloré.

La zone de virage du BCP coïncide avec la variation de pH des milieux en cas de réactions positives [35].

✓ **Effet du pyruvate**

L'ajout du pyruvate dans certains milieux (VP, décarboxylases et BHS) a permis de raccourcir leur délai de lecture. Dans des études antérieures, la lecture n'était possible qu'après au moins 12 heures d'incubation à l'étuve[17, 48].

✓ **Choix et préparation des antibiotiques**

La sélection des antibiotiques s'est basée sur les recommandations du **CASFM/EUCAST(2017)**.

Nous sommes partie de solutions mères puis nous avons procédé à des gammes de dilutions jusqu'à obtenir les concentrations fixées. Pour tous les antibiotiques testés, le diluant était de l'eau distillée.

Le glucose dont la dégradation conduit à la production d'acide lactique était ici mis en évidence par le rouge de phénol qui constituait l'indicateur coloré. Le virage du pH nous a donc permis de déceler la croissance ou non des bactéries présentes dans le milieu d'étude.

L'ajout des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} permettait d'amplifier l'action des antibiotiques.

Cette même méthode a été utilisée et validée dans d'autres travaux [9, 25, 37].

Au bout de 6 heures, nous avons pu faire une lecture correcte or ce n'était pas possible au niveau d'autres travaux [9].

Pour l'analyse statistique des données, aucune différence significative n'a été notée.

✓ **Validation**

Les micros méthodes ont été validées en procédant à la répétabilité (faire la même méthode au moins 3 fois sans changement de variable à partir d'un temps t_0) et la reproductibilité (faire la même méthode à des temps éloignés avec changement de variable). Ces mêmes procédures de validation ont été utilisées précédemment dans d'autres travaux [6, 37].

Pour l'identification, les résultats ont été validés après calcul de probabilités absolues et relatives. D'autres ont utilisé la même technique dans le passé [6, 46].

Au niveau de l'étude de la sensibilité, nous sommes partis d'un même temps, avec le même inoculum et le même matériel pour faire la micro méthode et l'antibiogramme standard. Cela avait pour but de maintenir les mêmes conditions physico-chimiques lors de la validation.

✓ **Limite de l'étude**

Malheureusement nous n'avons pas pu tester tous les antibiotiques qui ont été choisis à cause de la rupture de notre stock mais aussi à cause des contraintes du temps. Il aurait été certes plus intéressant d'étudier la sensibilité de toutes les souches par rapport au panel d'antibiotiques sélectionnés au départ puis de les corrélés avec la méthode standard.

Tout de même nous avons pu prouver qu'il était possible de partir d'un temps T_0 et au bout de 6 heures identifier et dresser un profil de sensibilité par méthode Micro-CSB[®].

Ces techniques, quoi que faciles à réaliser, n'excluent en rien les tests classiques telle que par exemple la coloration de Gram, car il est obligatoire de connaître la nature du germe afin de pouvoir ajuster la densité de l'inoculum.

Par contre, seules les bactéries non exigeantes et à croissance rapide peuvent être étudiées. Ce qui constitue un grand handicap

Avantages

Ces Micro méthodes ont l'avantage de ne pas nécessiter beaucoup de temps et de moyens pour la réalisation. Cela permet non seulement une prise en charge rapide du patient mais aussi aux laboratoires les moins sophistiqués de pouvoir proposer aux malades des services de qualités à moindre coût.

Le fait de concilier dans un même laboratoire une méthode automatisée et une micro méthode peut être d'un atout majeur car comme nous le savons qui dit nouvelle technologie pense également aux pannes du système qui peuvent intervenir à tout moment.



CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Notre étude a porté sur les micro-méthodes plus précisément sur l'application dans l'identification et la sensibilité des cocci à Gram positif. Elle a été réalisée au niveau de l'Unité de Recherche et de Biotechnologie du laboratoire de Bactériologie Virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec et au laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'UCAD II.

Toutes les normes d'assurance de qualité ont été respectées à chaque étape de nos travaux en passant par le contrôle des milieux préparés, des appareils utilisés et la stabilité des caractères de toutes les souches retenues pour l'étude.

Nous avons pu atteindre notre objectif général, ce qui, dans l'avenir, permettra aux utilisateurs de gagner un temps considérable dans l'identification des staphylocoques, streptocoques et entérocoques et de dresser un profil de sensibilité le tout dans la même journée.

Ceci a pour avantage une prise en charge rapide du patient surtout dans le cas de situations d'urgence d'une part et d'autre part de pouvoir offrir des services de qualités aux moins aisés du fait du coût peu onéreux des plaques Micro-CSB®.

Par contre, avec tous les automates disponibles dans le marché, il faudrait pousser l'optimisation pour une lecture après 4 heures d'incubation en jouant sur la densité de l'inoculum, le catalyseur et les conditions physico-chimiques mais aussi trouver un moyen qui permet d'inclure dans ces galeries les souches plus exigeantes.

Recommandations :

- Revoir la méthode de déshydratation des milieux liquides
- Veiller à une meilleure forme de conservation des milieux déshydratés
- Demander un retour de la part des utilisateurs pour un suivi afin d'améliorer les produits
- Conformer chaque année les concentrations des antibiotiques aux recommandations du CA-SFM
- Augmenter le nombre de cupules, car le nombre d'antibiotiques testés est limité

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIE

1. ASSOUS M.V., and BOURHY H. Microbiologie et pathologie infectieuse. 2^{ème} édition. 1993.
2. AVRIL J.L., DABENATH., DENIS F., and MONTEIL H, Mycoplasma – ureaplasma Bactériologie clinique, Editions Ellipses, Paris.1988; 39: 481-491.
3. BAKHOUM I M. Contrôle de qualité et validation des différentes microméthodes d'identification bactérienne, Thèse pharm. Dakar : U.C.A.D; 2004, N° 08.
4. BALLE B. Micro méthode d'étude in vitro de la sensibilité aux antibiotiques de mycoplasmes urogénitaux. Thèse pharm. Dakar : U.C.A.D;1999,N°48.
5. BANNERMAN L.T, KLEEMAN K.T, and KLOSS W.E. Evaluation of the Vitek System Gram positive identification of coagulase negative Staphylococci. Pub Med. 2002; 31(5): 1322-1325.
6. BEYE N M. Identification des staphylocoques et des streptocoques par les Micro-méthodes CSB : optimisation du délai d'incubation en fonction du substrat utilisé et validation, Dakar: UCAD;2015,N°15.
7. CHABBERT, Techniques en bactériologie : sérologie bactérienne, antibiotiques en bactériologie médicale, Flammarion Médecine- Science, Paris.1972(3)41: 143-242.
8. COURVALIN P. Interpretative reading of antimicrobial Susceptibility tests. ASM News.1992; 58: 368-375.
9. DIATTA E. Etude de l'effet de l'inoculum et du temps d'incubation sur la sensibilité in vitro des cocci à gram positif aux antibiotiques. Thèse Pharm. Dakar : UCAD ; 2008, N° 101.
10. Diop A. Validation de méthodes de contrôle microbiologique de différents médicaments antiseptiques. Thèse pharm. Dakar:UCAD;2003,N°44.

11. DRAME B. Micro méthodes d'identification et d'étude de la sensibilité des entérobactéries, intérêts thérapeutiques et diagnostiques. Thèse pharm. Dakar: UCAD; 2001, N°86.
12. DRANCOURT M, and RAOULT D. Gene Sequence-Based Identification of Staphylococcus Species. JCM. 2002; 40(4): 1333-1338.
13. DRUGEON H.B, and COURTIEU A.L.,Techniques semi-automatisées où automatisées,Eds bactériologie médicale : Techniques usuelles. Paris, SIMEP, 1987;245-247.
14. DUBOIS D. Identification of a variety of Staphylococcus species by Matrix-Assisted Laser Ionization- Time flight Mass Spectrometry. JCM. 2010; 48(3): 941-945.
15. DUVAL J., Classification et Mécanisme d'action des agents antibactériens,Eds bactériologie médicale, Paris, Médecine- sciences, Flammarion, 1989;273-296.
16. FRENEY J, and al, Précis de bactériologie clinique, Editions ESKA, 2000; 783-803.
17. FALL S. Etude de l'effet de l'inoculum et du temps d'incubation sur l'identification des cocci à Gram positif.Thèse Pharm. Dakar : UCAD ; 2008,N°163.
18. FERRON A., Bactériologie médicale, Editions C. et R., 1984; (3,14,15): 32-166.
19. FORSYTH R A. A genome-wide strategy for the identification essential genes in Staphylococcus species.Molecular Microbiology. 2002; 43(6):1387-1400.
20. FRENEY J., RENAUD F., HANSEN W., and ROLLET C.,Précis de bactériologie cliniques (Antibiotiques, Généralités), Editions ESKA, Paris, 2000; 783-830.
21. GOLDMAN, and GREEN L.H. Pratical handbook of Microbiology. CRC Press, New York, second edition.2009; 74.
22. HORODNICEAU T.,Streptococaceae,Bactériologie médicale, Flammarion , Paris. 1990;31: 529-548.
23. HOUNKPONOU E. Etude compare de l'identification et de la sensibilité de Streptococcus pneumoniae et Streptococcus pyogenes isolés d'infections humaines (données prospectives à Dakar).Thèse, Pharm. Dakar : UCAD ; 2003, N°23.

24. KLOSS W. E., and WOLFSHOHL J. F. Identification of Staphylococcus species with the api Staph. Ident. System .J. clin Microbial.1982; 16 (3): 509-516.
25. KONATE B. Microméthodes d'identification et étude de la sensibilité des staphylocoques, entérocoques et streptocoques : intérêt et application dans le diagnostic rapide des infections microbiennes. Thèse pharm. Dakar : U.C.A.D; 2001, N°100.
26. KWOK Anita Y C, and CHOW A W. Phylogenetic Study of Staphylococcus and Micrococcus species based on partial hsp 60 gene sequences.Int J SystEvolMicrobiol.2003; 53: 87-92.
27. LANOTTE P, MEREGHETTI, and QUENTIN R. Démarche de l'examen bactériologique. In: Denis F, Ploy MC, Bingen CME et Quentin R, editors. Bactériologie médicale. Elsevier Masson.2007; 22.
28. LO A. Vancomycine Résistance et haut niveau de Résistance aux Aminocyclitolides de souches d'entérocoques isolées à DAKAR. Thèse Pharm. Dakar : UCAD; 1998, N° 10.
29. LOUMA TM. Prévalence des souches de Staphylococcus aureus résistantes à la métilicine au CHU du Point G. Thèse Pharm. Bamako : Université de Bamako ; 2007, N°18.
30. MARMONIER A. Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. Dans Carbonelles B.et coll. Bactériologie médicale techniques usuelles Paris, SIMEP, 1987; :227-237.
31. MAURIS A, MORANDI PA, and DEOM A. Test rapide pour la détection du streptocoque β -hémolytique du groupe A dans un prélèvement rhino-pharyngé. Suisse : centre Suisse de contrôle qualité ; Mars 2005. CH-1225 CHENE-BOURG.
32. MOUSTADIER G., Bactériologie médicale. Paris : Maloine, 1972, 551-557.
33. MUSSO D. Sensibilité des Staphylocoques aux antibiotiques et traitement des Staphylococcies Medit. Med., 1993, 9 : 22-24.

34. NABIN K. Rapid Identification of *Staphylococcus aureus* and the *mecA* Gene from BacT/ALERT Blood Culture Bottles by Using the Light Cyber system. JCM. 2002; 40(7): 2659-2661.
35. NDAO K. Mise au point d'une microméthode d'identification biochimique des *Staphylocoques*. Thèse Pharm. Dakar : UCAD ; 1999, N°44.
36. NDIR I. Mise au point d'une microméthode d'identification des Entérobactéries. Thèse Pharm. Dakar: UCAD; 1993, N°5.
37. NIANG I. Optimisation et validation de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* sur microplaques-CSB®,Dakar: UCAD,2017.
38. PATTERSON M J. *Streptococcus* [*Streptococcus pyogenes*, other streptococci and *Enterococcus*]. Medical Microbiology, 4th edition.PubMed. 1996..
39. PINA G. Critères de choix d'une méthode d'identification. DES bactériologie-virologie Lyon : Université Claude Bernard; 2003.
40. POTEL G, and BARON D. Infections à *Staphylocoques* EMS, Mal. Infection, 8001 A 10, 1990: 18p.
41. Pr Avril J.L., and Pr MONTEIL H.;Bactériol. Clinique, 3e édition,edts ellipses 2000;p39.
42. PRIBRAM, and al. A contribution of the classification of microorganisms. J. Bacteriol. 1929;18(6): 361-394.
43. REISCHL U, and al. Rapid Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Simultaneous species Confirmation Using Real-Time Fluorescence PCR. JCM. 2000; 38(6): 2429-2433.
44. RENAUD FNR, BORREL T, and MARMONIER A., Identification conventionnelle,In: Freney J, Renaud F, Hansen W et Bollet C, editors. Précis de bactériologie clinique. Editions ESKA 2000; p111.

45. RIMBAULT A, and RENAUD NR., Métabolisme des microorganismes d'intérêt médical, In : Frenet et al, editors, Précis de Bactériologie clinique, Edition ESKA 2000; p65.
46. SARR T. Algorithme d'identification des staphylocoques à coagulase négative et des streptocoques non groupables. Thèse Pharm. Dakar: UCAD ; 2004, N° 84.
47. SECK K. Micro méthode d'étude in vitro de la sensibilité aux antibiotiques des Mycoplasmes des Staphylocoques et des Entérobactéries. Thèse pharm. Dakar: UCAD; 2004,N°54.
48. SOW M F. Utilisation des méthodes biométriques pour la validation et l'identification des cocci à Gram positif. Thèse, Pharm. Dakar: UCAD ; 2007, N° 48.
49. STACKEBRANDT . et al. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacterio classis Nov. Int J SystEvol Microbiol.1997;47(2): 479-491.
50. VASSAUT A., M.C., BAILLY M. et coll., MOLLARD J.F, NAUDIN C., DUMONT G, and AZZEDINE . Definition et description d'une technique de validation (document C) Ann. Biol. Clin, 1986, 44 : 746-55.
51. WARDA K. Portage rhinopharyngé de Streptococcus pneumoniae chez les enfants. Int. J. Biol. Chem. 2012 ; 6(1): 427-437.
52. WHILEY R A et al. Phenotypic differentiation of Streptococcus intermedius, Streptococcus constellatus, and Streptococcus anginosus strains within the "Streptococcus milleri group". Journal of Clinical Microbiology.1990;28 (7): 1497-1501.

WEBOGRAPHIE

Web 1 : Caractères morphologiques des staphylocoques. Disponible sur le site <http://www.revuedesante.com/Article/staphylococcus-aureus-1102.html>. Consulté le 15 Mai 2016

Web 2 : Représentation graphique de la glycolyse. Disponible sur https://fr.wikipedia.org/wiki/Ad%C3%A9nosine_triphosphate . Consulté le 15 Mai 2016

Web 3 : Représentation graphique de la voie d'Entner-Doudoroff. Disponible sur https://en.wikipedia.org/wiki/Entner%E2%80%93Doudoroff_pathway . Consulté le 16 Juin 2016

Web 4 : Représentation graphique de la voie des pentose-phosphates. Disponible sur <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/Zsuite/6BiochMetabSUITE/1PentosePhosphate/1PentosePhosphate.htm> . Consulté le 27 Juin 2016

Web 5 : Caractères morphologiques des streptocoques. Disponible sur le site <http://www.revuedesante.com/Article/staphylococcus-aureus-1102.html>. Consulté le 03 Juillet 2016

Web 6 : MALDI-TOF. Disponible sur le site <https://fr.wikipedia.org/wiki/MALDI-TOF>. Consulté le 01 Novembre 2017

Web 7 : Vitek. Disponible sur le site www.biomerieux.fr/diagnostic-clinique/vitek-2-cartes-identification. Consulté le 01 Novembre 2017



ANNEXES

ANNEXES

Préparation des milieux

❖ Milieu Esculine (annexe1)

PRINCIPE ET USAGE

Le but principal de ce milieu est de différencier les entérocoques des streptocoques. Il peut aussi être utilisé pour l'identification présomptive d'autres microorganismes. L'esculinase présent au sein de la bactérie dégrade l'esculine en glucose et esculétine. L'esculétine se lie au citrate ferrique présent dans le milieu pour former un complexe brun foncé ou noir indiquant une réaction positive.

- **Composition** (pour 100 ml d'eau distillée)

Tableau XXIV: Composition milieu Esculine

Composants	Quantités	Rôles
Extrait de bœuf	3g	Source de d'azote de carbone et d'énergie
Digestion pancréatique de gélatine	5g	
Citrate de fer ammoniacal	0,5g	Agent révélateur Apport de Fer III
Bile de bœuf	20g	
Esculine	01g	Hétéroside Essentiel pour la mise en évidence de l'esculinase

pH final : 7,1

PREPARATION

- ☞ Mesurer les différents composants du milieu et les dissoudre un par un dans de l'eau distillée
- ☞ Compléter à 100 ml (tenir compte des proportions pour un volume différent).
- ☞ Ajuster le ph à 7,1
- ☞ Autoclaver à 120°C pendant 15 minutes

❖ Milieu BHS (annexe 2)

PRINCIPE ET USAGE

Le but principal de ce milieu est de différencier les entérocoques des streptocoques. Il peut aussi être utilisé pour l'identification présomptive d'autres microorganismes.

Ce test se base sur la propriété qu'ont les streptocoques du groupe D à croître dans un milieu hostile. Cette propriété est utilisée pour les différencier des autres streptocoques.

Cependant il faut toujours lever l'hypothèse qu'on est face à un staphylocoque.

- **Composition** (pour 100 ml eau distillée)

Tableau XXV: Composition milieu BHS

Composants	Quantités	Rôles
Poudre BHS	1,3	Bouillon nutritif
NaCl	5	Source d'électrolytes Maintien équilibre osmotique du milieu
Glucose	0,05	Source de carbone
Pyruvate	0,05	Métabolite de la glycolyse
BCP	100 µl	Indicateur coloré

pH = 7 – 7,2

Préparation

- ☞ Mesurer les composants
- ☞ Dissoudre un à un dans l'eau distillée ;
- ☞ Autoclaver à 121°C pendant 20 minutes.

❖ Milieu Clark et Lubs (annexe 3)

PRINCIPE ET USAGE

Ce milieu permet de faire la mise en évidence de la production d'acétoïne. Ce test est utilisé en particulier pour la différenciation des cocci.

Le résultat du test est obtenu après addition de réactifs de révélation.

La production d'acétoïne est mise en évidence par ajout d'une solution d'alpha-naphtol à 5% (VP1) et d'une solution de KOH à 40%, on obtient un virage au rose par fermentation de la 3-hydroxybutanone.

La production des acides mixtes est mise en évidence par la présence de rouge de méthyle (qui vire au rouge par acidification des acides mixtes). À l'inverse, la coloration jaune montre un milieu acide ou ré-alcalinisé, soit une absence de fermentation des acides mixtes.

- **Composition** (pour 100 ml eau distillée)

Tableau XXVI: Composition milieu Clark et Lubs

Composants	Quantité (g)	Rôles
Peptone trypsique	0,7	Apport d'éléments nutritifs Source de carbone et d'azote
Glucose	0,5	Source de carbone, source d'énergie, essentiel pour la production d'acide pyruvique qui est ensuite dégradé en acétylméthylcarbinol (Acétoïne)
Phosphate di potassique	0,5	Source de P, élément nutritif essentiel à la croissance Rôle de Tampon.
Pyruvate	0,5	Métabolite intermédiaire de la glycolyse

pH final = $7 \pm 0,2$

PREPARATION

- ☞ Mesurer les différents composants du milieu et les dissoudre un par un dans de l'eau distillée
- ☞ Compléter à 100 ml (tenir compte des proportions pour un volume différent).
- ☞ Ajuster le pH à 7 ± 0.2
- ☞ Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes
- ☞ Le milieu fini présente une coloration jaune et limpide.

❖ Milieu Moeller (annexe 4)

PRINCIPE ET USAGE

C'est le milieu de base pour la recherche de décarboxylases.

La fermentation du glucose entraîne une acidification du milieu. Le pH acide favorise la production et l'activation des décarboxylases et de l'ADH.

Chez les bactéries décarboxylantes, après utilisation du glucose, il se produit du CO₂ et des amines. L'alcalinisation des amines va se traduire par un virage de l'indicateur de pH.

- **Composition** (100mL d'eau distillée)

Tableau XXVII : Composition milieu Moeller : décarboxylases

Composants	Quantité (g)	Rôles
Moeller	1,04	Milieu nutritif de base
L- arginine L- ornithine	1	Acides aminés indispensables à la recherche de : L'arginine-dihydrolase (ADH) L'ornithine-décarboxylase (ODC)
Pyruvate de sodium	0,06	Métabolite intermédiaire de la glycolyse

pH = 6,3

PREPARATION

- ☞ Mesurer les différents composants du milieu et les dissoudre un par un dans de l'eau distillée
- ☞ Stériliser par autoclave à 121°C pendant 15 minutes

❖ Milieu Nitrate (annexe 5)

PRINCIPE ET USAGE

Ce milieu permet de mettre en évidence une enzyme du métabolisme énergétique chez la bactérie : la Nitrate-réductase (NR).

La réduction des nitrates par la nitrate réductase se traduit par la production de nitrites. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction, jusqu'à une dénitrification.

En présence de Nitrites on obtient une réaction colorée en rose par addition d'acide sulfanilique (GRIESS I) et d'alpha naphthylamine (GRIESS II).

En l'absence de nitrites, on va rechercher la disparition des nitrates par addition de zinc : en effet le zinc réduit les nitrates en nitrites.

- **Composition** (100 ml eau distillée)

Tableau XXVIII: Composition milieu nitrate

Composants	Quantité (g)	Rôles
Bouillon nutritif	1,5	Apporte les facteurs de croissance, vitamines et a. a
Nitrate de potassium	2	Apporte le nitrate essentiel à la recherche de l'enzyme

pH final = 7

PREPARATION

- ☞ Mesurer les différents composants du milieu et les dissoudre un par un dans de l'eau distillée
- ☞ Compléter à 100 ml (tenir compte des proportions pour un volume différent).
- ☞ Ajuster le ph à $7 \pm 0,2$
- ☞ Autoclaver à 120°C pendant 15 minutes
- ❖ **Milieu urée-tryptophane (annexe 6)**

PRINCIPE ET USAGE

Ce milieu permet la mise en évidence d'une uréase. Il peut également servir à la recherche de la TDA après addition de perchlorure de fer.

L'hydrolyse de l'urée provoque l'accumulation de carbonate d'ammonium qui rend le milieu alcalin et le virage au rouge de l'indicateur coloré.

- **Composition** (pour 1000mL d'eau distillée)

Tableau XXIX : Composition milieu urée-tryptophane

Composants	Quantités	Rôles
L-tryptophane	3g	Acide aminé nécessaire à la recherche de TDA et de la tryptophanase
Phosphate mono potassique	1g	Source de phosphate, élément nutritif essentiel pour la synthèse des acides nucléotides, de l'ATP et des acides nucléiques
Phosphate di potassique	1g	Source de phosphate
NaCl	5g	Source d'électrolytes Maintien l'équilibre osmotique du milieu Permet la croissance des bactéries halophiles telles que les vibrio
Urée	20g	Molécule azotée nécessaire pour la recherche de l'uréase
Alcool 95°	10mL	Solubilisation du tryptophane
Rouge de phénol 1%	2,5mL	Indicateur de Ph

pH final = 7

PRÉPARATION

- ☞ Mesurer les différents composants et les dissoudre un à un dans de l'eau distillée
- ☞ Stériliser par filtration
- ☞ Le produit fini est jaune

❖ **Milieu ONPG (annexe 7)**

PRINCIPE ET USAGE

Il concourt à la caractérisation de la β -galactosidase.

La préparation du milieu nécessite l'utilisation d'une solution tampon dont la formule est la suivante :

Le test à l'ONPG est une technique basée sur l'action directe de l'enzyme sur une molécule chromogène pouvant être l'ortho-nitrophényl- β -D-galactopyranoside ou le 2-naphtol- β -D-galactopyranoside. Celles-ci sont utilisées comme substrat et libèrent respectivement l'orthonitrophénol (jaune) et le β -naphtol.

- **Composition** (pour 100 ml)

Tableau XXX: Composition milieu ONPG

Composants	Quantités	Rôles
Poudre ONPG	0.3 g	Molécule analogue du lactose
Eau stérile	100 ml	Solvant

PRÉPARATION

- ☞ Mesurer la poudre d'ONPG
- ☞ Dissoudre dans l'eau distillée stérile
- ☞ Le produit fini est incolore
- ❖ **Milieu MEVAG Staph / Strepto (annexe 8)**
 - **Composition** (1000 ml d'eau distillée)

Tableau XXXI : Composition milieu MEVAG Staph/ Strepto

Composants	Quantités	Rôles
Hydrolysate de caséine	2g	Source de C et N
NaCl	5g	Source d'électrolytes Maintien équilibre osmotique du milieu
Bromocresolpourpre	7,5ml	Indicateur coloré
Extrait de levure	1g	

Sulfate de magnésium	0.2g	
----------------------	------	--

pH = 7,6

PREPARATION

- ☞ Peser les différents composants ;
- ☞ Les dissoudre dans l'eau distillée ;
- ☞ Autoclaver le mélange à 118°C pendant 15 minutes.

❖ Les glucides :

Arabinose, Mannitol ,Sorbitol, Tréhalose, Raffinose, Sorbose, Inuline, Lactose, Ribose, Amidon, Glucose, Xylose, Saccharose, Mannose.

PREPARATION

- ☞ Peser 0.2 g de chaque sucre
- ☞ Mettre dans 20 ml de MEVAG puis mélanger
- ☞ Puis stériliser

Tableau XXXII : Méthode de stérilisation des sucres (annexe 9)

Glucides		Stérilisation	Température et durée
Arabinose	10 %	Tyndallisation ou filtration	60°C 30 minutes x 3 jours
Mannitol	10 %	Autoclavage	110°C 10 minutes
Sorbitol	10 %	Autoclavage	110°C 10 minutes
Tréhalose	10 %	Autoclavage	110°C 10 minutes
Raffinose	10 %	Autoclavage	110°C 10 minutes
Sorbose	10 %	Autoclavage	110°C 10 minutes
Inuline	10 %	Autoclavage	110°C 10 minutes
Lactose	10 %	Tyndallisation ou filtration	60°C 30 minutes x 3 jours
Ribose	10%	Tyndallisation ou filtration	60°C 30 minutes x 3 jours
Amidon	10%	Autoclavage	115°C 30 minutes
Glucose	10 %	Autoclavage	115°C 30 minutes
Xylose	10 %	Filtration	110°C 10 minutes

Saccharose	10 %	Tyndallisation ou filtration	60° C 30 minutes x 3 jours
Mannose	10 %	Autoclavage	110°C 10 minutes

❖ **Bouillon MH** (annexe 10)

PRÉPARATION

- ☞ Mettre 22g de poudre de MH dans 996,25 ml d'eau distillée
- ☞ Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète
- ☞ Mettre le tout dans un flacon de 1 litre, bien homogénéisé (si nécessaire utiliser un agitateur magnétique)
- ☞ Mettre du glucose (10 g)
- ☞ Ajuster le ph à **pH final : 7,4 ± 0,2**
- ☞ Mettre du rouge de phénol (2ml)
- ☞ Mettre à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.
- ☞ Ajouter les ions Mg²⁺ (1,25 ml) et les ions Ca²⁺ (2,5 ml)
- ☞ Conserver à +4°C

❖ **Solutions d'antibiotiques** (annexe 11)

✓ **Préparation du bouillon MH**

• **Composition** (pour 100 ml)

Le milieu de base peut être préparé à partir du milieu déshydraté commercialisé ou à partir de la formule suivante :

Réactifs	Quantités
-Infusion de viande de bœuf	1,2 g
-hydrolysate de caséine	2,5 g
-amidon	0,3 g
-rouge de phénol	0,03 g
-glucose	2 g

Le pH du bouillon MH doit être ajusté à 7,2-7,6 et le milieu sera stérilisé par autoclavage à une température de 121^oC pour une durée de 15mn. Après refroidissement ajouter les solutions d'antibiotiques.

✓ **Bacitracine**

Charge disque= 0,04UI → 54,05 µg

0,0027g = 2,7 mg

Dissoudre cette masse dans 10 ml eau distillée stérile pour obtenir une solution mère

Sm = 270µg /ml

Cette solution mère va être distribuée dans des tubes nunc pour être conservée à -80°C

TAF: 100µl antibiotique (solution mère) → 10 ml eau distillée stérile pour obtenir une concentration de travail Ct= 27 µg/ml

Ajouter 100µl Ct dans 1 ml pour une concentration finale = 2,7 µg/ml

✓ **Novobiocine**

0,0032g = 3,2 mg

Dissoudre cette masse dans 10 ml eau distillée stérile pour obtenir une solution mère

$S_m = 320 \mu\text{g} / \text{ml}$

Cette solution mère va être distribuée dans des tubes nunc pour être conservée à -80°C

TAF: $100 \mu\text{l}$ antibiotique (solution mère) \rightarrow 10 ml eau distillée stérile pour obtenir une concentration de travail $C_t = 32 \mu\text{g}/\text{ml}$

Ajouter $100 \mu\text{l}$ C_t dans 1 ml de bouillon MH pour une concentration finale = $3,2 \mu\text{g}/\text{ml}$