

**UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR  
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE**

\*\*\*\*\*

ANNEE 2007

N°36



**UTILISATION DES MÉTHODES  
BIOMÉTRIQUES DANS L'IDENTIFICATION  
DE QUELQUES BACILLES A GRAM NÉGATIF**

**THESE**

**POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE  
(DIPLOME D'ETAT)**

**PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT**

**LE 16 JUILLET 2007**

**PAR**

**OULYMATA GUEYE**

**Née le 24 Janvier 1978 à Thiès**

---

**JURY**

**PRESIDENT : ISSA LO**

**Professeur**

**MEMBRES : MAMADOU BADIANE**

**Maître de Conférence agrégé**

**YERIM MBAGNIK DIOP**

**Maître de Conférence agrégé**

**DIRECTEUR DE THESE : CHEIKH SAAD BOUH BOYE**

**Professeur**

# SOMMAIRE

*LISTE DES ABREVIATIONS*

*RESUME*

*INTRODUCTION* ..... 1

## *PPREMIERE PARTIE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES*

*I/RAPPELS SUR LES BACILLES A GRAM NEGATIF*.....4

*1-1 /DEFINITION*.....5

*1-2 /CLASSIFICATION* .....5

*1-3 /LES ENTEROBACTERIES*.....6

*1-3-1/ définition*.....7

*1-3-2/ historique*.....8

*1-3-3 /taxonomie et classification*.....8

*1-3-4/ habitat*.....10

*1-4 / ESCHERICHIA COLI ET KLEBSIELLA PNEUMONIAE*.....10

*1-4-1 / caractères bactériologiques*.....10

*1-4-1-1 /Escherichia coli*.....10

*1-4-1-2 / Klebsiella pneumoniae* .....12

*1-4-2 / Pouvoir pathogène*.....13

1-4-2-1 / <i>Escherichia coli</i> .....	13
1-4-2-2/ <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	14
1-5 / <u>LES BACILLES A GRAM NEGATIF NON FERMENTAIRES</u> .....	15
1-5-1 / <u>définition</u> .....	15
1-5-2 / <u>historique</u> .....	15
1-5-3 / <u>taxonomie et classification</u> .....	15
1-5-4/ <u>habitat</u> .....	16
1-6 / <u>PSEUDOMONAS ET ACINETOBACTER</u> .....	16
1-6-1 / <u>caractères bactériologiques</u> .....	16
1-6-1-1 / <u>Pseudomonas aeruginosa</u> .....	16
1-6-1-2/ <u>Acinetobacter.sp</u> .....	18
1-6-2 / <u>Pouvoir pathogène</u> .....	19
1-6-2-1/ <u>Pseudomonas aeruginosa</u> .....	19
1-6-2-2/ <u>Acinetobacter.sp</u> .....	19
<b>II /<u>RAPPELS SUR LA CROISSANCE BACTERIENNE</u></b> .....	19
2-1/ <u>DEFINITION</u> .....	19
2-2 / <u>CONDITIONS DE CROISSANCE</u> .....	20
2-2-1/ <u>Reproduction et nutrition</u> .....	20
2-2-2 / <u>Facteurs physicochimiques</u> .....	22
2-3/ <u>COURBE DE CROISSANCE ET DIFFERENTES PHASES DE LA CROISSANCE</u> .....	24
2-4/ <u>LES METHODES DE MESURE</u> .....	25

<i>2-4-1/dénombrement bactérien</i> .....	26
<i>2-4-2/ détermination de la biomasse</i> .....	27
<b>2-5/ <u>CONDITIONS DE CROISSANCE DES BACTERIES ETUDIEES</u></b> .....	27
<b>III / <u>MODELISATION DE LA CROISSANCE</u></b> .....	27
<b>3-1/<u>LES TYPES DE MODELISATION</u></b> .....	28
<i>3-1-1 / <u>La modélisation primaire</u></i> .....	28
<i>3-1-2/ <u>La modélisation secondaire</u></i> .....	29
<b>3-2/ <u>LA METHODE D'INFERENCE BAYESIENNE</u></b> .....	30
<b>3-3/ <u>APPLICATIONS</u></b> .....	34
 <b><u>DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL</u></b>	
<b>I / <u>CADRE D'ETUDE</u></b> .....	36
<b>II / <u>MATERIEL ET REACTIFS</u></b> .....	36
<b>2-1 / <u>MATERIEL DE LABORATOIRE</u></b> .....	36
<i>2-1-1/ <u>Pour l'enrichissement et l'isolement</u></i> .....	37
<i>2-1-2/ <u>Pour l'identification</u></i> .....	37
<i>2-1-3/ <u>Pour l'étude de la croissance</u></i> .....	37
<b>2-2 / <u>REACTIFS</u></b> .....	38
<i>2-2-1/ <u>Pour l'enrichissement et l'isolement</u></i> .....	38
<i>2-2-2/ <u>Pour l'identification</u></i> .....	38
<i>2-2-3 / <u>Réactifs de révélation</u></i> .....	39
<i>2-2-4 / <u>Pour l'étude de la croissance</u></i> .....	39

<b>III / <u>METHODES</u></b> .....	41
<b>3 -1/ <u>ISOLEMENT ET IDENTIFICATION</u></b> .....	41
3 -1-1 / <u>isolement</u> .....	41
3 -1-2/ <u>identification</u> .....	41
3 -1-2-1/ <u>examen macroscopique</u> .....	41
3 -1-2-2/ <u>examen microscopique</u> .....	41
3 -1-2-3/ <u>recherche d'oxydase</u> .....	44
3 -1-2-4 / <u>milieu minimum d'identification</u> .....	44
<b>3 -2/<u>ETUDE DE LA CROISSANCE ET RECHERCHE DE L'EFFET INOCULUM SUR L'IDENTIFICATION PAR LES GALERIES MICRO- CSB</u></b> .....	46
3 -2-1/ <u>étude de la croissance par dénombrement bactérien</u> .....	46
3-2-2/ <u>recherche de l'effet inoculum sur l'identification par les galeries Micro-CSB</u> .....	51
 <b><u>TROISIEME PARTIE: RESULTATS</u></b>	
<b>I/ <u>EXPLOITATION DES RESULTATS DU DENOMBREMENT ET DES GALERIES MICRO-CSB</u></b> .....	57
<b>1-1 / <u>Escherichia coli</u></b> .....	57
1 -1-1/ <u>Résultats du dénombrement des colonies</u> .....	57
1 -1-2 / <u>Courbe de croissance</u> .....	57
1 -1-3/ <u>détermination des paramètres de la croissance</u> .....	58
1 -1-4/ <u>résultats de la galerie micro- CSB BGN</u> .....	59
<b>1 -2/<u>Klebsiella pneumoniae</u></b> .....	64
1-2-1/ <u>Résultats du dénombrement des colonies</u> .....	64

1 -2-2 / <u>Courbe de croissance</u> .....	64
1-2-3/ <u>détermination des paramètres</u> .....	65
1-3/ <u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u> .....	70
1-3-1/ <u>Résultats du dénombrement des colonies</u> .....	70
1-3-2 / <u>Courbe de croissance</u> .....	70
1-3-3/ <u>détermination des paramètres</u> .....	71
1-3-4/ <u>résultats de la galerie micro- CSB BGNNF</u> .....	73
1-4/ <u><i>Acinetobacter.sp</i></u> .....	74
1-4-1/ <u>Résultats du dénombrement</u> .....	74
1-4-2 / <u>Courbe de croissance</u> .....	74
1-4-3/ <u>détermination des paramètres</u> .....	75
1-4-4/ <u>résultats de la galerie micro- CSB BGNNF</u> .....	75
<b>II / <u>AJUSTEMENT DES PARAMETRES DES RESULTATS DU DENOMBREMENT ET PREDICTION DU TEMPS DE SEUIL</u></b> .....	<b>77</b>
2-1 / <u><i>Escherichia coli</i></u> .....	78
2-1-1 / <u>Ajustement de la taille de l'inoculum</u> .....	78
2-1-2 / <u>Prédiction du temps de seuil</u> .....	80
2-2 / <u><i>Klebsiella pneumoniae</i></u> .....	81
2-2-1 / <u>Ajustement de la taille de l'inoculum</u> .....	81
2-2-2 / <u>Prédiction du temps de seuil</u> .....	82
2-3 / <u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u> .....	83
2-3-1 / <u>Ajustement de la taille de l'inoculum</u> .....	83

**2-3-2 / Prédiction du temps de seuil**.....84

**2-4 / Acinetobacter.sp** .....85

## **QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION**

**I / LES SOUCHES**.....88

**II / ETUDE DE LA CROISSANCE PAR LA METHODE DU DENOMBREMENT** .....88

**III / METHODE D'AJUSTEMENT DES PARAMETRES DE LA CROISSANCE**.....90

**IV / EFFET INOCULUM SUR L'IDENTIFICATION DES BACILLES A GRAM NEGATIF AVEC LES GALERIES MICRO-CSB**.....91

**V / PREDICTION DU TEMPS DE SEUIL ET APPLICATION AUX GALERIES MICRO-CSB** .....93

***CONCLUSION***.....94

***BIBLIOGRAPHIE***.....97

# Liste des abréviations

**ADH** : *Arginine déshydrogénase*

**β Gal** : *Bêta galacto-D pyranoside*

**CC** : *Citrate de Christensen*

**CS** : *citrate de Simmons*

**Gel** : *Gélatinase*

**H<sub>2</sub>S** : *Hydrogène sulfuré*

**IND** : *Indole*

**MAL** : *Malonate*

**PDA** : *Phényle alanine désaminase*

**LDC** : *Lysine décarboxylase*

**ODC** : *Ornithine décarboxylase*

**URE** : *Uréase*

**NIT** : *Nitrate réductase*

**VP** : *Réaction de Voges Proskauer pour la mise en évidence de la production d'acétoïne*

**TDA** : *Tryptophane désaminase*

**GLU** : *Glucose*

**LAC** : *Lactose*

**Fig.** : *Figure*

**min** : *minute*

**ADN** : *Acide Désoxy-ribo Nucléique*

**G** : *Guanine*

**C** : *Cystine*

**mol** : *Mole*

**%** : *pourcentage*

**LCR** : *Liquide Céphalo-Rachidien*

**ARN** : *Acide Ribo- Nucléique*

**μ** : *Micron*

**H** : *Heure*

**°C** : *Degrés Celsius*

**BGNF** : *Bacille à gram négatif fermentaire*

**BGNNF** : *Bacille à gram négatif non fermentaire*

**TSA**: *Gélose Trypto-caseine Soja*

**MH**: *Gélose Muller Hilton*

**S** : *Seconde*

**+** : *Positive*

**-** : *Négative*

**+/-** : *Caractère non constant*

**PCR** : *Polymérase Chain Réaction*

**CO<sub>2</sub>** : *Dioxyde de Carbone*

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>** : *Ion nitrite*

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>** : *Ion nitrate*

**NH<sub>3</sub>** : *Ammonium*

**R-NH<sub>2</sub>** : *Fonction amine*

**SO<sub>4</sub><sup>-</sup>** : *Ion sulfate*

**S** : *Soufre*

**P** : *Phosphore*

**P<sub>i</sub>** : *Phosphore Inorganique*

**S<sup>-</sup>** : *Groupement Thiol*

**Ca** : *Calcium*

**Mg** : *Magnesium*

**Fe** : *Fer*

**Na** : *Sodium*

**K** : *Potassium*

**Cl** : *Chlore*

**O<sub>2</sub>** : *Dioxyde*

**[Na CL]** : *Concentration du Chlorure de Sodium*

**<** : *Inférieur*

**>** : *Supérieur*

**≤** : *Inférieur ou égale*

**Ln (μ)** : *Logarithme népérien de mu*

**μ** : *Vitesse de croissance instantanée ou taux de croissance*

**ml** : *Millilitre*

**g** : *Gramme*

**UFC / ml** : *Unité Forant Colonie par millilitre*

**mg / ml** : *Milligramme par millilitre*

**g / L** : *Gramme par lilitre*

**μl** : *Microlitre*

**mol.L<sup>-1</sup>** : *Mole par litre*

**nm** : *Nanomètre*

**AW** : *Activy Water*

**CMI** : *Concentration minimale inhibitrice*

**h<sup>-1</sup>** : *Heure moins 1*

**min<sup>-1</sup>** : *Minute moins 1*

**t** : *Temps*

**dN** : *Dérivé de N*

**dt** : *Dérivé de t*

**N<sub>max</sub>** : *Densité maximale*

**N<sub>0</sub>** : *Densité initiale ou densité de l'inoculum à t<sub>0</sub>*

**e** : *Exponentiel de*

**ε** : *Epsilon*

**σ** : *Ecart type*

**θ** : *Température*

**p** : *Probabilité de*

**DLC** : *Date Limite de Conservation d'u produit*

**NaClO** : *Hypochlorite de sodium*

**BT** : *Bouillon thioglycolate*

**EMB** : *Gélose éthylène méthylène bleu*

**NaOH** : *Hydroxyde de sodium*

**B-** : *Bacille à gram négatif*

**N<sub>m</sub>** : *Densité moyenne*

**Log N<sub>m</sub>** : *Logarithme décimale de la Densité moyenne*

**Ln N<sub>m</sub>** : *Logarithme népérien de la Densité moyenne*

**A** : *Absorbance*

**DO** : *Densité optique*

**mol. l<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>** : *Mole par litre centimètre moins 1*

**Mc** : *Mac Ferland*

**LDC** : *lysine décarboxylase*

**INO** : *Inositol*

**TDC** : *Tryptophane décarboxylase*

Cette étude conduite à Dakar entre octobre 2006 et juin 2007 avait pour objectif de rechercher l'inoculum adéquat qui permettrait une meilleure identification des bacilles à Gram négatif avec les galeries micro-CSB.

Au total 4 espèces ont été étudiées dont 2 entérobactéries (*E.coli* et *K. pneumoniae*) et 2 bacilles à Gram négatif non fermentaires. *E.coli* et *klebsiella pneumoniae* ont donné un pourcentage de positivité avec les galeries micro-CSB bacilles à Gram négatif étant égal respectivement à  $T_{5=100 \text{ min}} = 53,33 \%$  et  $T_{5=150 \text{ min}} = 60 \%$ .

Pour *P.aeruginosa*, un pourcentage de 46,66 % est obtenu ; tandis que *Acinetobacter.sp* a donné un pourcentage de 40 % de positivité avec les mêmes galeries micro-CSB BGNNF.

Toutes ces espèces n'ont pas donné une identification acceptable (pourcentage inférieur à 80 %).

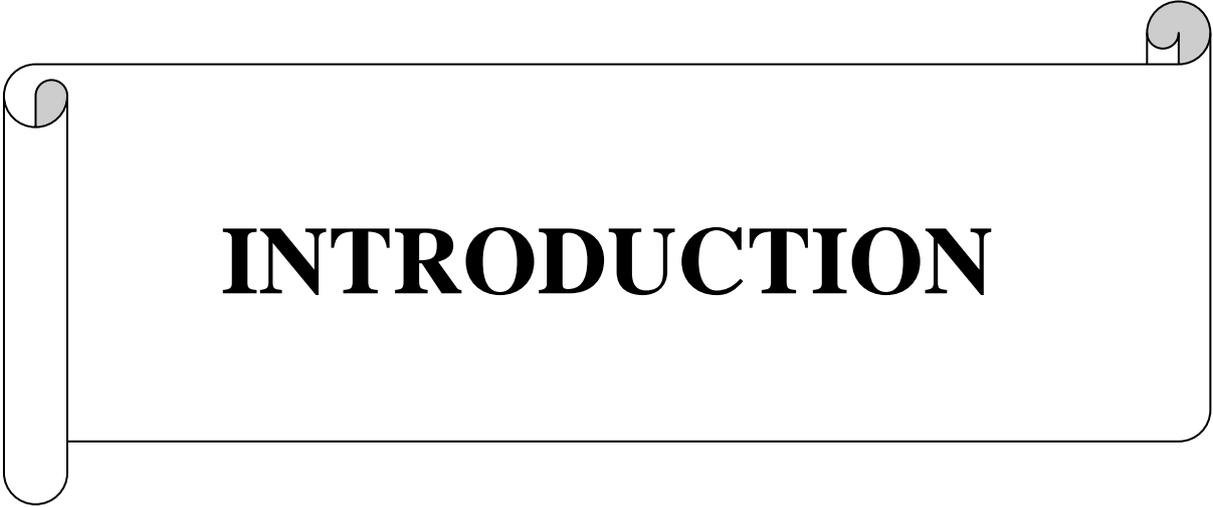
Mais, après modélisation des résultats expérimentaux et prédiction du temps de seuil par la méthode de l'inférence de Bayes, nous avons pu déterminer le temps au bout duquel l'inoculum adéquat serait obtenu.

Ainsi, pour *E.coli* nous avons trouvé un temps de seuil de 2 H30 min.

*K.pneumoniae* et *P.aeruginosa* ont donné un temps de seuil de 3 H.

Avec *Acinetobacter.sp*, un temps de seuil de 9 H a été obtenu.

Cette étude améliorerait les conditions d'utilisation des galeries micro-CSB destinées à l'identification des bacilles à Gram négatif. Elle contribuerait également à réduire le temps du diagnostic bactériologique.



# **INTRODUCTION**

Les bacilles à Gram négatif, fréquemment isolés des laboratoires de bactériologie, occupent une place importante en pathologie humaine.

Généralement, on les divise en deux grands groupes :

- les entérobactéries ;
- les bacilles à Gram négatif non fermentaires.

Les entérobactéries sont responsables de nombreuses infections telles que : les méningites, les infections urinaires, les gastro-entérites sévères et mortelles surtout chez l'enfant (*E.coli*). Elles sont également incriminées dans les infections respiratoires sévères et dans les infections nosocomiales (*K.pneumoniae*) [21].

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires quant à eux, sont à l'origine d'infections diverses et variées : cutanées, fibroses cystiques, infections nosocomiales, génito-urinaires,...

L'importance de ces bacilles à Gram négatif est non seulement liée à leur présence dans de nombreux prélèvements provenant aussi bien de sujets immunocompétents qu'immunodéprimés (VIH, leucémiques, cancéreux, greffés ...), mais aussi à leur multi résistance aux antibiotiques actuellement disponibles. C'est pourquoi ces bacilles à Gram négatif ont suscité de nombreuses études ces dernières décennies.

Aujourd'hui, l'identification de ces bacilles à Gram négatif a bénéficié de la disponibilité sur le marché d'une multitude de galeries (Galeries Api, Coterehes...) [9].

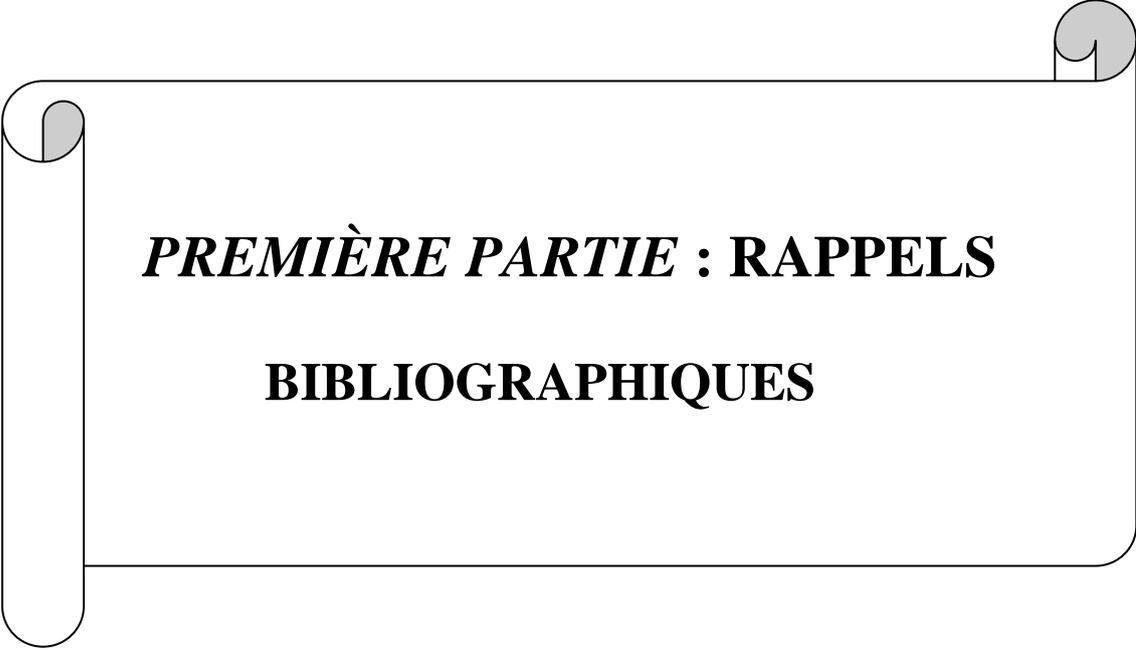
Le coût élevé ; dans les pays en voie de développement, de ces galeries importées, a amené à initier une série de recherches dans le laboratoire de bactériologie de l'hôpital Aristide le Dantec. Ces recherches ont abouti à la création de galeries dénommées « micro- C.S.B », qui ont fait la preuve de leur efficacité depuis quelques années.

Le manque de standardisation de l'inoculum dont souffrent ces galeries a motivé ce travail qui a pour objectif de :

*-d'étudier la croissance bactérienne afin d'obtenir des inocula de tailles différentes,*

*- rechercher parmi ces derniers l'inoculum adéquat permettant une bonne identification des entérobactéries par les galeries micro-CSB BGN, et des bacilles à Gram négatif non fermentaires par les galeries micro-CSB BGNNF.*

Dans ce travail, nous rappellerons d'abord quelques généralités sur les bacilles à Gram négatif, en mettant l'accent sur les bactéries concernant notre étude : *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, et *Acinetobacter sp*, puis nous aborderons la méthodologie, les résultats, et enfin, la discussion.



***PREMIÈRE PARTIE : RAPPELS***  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## I/RAPPELS SUR LES BACILLES A GRAM NEGATIF

La bactérie ou procaryote est un micro-organisme muni d'un proto-noyau (noyau dont la structure est incomplète) [44].

Cette bactérie, lorsqu'elle se présente sous la forme d'un bâtonnet, prend le nom de « bacille » dérivé du latin bacillus.

Sa découverte remonte en 1677 par *ANTONI VAN LEUWENHOEK* qui utilisa le terme d'animalicule. Mais c'est seulement, en 1828 que le terme de bactérie fût utilisé pour la première fois par *CHRISTIAN GOUTTFRIED EHRENBERG* [17].

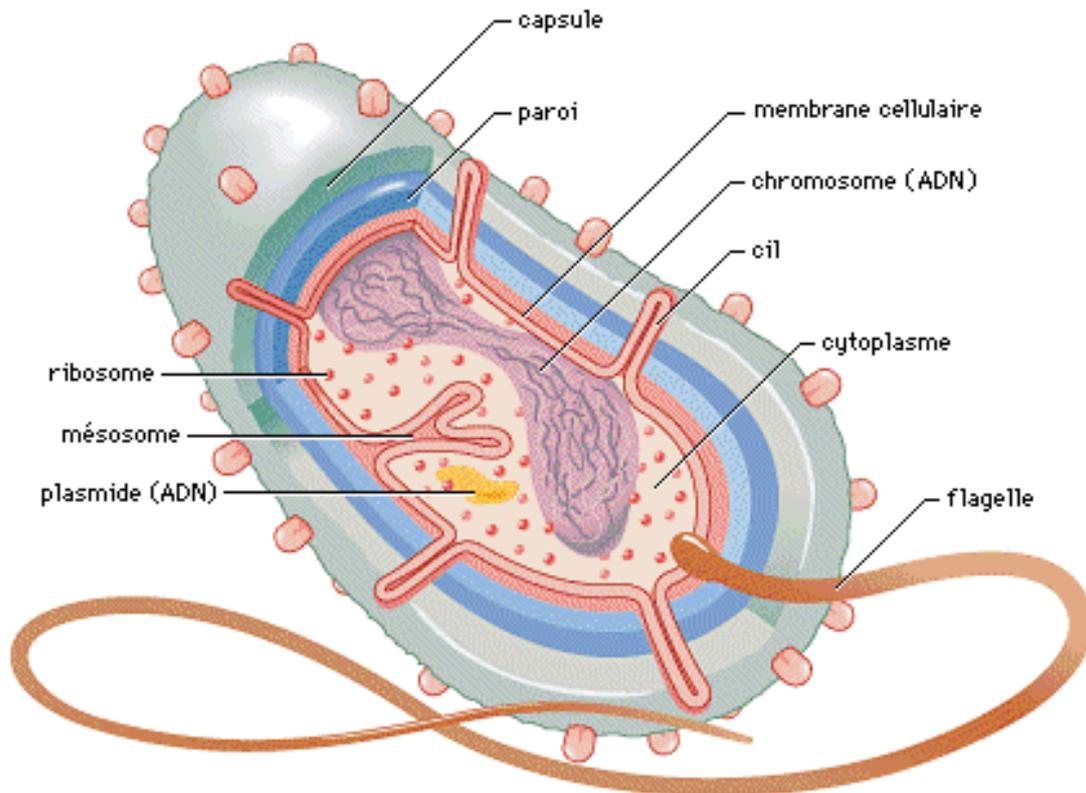
### 1-1 / DEFINITION

Les bacilles à Gram négatif sont des bactéries qui lors de la coloration de Gram rejettent le violet de Gentiane et apparaissent en rose [36].

Comme toutes les bactéries, les bacilles à Gram négatif possèdent une membrane externe ou enveloppe composée de l'extérieur vers l'intérieur:

- la capsule (élément non constant)
- le glycocalyx (fibres entourant la bactérie et qui sont difficilement visibles)
- la paroi qui détermine la forme de la bactérie
- la membrane plasmique
- le cytoplasme quant à lui renferme l'appareil nucléaire et les organites cellulaires.

La paroi des bacilles à Gram négatif est constituée d'une mince couche de peptidoglycane peu dense, de lipide complexe (lipide A) couplé à la glycosamine et à un résidu phosphore. Cette constitution chimique laisse passer l'alcool lors de la coloration de gram contrairement à la paroi des bacilles à gram positif qui est elle imperméable à cette substance [17].



### *Coupe d'une bactérie mobile*

#### 1-2/ CLASSIFICATION

Cette classification repose essentiellement sur la coloration de Gram. Cette coloration de base en bactériologie développée par *HANS CHRISTIAN GRAM*, permet la classification des bactéries en deux grands groupes :

- les bactéries à Gram positif colorées en violet
- les bactéries à Gram négatif en rose [53].

## **1-3/LES ENTEROBACTERIES**

### **1-3-1 / définition**

Les *Enterobacteriaceae* regroupent un grand nombre de genres généralement hôtes du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux.

Les bactéries de cette famille se définissent comme suit :

- bacilles à Gram négatif ;
- mobiles ou immobiles grâce à une ciliature péritriche ;
- aéro- anaérobies facultatifs ;
- se développant aisément sur milieu ordinaire (non exigeants)
- fermentant le glucose avec ou sans production de gaz ;
- dépourvus d'oxydase ;
- possédant une catalase à l'exception de *Shigella dysenteriae*
- réduisant les nitrates en nitrites (exception *Erwinia*)

Le contenu de leur génome, riche en G (guanine) et C (cytosine) fait que l'ADN de ces bactéries a un poids moléculaire de 38 à 60 mol % ; ceci a permis de recenser de nouveaux genres et de nouvelles espèces qui ne sont pas pathogènes (*Rhanella, Tatumella, Xenorhabdu,...*) [2].

### **1-3-2/ historique**

Cette famille des *Enterobacteriaceae* prend naissance en 1937 avec la découverte du genre *Enterobacter* par OTTO RHAN.

Elle regroupe des micro-organismes ayant en commun un certain nombre de propriétés biochimiques et morphologiques ; parmi lesquels on retrouve les genres : *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* et *Shigella* regroupant au total 112 espèces [33].

En 1939 ce nombre fut ramené à 67 espèces. Mais c'est avec les travaux de DON BRENNER et de PATRICK A.D.GRIMONT que cette famille a connu un essor et beaucoup de nouveaux genres et espèces furent découverts.

En 1972 EDWARDS et EWING établissaient 11 genres et 26 espèces.

En 1973 : 31 genres et 139 espèces furent répertoriés

En 1985, FARMER et COLL décrivaient 22 genres comprenant 69 espèces et 29 groupes entériques.

### **1-3-3/ Taxonomie et classification**

La taxonomie est l'ensemble des principes et théories qui permettent de classer et de valider le classement des micro-organismes ou taxons.

La famille des *Enterobacteriaceae* comprend à l'heure actuelle une centaine d'espèces dont les plus isolées en pathologie clinique appartiennent à 12 genres qui sont : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*.

Leur classification figure dans le tableau suivant :

**Tableau I : Classification des espèces d'entérobactéries les plus fréquentes en clinique humaine [33].**

<b>GROUPE</b>	<b>FAMILLES</b>	<b>Genre</b>	<b>Espèces</b>
GROUPE I	<i>EDWARDSIELLEAE</i>	<i>Edwardsiella</i>	
	<i>SALMONNELLEAE</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhi</i> <i>S. paratyphi</i> <i>S. enteritidis</i>
GROUPE II	<i>ESCHERICHIEAE</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Shigella</i>	<i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella boydii</i> <i>Shigella sonnei</i>
	<i>LEVINEAE</i>	<i>Levinea</i>	
GROUPE III	<i>KLEBSIELLEAE</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxymore</i>
		<i>Enterobacter</i>	<i>E. aerogenes</i> <i>E. cloacae</i>
		<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>
		<i>Erwinia</i>	
GROUPE IV	<i>PROTEAE</i>	<i>Proteus</i>	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Proteus rettgerii</i>
		<i>Providencia</i>	
GROUPE V	<i>YERSINIEAE</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Y. pseudotuberculosis</i>

### **1-3-4/ habitat**

Les *Entérobactéries* sont des hôtes du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux où ils sont soit des pathogènes ou des commensaux.

Elles sont souvent responsables d'infections sévères : gastro-entérites, dysenteries,...

Mais cette localisation digestive n'est pas exclusive. En effet, elles sont fréquemment isolées de différents prélèvements : urines, pus, prélèvements génitaux...

On les retrouve également dans l'environnement (sols, eau) ou elles participent à la dégradation des matières organiques, à l'altération des plantes suite à des nécroses, dégénérescence ou ramollissement tissulaire [2].

### **1-4/ESCHERICHIA COLI ET KLEBSIELLA PNEUMONIAE**

#### **1-4-1/caractères bactériologiques**

##### **1-4-1-1/ Escherichia coli**

###### **• Caractères morphologiques et culturels**

*Escherichia coli* ou colibacille est une bactérie asporulée mesurant **2 à 4 µ de long sur 0,4 à 0,6 µ de large.**

C'est une bactérie fine et allongée à extrémités arrondies, mobile grâce à une ciliature péritriche.

Ce germe non exigeant, sur gélose ordinaire donne des colonies lisses, brillantes et homogènes [26].

###### **• Caractères biochimiques**

*E.coli* possède une catalase mais est dépourvu d'oxydase.

L'étude d'activités enzymatiques et de la fermentation des sucres est réalisée à l'aide de micro-méthodes validées disponibles dans le commerce sous forme de galeries.

Ces dernières permettent l'identification de cette bactérie ainsi que le diagnostic différentiel avec les autres bactéries de la même famille.

Ces caractères sont regroupés dans le tableau II :

**TABLEAU II : Caractères biochimiques de E. coli [2, 21,15, 26]**

TESTS	ADH	ONPG	CC	CS	GEL	H2S	IND	MAL	PDA	LDC	ODC	TDA	URE	NIT	GLU	LAC	VP	ESC
RESULTATS	(+)/-	(+)	(+)	-	-	(+)	(+)	-	+/-	(+)	(+)	(+)	+/-	-	(+)	(+)	-	-

**Légende :**

+ : Caractère positif

- : Caractère négatif

+/- : caractère inconstant

**ADH** : *Arginine déshydrogénase*

**β Gal** : *Bêta galacto-D pyranoside*

**CC** : *Citrate de Christensen*

**CS** : *citrate de Simmons*

**Gel** : *Gélatinase*

**H2S** : *Hydrogène sulfuré*

**IND** : *Indole*

**MAL** : *Malonate*

**PDA** : *Phényle alanine désaminase*

**LDC** : *Lysine décarboxylase*

**ODC** : *Ornithine décarboxylase*

**URE** : *Uréase*

**NIT** : *Nitrate réductase*

**VP** : *Réaction de Voges Proskauer pour la mise en évidence de la production d'acétoïne*

**TDA** : *Tryptophane désaminase*

**GLU** : *Glucose*

**LAC** : *Lactose*

- Caractères antigéniques

Au sein de chaque genre, on individualise les espèces par l'étude des caractères biochimiques et antigéniques. Les entérobactéries possèdent toutes, des antigènes de paroi (somatiques) ou **antigènes O**.

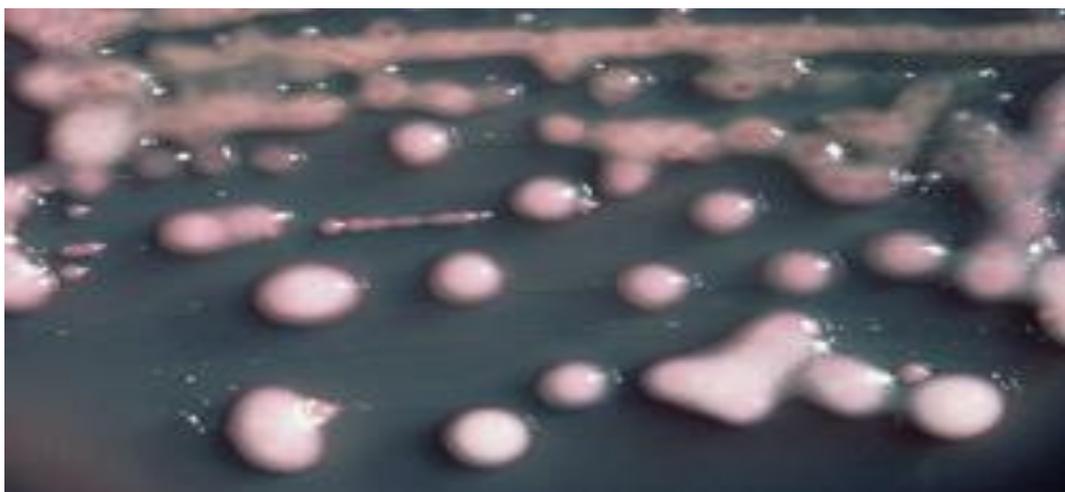
Les espèces mobiles quant à elles renferment en plus des antigènes **O**, des **antigènes H** ou flagellaires : c'est le cas de *E.coli*.

#### **1-4-1-2 / KLEBSIELLA PNEUMONIAE**

- Caractères morphologiques et culturels

Bacille à Gram négatif immobile court et trapu, mesurant habituellement **2-3 µ de long sur 0,6 µ de large**.

Sur milieu gélosé cette bactérie donne des colonies de grande taille de type M ou muqueuses, luisante avec une tendance à la confluence [21].



Aspect des colonies de *Klebsiella pneumoniae* sur milieu gélosé [48]

• Caractères biochimiques

A l'image des autres entérobactéries, *K.pneumoniae* est oxydase négative et possède une catalase [18].

Les caractères métaboliques de ce germe figurent dans le tableau ci-dessous :

**TABLEAU III : caractères biochimiques de *K. pneumoniae* [2, 21, 15, 26].**

TESTS	ADH	ONPG	CC	CS	GEL	H2S	IND	MAL	PDA	LDC	ODC	TDA	URE	NIT	GLU	LAC	VP	ESC
RESULTATS	-	(+)	(+)	(+)	-	+	(+)	+/-	+/-	(+)	-		(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)

• Caractères antigéniques

*K.pneumoniae* est une bactérie encapsulée. Ainsi, en plus des antigènes **O**, elle possède également des antigènes capsulaires (**K**) [48].

Les antigènes flagellaires sont inexistant car cette espèce est immobile.

**1-4-2 / pouvoir pathogène**

**1-4-2-1/ Escherichia coli**

Les entérobactéries sont des taxons isolées dans de nombreux aliments (céréales), et dans divers produits pathologiques (urine, LCR, selles.....) [10].

*E.coli* est souvent responsable de gastro-entérites graves pouvant être mortelles dans certains cas à l'absence de traitement.

IL est classé dans le groupe des entérobactéries pathogènes spécifiques avec les *Shigellas*, les Salmonelles qui sont responsables de dysenteries et fièvres typhoïdes graves.

Il existe divers pathovars de *E.coli* à mécanismes d'actions différentes :

- ETEC : Enterotoxinogen *Escherichia coli*, responsable de la « diarrhée des voyageurs » ou « turista » et des syndromes épidémiques dans les pays du Tiers-monde ;

- EIEC : Enteroïvasive *Escherichia coli*, encore appelé *Escherichia coli Shigella-like*, responsable de syndromes dysentériques avec invasion de la muqueuse intestinale ;

- EHEC : Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, responsable de diarrhées sanglantes liées à la production de toxines ;

- EPEC : Enteropathogen *Escherichia coli*, responsable de gastro-entérites infantiles. [33, 10].

En dehors des gastro-entérites, *E. coli* est également incriminé dans les infections urinaires, génitales, dans les méningites et dans diverses suppurations [20].

#### **1-4-2-2 /*Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae* est le chef de file du groupe des entérobactéries pathogènes opportunistes très incriminé dans les infections nosocomiales [10].

IL est également retrouvé dans les affections des voies respiratoires, dans les selles où il est très fréquent d'où le non d'indicateur de souillures fécales qu'on lui prête [2].

Ces germes sont aussi responsables de proliférations sur de nombreuses plantes, feuilles, arbres, céréales, sols eaux, etc. ...

## 1-5/ LES BACILLES A GRAM NEGATIF NON FERMENTAIRES

### 1-5-1/ définition

Ce sont des bacilles à gram négatif qui contrairement aux entérobactéries ne fermentent pas les sucres. Ces bactéries aérobies strictes sont le plus souvent oxydase positive et de culture très facile sur les milieux usuels. Elles sont soit mobiles soit immobiles par une ciliature polaire.

### 1-5-2/ historique

En 1857, le genre *Pseudomonas* anciennement appelé genre pléthorique fut répertorié avec 160 espèces à son actif.

L'édition du BERGERY'S MANUEL de 1974 retenait 29 espèces d'intérêt médical.

En 1984 30 espèces furent retenues ; mais c'est seulement avec l'événement de la génétique que de nouvelles espèces et genres ont vu le jour [2].

### 1-5-3/ taxonomie et classification

La taxonomie des bacilles à gram négatif est en perpétuelle modification et les genres couramment isolés au laboratoire sont: *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Alteromonas*.

Ces genres regroupent plusieurs espèces appartenant au grand ensemble des bactéries pathogènes opportunistes responsables d'infections nosocomiales.

La classification des bacilles à gram négatif non fermentaires repose aujourd'hui essentiellement sur la génétique (études ADN-ADN et ADN-ARN) et dans une moindre mesure sur l'étude des caractères biochimiques ce qui a permis de découvrir de nouveaux genres [15] :

- *Pseudomonas*
- *Burkholderia*
- *Ralstonia*

-*Comamonas*  
-*Brevundimonas*  
-*Sphingomonas*  
-*Stenotrophomonas*  
-*Chryseomonas*  
-*Flavimonas*  
-*Shewanella*  
-*Acinetobacter*  
-*Chryseobacterium*  
-*Flavobacterium*  
-*Sphingobacterium*  
-*Weeksella*  
-*Alcaligenes*  
-*Agrobacterium*

#### **1-5-4 / habitat**

Les bacilles à gram négatif non fermentaires sont des bactéries ubiquitaires et saprophytes très répandues dans l'environnement, en particulier dans celui hydrique (eaux, sols, végétaux) [35].

#### **1-6 / PSEUDOMONAS AERUGINOSA ET ACINETOBACTER.sp**

##### **1-6-1/ caractères bactériologiques**

##### **1-6-1-1/ Pseudomonas aeruginosa**

##### **• Caractères morphologiques et culturels, [15]**

Bacille long et fin de 1-3  $\mu$  de long sur 0,5-1  $\mu$  de large. *Pseudomonas aeruginosa* est anciennement appelé bacille pyocyanique du fait de sa capacité à donner un pus de couleur bleu-vert. Il est mobile de type polaire avec un seul cil (monotriche) [2, 24].

C'est une bactérie non exigeante qui en culture sur milieu gélosé élabore des pigments notamment :

- la pyocyanique (de couleur bleu -vert) pathognomonique ;
- des pigments jaune pâle ou jaune orangé non spécifiques [15].

• Caractères biochimiques

*Pseudomonas aeruginosa* est un germe catalase négative mais oxydase positive.

**TABLEAU IV : caractères biochimiques de *P.aeruginosa* [2, 15, 26, 36]**

TESTS	ADH	ONPG	CC	CS	GEL	H2S	IND	MAL	PDA	LDC	ODC	URE	NIT	GLU	LAC	VP	ESC
RESULTATS	(+)	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	+/-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-

• Caractères antigéniques

Il possède des antigènes O et H, qui permettent de distinguer différents types.

Les antigènes O somatiques, permettant de distinguer 16 groupes différents, numérotés de 1 à 16, qui permettent de classer environ 95 % des souches rencontrées pour le genre *Pseudomonas* [33, 36, 19].

Les antigènes O:1 à O:11 sont les plus fréquents ; le sérotype O:12 présente la particularité d'être le plus résistant aux antibiotiques et est le plus souvent incriminé dans les infections nosocomiales.

- Les antigènes H flagellaires : il en existe également plusieurs types. Présents chez les formes mobiles des bactéries à Gram négatif, ils sont de nature protéique et possèdent des propriétés opposées à celles des antigènes O [33].

### 1-6-1-2/ *Acinetobacter.sp* [10, 35]

#### • Caractères morphologiques

Bacilles à gram négatif polymorphes courts et trapus groupés en diplobacilles à extrémité arrondie avec des formes coccoïdes.

Il mesure en général **0,9 à 1,6 µ** de diamètre sur **1,5 à 2,5 µ** de long [19].

IL croît aisément sur gélose trypto-caséine soja (TSA), sur MH (MULLER HILTON) et également sur la gélose lactosée de DRIGALSIK entre 30°et 37°C au bout de 48 H. Mais, 72H d'incubation sont souvent nécessaires pour le repiquage des colonies [45].

#### • Caractères biochimiques

C'est une bactérie oxydase positive et catalase négative.

Les autres caractères biochimiques figurent dans le tableau ci-dessous.

**TABLEAU V: caractères biochimiques de *Acinetobacter.sp* [2,19,35, 45].**

TESTS	ADH	ONPG	CC	CS	GEL	H2S	IND	MAL	PDA	LDC	ODC	URE	VP	ESC
RESULTATS	-	-	(+)	(+)	-	-	(+)	+/-	+/-	-	-	(+)	-	-

#### • Caractères antigéniques

*Acinetobacter* est dépourvu d'antigènes H, mais possède les antigènes O .Cependant, certaines souches sont encapsulées (antigènes K).

## **1-6-2 /POUVOIR PATHOGENE [2, 15,18,19, 21].**

### **I-6-2-1 /Pseudomonas aeruginosa**

Ce germe est rencontré dans divers prélèvements effectués chez des malades aux systèmes de défense déficients (immunodéprimés, VIH, greffés, cancéreux, leucémiques,.....) qui sont beaucoup plus réceptifs; mais également chez les patients des services de réanimation ou de soins intensifs [35].

L'émergence de cette bactérie à l'heure actuelle est liée à sa grande fréquence dans les infections nosocomiales; mais surtout du fait de sa multi résistance aux antibiotiques. C'est ce qui est à l'origine de la difficulté de son isolement et de son identification [15].

La virulence de *Pseudomonas* est en grande partie liée à la présence de slime. IL est également responsable de cystites, de plaie, de septicémies, de diverses suppurations, d'infections génitales etc. [24].

### **1-6-2-2/ Acinetobacter.sp**

C'est un germe très incriminé dans les infections nosocomiales, cutanées et dans d'autres pathologies diverses et variées à l'image de *Pseudomonas*.

## **II /RAPPELS SUR LA CROISSANCE BACTERIENNE**

### **2-1/ DEFINITION**

L'étude de la croissance bactérienne consiste en la détermination des paramètres physiologiques de croissance pour une souche bactérienne donnée.

Cette croissance est rendue possible grâce aux divisions cellulaires qui se produisent lorsque les bactéries se trouvent dans un milieu favorable à leur développement [22].

On définit par ailleurs, la croissance comme étant l'accroissement ordonné

de tous les composants de la bactérie qui aboutit à l'augmentation de leur nombre. Pendant cette phase, il se produit un appauvrissement du milieu en nutriments d'une part et un enrichissement en sous produits du métabolisme, éventuellement toxiques d'autre part [27].

L'étude de la croissance peut se faire en milieu liquide comme en milieu solide. Cependant, dans le cadre de notre étude nous nous limiterons à la croissance bactérienne en milieu liquide à l'aide de méthodes biométriques conventionnelles.

Les méthodes biométriques sont un ensemble de techniques mathématiques utilisant les lois de la probabilité et de la statistique pour mesurer la croissance bactérienne dans un milieu de culture donné [53].

Ces méthodes ont pour but de prévoir le comportement des micro-organismes en développement dans le milieu de culture afin de mieux cerner les problèmes liés à leur conservation.

En outre, on définit la biométrie ou biométrie comme étant une discipline de la biologie qui utilise ces méthodes mathématiques dites quantitatives pour l'étude des phénomènes biologiques [60].

## **2-2/ CONDITIONS DE CROISSANCE**

### **2-2-1/ reproduction et nutrition**

Les bactéries sont des êtres unicellulaires qui se reproduisent par scissiparité ou fission binaire. Durant la division, l'ADN se duplique de même que les autres constituants nucléaires. Ainsi, la bactérie grandit puis se divise en deux cellules filles séparées par un septum de division formé par la paroi cellulaire. Divers systèmes enzymatiques de synthèse et de dégradation participent à cette division cellulaire. [41, 43].

En matière de nutrition, toutes les bactéries ont besoin d'eau, d'énergie, de carbone, d'azote et d'éléments minéraux. Ces besoins élémentaires sont suffisants pour permettre la nutrition des bactéries qualifiées de prototrophes. D'autres par contre dites auxotrophes nécessitent pour leur développement, en plus des besoins élémentaires, la présence de facteurs de croissance [19].

Un facteur de croissance ne doit pas être confondu avec un métabolite essentiel. Les facteurs de croissance et les métabolites essentiels sont des composés organiques indispensables à la nutrition. Un métabolite essentiel peut être synthétisé par une bactérie alors qu'un facteur de croissance doit être présent dans l'environnement car la bactérie est incapable de le synthétiser [11].

Les principaux facteurs de croissance sont :

- **Acides aminés**
- **Bases puriques et pyrimidiques**
- **Vitamines**

Les besoins élémentaires des bactéries sont les suivants :

• **Carbone**

- CO<sub>2</sub>: bactéries autotrophes
- Composés organiques: bactéries **hétérotrophes**

• **Azote**

- N atmosphérique
- N minéral (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>3</sub>)
- N organique (R-NH<sub>2</sub>)

### • Soufre et phosphore

- S minéral ( $\text{SO}_4^-$ ); S organique (thiol)

- P : Pi

### • Ca, Mg, Fe

### • Na, K, Cl

### • Oligoéléments

La connaissance des différents besoins nutritifs des bactéries nous permet de les classer en types trophiques selon le tableau ci-dessous.

**TABLEAU VI : classification des bactéries selon la nature du besoin nutritionnel** [41]

<b>Classe du besoin</b>	<b>Nature du besoin</b>	<b>Type trophique</b>
Energie	Oxydation de composés organiques ou inorganiques	Chimiotrophe
Donneur d'électrons	Minéral	Lithotrophe
	Organique	Organotrophe
carbone	Composé minéral	Autotrophe
	Composé organique	Hétérotrophe
Facteurs de croissance	Non nécessaires	Prototrophe
	Nécessaires	Auxotrophe

**NB** : La plupart des bactéries d'intérêt médical sont chimio-organotrophes.

#### *2-2-2 / Facteurs physicochimiques*

Ces facteurs sont indépendants de la bactérie elle-même mais relèvent surtout de l'environnement d'où le terme de facteurs extrinsèques qu'on leur prête.

Ces facteurs sont résumés dans le tableau suivant :

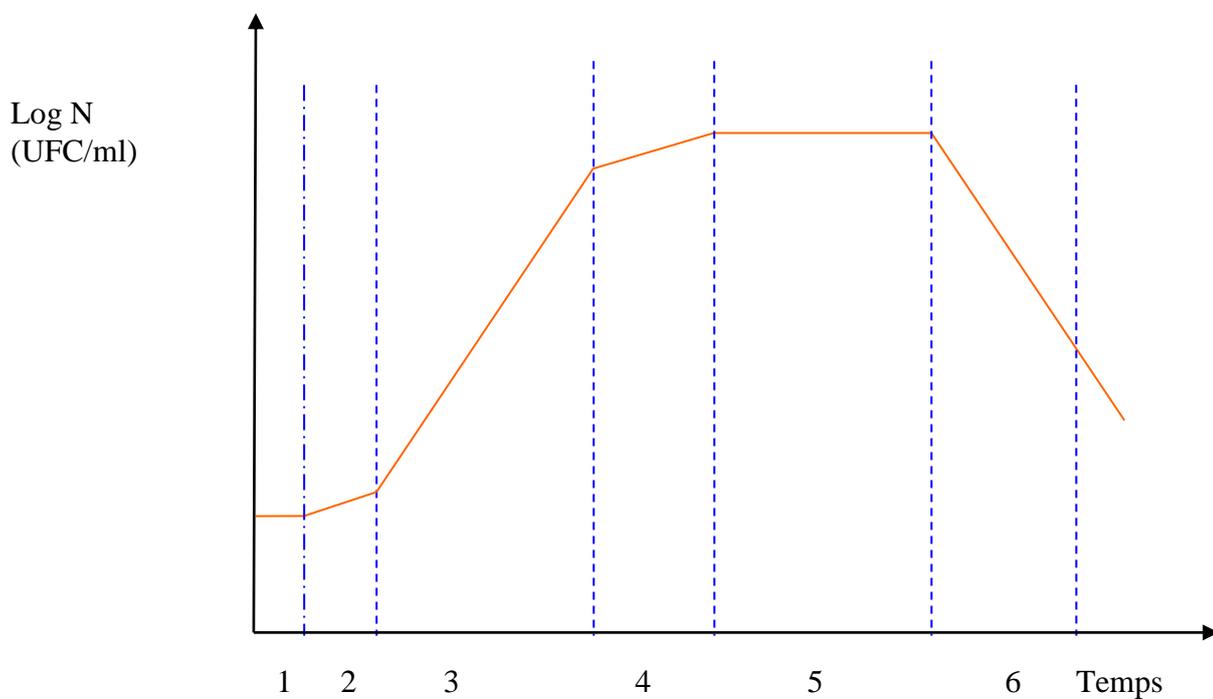
**TABLEAU VI : classification des espèces de bactéries en fonction des valeurs des différents facteurs physicochimiques[19]**

FACTEURS	VALEURS	TYPES DE BACTERIES	ESPECES
TEMPERATURE (°C)	45°C - 65°C	Bactéries thermophiles	
	30°C - 40°C	Bactéries mésophiles	<i>E.coli</i> <i>K.pneumoniae</i> <i>P.aeruginosa</i> <i>Acinetobacter</i>
	5°C-10°C	Bactéries psychrophiles	<i>Trichococcus patagoniensis</i>
pH	7 - 7,7	neutrophiles	<i>E.coli</i> <i>K.pneumoniae</i>
	6	Acidophiles	<i>Llactobacillus.sp</i>
	9	Alcalinophiles ou basophiles	<i>P.aeruginosa</i> <i>Vibrio cholerae</i>
ACTIVY WATER (AW)	>0,97		<i>Acinetobacter</i>
	>0,95		<i>E.coli</i> <i>K.pneumoniae</i>
	>0,85 ≤ 0,97		<i>S.aureus</i>
PRESSION OSMOTIQUE	[NaCL]<0,2 M	Les bactéries non-halophiles	
	[NaCL] >0,2 M	Les espèces halophiles	<i>Cobetia marina</i>
	Supporte bien les variations de pression osmotique	Les espèces halotolérantes	<i>Staphylococcus. Sp</i>
OXYGENE			
	O <sub>2</sub> uniquement	Aérobies stricts	<i>P.aeruginosa</i> <i>Acinetobacter</i>
	O <sub>2</sub> absente	Anaérobies stricts	
	O <sub>2</sub> présente et/ou absente	Aéro-anaérobies facultatifs	<i>E.coli</i> <i>K.pneumoniae</i>
	[O <sub>2</sub> ] < [O <sub>2</sub> ] <sub>air</sub>	Micro aérophiles	

## 2-3 / COURBE DE CROISSANCE ET DIFFERENTES PHASES DE LA CROISSANCE

L'étude de la cinétique de la croissance des bactéries nous a permis d'établir un certain nombre de données qui sont à l'origine d'une courbe d'allure sigmoïde décrivant 6 phases au totale.

Cette croissance se déroule en milieu liquide et dans un milieu non renouvelé c'est-à-dire que les constituants du milieu ne sont pas apportés de façon continue et leur épuisement entraîne l'arrêt de celle-ci [12].



### Exemple de courbe de croissance d'une bactérie[39]

- 1 - phase de latence : taux de croissance  $\mu=0$
- 2 - phase d'accélération  $\mu$  est fonction de la vitesse de croissance
- 3 - phase de croissance exponentielle  $\mu= \max$
- 4 - phase de ralentissement (début d'autolyse) vitesse de croissance maximale ( $\mu=\max$ )

5 - phase stationnaire ( $\mu=0$ ) : croissance nulle

6 - phase de déclin ( $\mu<0$ ) : épuisement des nutriments

On définit  $\mu$  comme étant le taux de croissance népérien [30]

Dans la phase exponentielle la densité bactérienne en UFC/ml obéit à la loi suivante :

$$N_t = 2^n N_0 \quad [28]$$

$$\text{Log } N_t = n \log 2 + \log N_0$$

$$n = \frac{\text{Log } N_t - \log N_0}{\ln 2}$$

donc

$$\boxed{G = t/n} \quad \rightarrow \quad \boxed{\mu = \ln 2 / G} \quad [38]$$

$N_0$  = la taille de l'inoculum

$N_t$  = la taille de la population bactérienne à l'instant

$n$  = nombre de division

$G$  = temps de génération

$t$  = temps

#### 2-4 / LES METHODES DE MESURE

La croissance bactérienne peut être mesurée par plusieurs méthodes parmi lesquelles :

*-Le dénombrement des populations bactériennes*

*-La détermination de la biomasse*

*-Le suivi du métabolisme des bactéries étudiées* (surtout utilisé dans la croissance des bactéries en cultures mixtes) [30].

Cependant, dans le cadre de notre étude, nous nous intéresserons particulièrement à la méthode de dénombrement sur boîte de pétri.

#### **2-4-1 / dénombrement bactérien**

Le suivi du développement des populations bactériennes peut se faire par l'estimation régulière du nombre de colonies rapporté au volume de culture ; c'est -à -dire de la densité de la population bactérienne exprimée en nombre de cellules par millilitre (MEYNELL & MEYNELL 1970).

Dans cette étude, nous utiliserons la technique de dénombrement sur boîte de pétri qui est la méthode la plus classique de mise en œuvre très simple et d'une grande fiabilité. Cette méthode permet de mesurer les densités des populations comprises entre  $10$  et  $10^8$ - $10^9$  cellules/ ml ou cellules/ g [12].

Son principe repose sur le fait qu'une cellule viable déposée sur le gel nutritif de la boîte de pétri se divise pour constituer un amas. Ce dernier est issu de cette seule cellule mère appelée colonie.

Le dénombrement des colonies revient à compter les cellules ou groupes de cellules viables déposées (unité formant colonie pour UFC). La dilution de la solution à étudier ne doit conduire à aucun chevauchement des colonies (la confluence).

Le dénombrement des colonies obtenues s'opère par plusieurs techniques :

- à l'œil nu ;**
- à l'aide d'une loupe ;**
- au microscope ;**
- par cytométrie de flux ;**
- avec un coulter counter ;**
- par D.E.F.T (direct epifluorescence technic) ;**

-sur cellule quadrillée comme la cellule de Thomas ou celle de Neubauer [5,12].

#### 2-4-2 / détermination de la biomasse

La biomasse est le plus souvent mesurée par turbidimétrie qui n'est rien d'autre que la spectrophotométrie des milieux troubles.

Cette dernière méthode n'est pas exploitée dans cette étude.

#### 2-5/ CONDITIONS DE CROISSANCE DES BACTERIES ETUDIEES

##### • ESCHERICHIA COLI ET KLEBSIELLA PNEUMONIAE

Ce sont des bactéries de la famille des Entérobactéries qui se développent entre 20 à 40°C avec un optimum à 37°C [37].

Ces germes mésophiles et neutrophiles (pH optimum voisin de 5,5-8) sont assez tolérants aux variations de la pression osmotique, de type respiratoire aero-anaérobie facultatif avec un métabolisme fermentatif.

##### • PSEUDOMONAS AERUGINOSA ET ACINETOBACTER.sp

Bactéries psychrophiles c'est-à-dire se développant à 0°C, alcalinophiles et qui supportent assez bien les variations de la pression osmotique [37].

Elles sont aérobies strictes avec un métabolisme oxydatif.

### III / MODELISATION DE LA CROISSANCE

C'est une démarche biométrique qui repose entièrement sur la définition du concept de modèle. Ainsi, selon *TOMASSONE et al (1993)* cette démarche obéit à un triplet défini par :

- un objectif scientifique susceptible d'être atteint,
- un modèle choisi pour l'atteindre,
- un corpus de données expérimentales [12].

En résumé, La modélisation consiste à construire un modèle établissant un lien entre la condition expérimentale et la croissance de façon à permettre la prévision et ceci à partir de données expérimentales.

Par ailleurs, un modèle est une représentation simplifiée de la réalité, décrivant un phénomène en facilitant la prédiction ou l'estimation et permettant parfois l'analyse des mécanismes à l'origine. Cependant, toute la réalité ne pouvant être modélisée, un choix doit être fait sur la partie de la réalité à modéliser. C'est ainsi que l'espace d'un modèle est défini par *WITZJES en 1996*.

Cela sous entend que les informations résultantes de la modélisation ne sont valables que dans l'espace choisi (*TOMASSONE et al (1993)*) [30].

### 3-1/ LES TYPES DE MODELISATION [38].

- *celle primaire basée sur l'évolution de la biomasse ou de la densité bactérienne en fonction du temps (I)*

- *secondaire qui s'appuie sur l'étude des caractères environnementaux (température, pH, AW, inhibiteurs CMI,) (I)*

-*tertiaire qui établit le lien entre (I) et (II).*

#### 3-1-1 / La modélisation primaire

C'est le modèle de croissance le plus simple et qui prend uniquement en compte la phase exponentielle (Mc Meekinel et al ,1993).

Ce modèle suppose que la vitesse de variation de la densité de la population d'un micro-organisme est proportionnelle à sa densité (voir fig. 1) [30].

(I) 
$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dN}{Ndt} = \mu_{\max} \\ t \geq 0, N \geq N_0 > 0 \end{array} \right.$$

$N$  = densité bactérienne au temps  $t$  exprimée en UFC/ml

$\mu_{\max}$  =taux de croissance instantanée maximale observée à la phase exponentielle (phase3) en  $h^{-1}$  ou  $min^{-1}$

Figure 1 : Equations du modèle primaire de la croissance

3-2-1 /La modélisation secondaire

Le modèle exponentiel étant jugé insuffisant car prenant en compte uniquement la phase 3 (voir courbe de croissance).

Une alternative est proposée par le modèle de Gompertz (1825) qui intègre la notion de fonction de freinage  $f(N)$  pour décrire les phases 5 et 4 de la courbe de croissance.

(II) 
$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dN}{Ndt} = \mu_{\max} f(N) \\ \lim_{t \rightarrow \infty} N = N_{\max} \\ t \geq 0, x \geq N_0 > 0 \end{array} \right.$$

et  $f(N) = \ln \frac{[N_{\max}]}{N} / \ln \frac{[N_{\max}]}{N_0}$

Figure 2 : Le modèle secondaire de Gompertz

Ces modèles (I) et (II) ne tiennent pas compte du temps de latence. Ce temps est défini comme étant celui mis par le micro-organisme pour s'adapter dans le milieu de culture avant de se démultiplier.

Selon Monod (1949), la fin de ce temps de latence désigné par lag (= délai de croissance) correspond au point d'intersection de la tangente à la phase exponentielle et l'origine passant par le point  $\log N_0$ .

Ainsi, nous faisons le plus souvent recours au modèle de Gompertz modifiée qui intègre les phases 1 et 5 de la croissance.

Ce dernier s'applique non plus à N (nombre de colonies dénombrées) mais, au  $\log N$  d'où la courbe d'allure sigmoïde observée.

$$\left\{ \begin{array}{l} t < \text{lag} \leftrightarrow N(t) = N_0 \\ t \geq \text{lag} \leftrightarrow N(t) = \frac{N_{\max}}{1 + \frac{[N_{\max} - 1]}{N_0} e^{-\mu_{\max}(t - \text{lag})}} \end{array} \right. \quad (\text{III})$$

**Figure 3 :** Le modèle secondaire de Gompertz reparamétré

### 3-2 / LA METHODE D'INFERENCE BAYESIENNE

Les méthodes classiques de modélisation présentent beaucoup de difficultés qui limitent leur application. C'est pourquoi, de plus en plus, la microbiologie prédictive a recours à l'inférence bayésienne qui découle du théorème de Bayes. Elle a pour but de prévoir le comportement des micro-organismes dans un milieu donné.

L'inférence de Bayes est ici utilisée dans la prédiction du temps de seuil critique qui dans cette étude correspond au début de la phase stationnaire et à la fin de celle exponentielle ; autrement dit au temps où on obtient le taux de croissance maximal. Dès lors, sa détermination devient nécessaire pour une bonne interprétation des résultats.

Le théorème de BAYES est issu des travaux du révérend THOMAS BAYES (1702-1761) présentés et édités à titre posthume par son ami Sir Richard Price. Il repose essentiellement sur l'utilisation de la loi binomiale mathématique des probabilités totales.

En biostatistique, cette loi nommée probabilité conditionnelle ou probabilité des causes peut être présentée sous cette formule :

$$P(x/y) = \frac{P(y/x) P(x)}{P(y)} \quad \text{(IV)}$$

$P(x)$  = probabilité à priori de x

$P(y)$  = probabilité à priori ou marginale de y

$P(x/y)$  = probabilité à posteriori de x sachant y

$P(y/x)$  = inconnu ou fonction de vraisemblance de x

Ce théorème est appliqué à un modèle non linéaire de la forme :

$$y = f(\theta, x) + \varepsilon \quad [6]$$

Où :

-y est la variable mesurée (ici la densité bactérienne N), x la variable de contrôle associée.

- $\varepsilon$  l'erreur aléatoire additive distribuée normalement autour d'une moyenne nulle avec une variance  $\sigma^2$

-  $S(\theta)$  la somme des carrés des écarts ;  $\sigma$  l'écart type et  $p(\theta)$ . A partir de  $p(\theta, \sigma)$  la distribution marginale *a priori* des paramètres connaissant les données (IV) devient :

$$p(\theta, \sigma/y) = \frac{p(\theta, \sigma, y)}{p(y)} = \frac{p(\theta, \sigma/y) p(\theta, \sigma)}{p(y)} \propto p(y/\theta, \sigma) p(\theta, \sigma) \quad [30]$$

L'utilisation de ce théorème dans l'estimation du vecteur paramètre est la base de l'inférence et a été appliquée à des modèles linéaires puis à des modèles non linéaires.

La relation (v) appelée densité *a posteriori* permet une estimation des paramètres du modèle lorsqu'on ne dispose d'aucune information *a priori* sur ces derniers et ceci grâce à la relation suivante

$$p(\theta, \sigma|y) \propto \frac{P(\theta)}{\sigma^{n+1}} \exp \left\{ - \frac{1}{2\sigma} \{S(\theta)\} \right\}$$

Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi le modèle de croissance exponentielle pour suivre l'évolution de la densité bactérienne en fonction du temps et l'ajustement de ce modèle se fait sur le logarithme base 10 de cette densité ( $\log N$ ).

Le système d'équation (III) devient :

$$\begin{cases} t < \text{lag}, N(t) = N_0 \\ t \geq \text{lag}, N(t) = N_0 + \frac{\mu(t-\text{lag})}{\ln 10} \end{cases} \quad (\text{VII}) \quad [6]$$

Ainsi, dans les conditions biologiques on note une relation de proportionnalité entre le temps de latence lag et l'inverse du taux de croissance  $\mu$  mais également cette relation existe entre lag et  $T_g$  le temps de génération.

$$T_g = \ln 2 / \mu$$

**NB** : Cependant, l'interprétation de ces résultats dépend d'une bonne prédiction du temps de seuil critique à partir des premiers points de la courbe de croissance qui est donné par l'équation suivante :

$$T_s = \frac{\text{Exp (K)} + (N_s - N_0) \ln 10}{\mu}$$

[30]

$N_s$  = densité seuil

$N_0$  = densité de l'inoculum

$k$  = constante ou densité à priori informative donnée par la relation :

$$k = \ln (\mu \times \text{lag})$$

### 3-3 / APPLICATIONS

L'étude de la croissance bactérienne qui repose essentiellement sur l'utilisation des méthodes biométriques est utilisée dans de nombreux domaines :

-en microbiologie alimentaire surtout dans la détermination de la DLC (date limite de conservation) des produits de conserve. C'est ce qui a ouvert la voie à une nouvelle discipline : **la Microbiologie prévisionnelle ou prédictive**. [39], [38]

-dans l'analyse microbiologique de l'eau de boisson, eau à usage médicale [9]

-dans le contrôle microbiologique des produits pharmaceutiques et sanitaires notamment à l'échelle industrielle ;

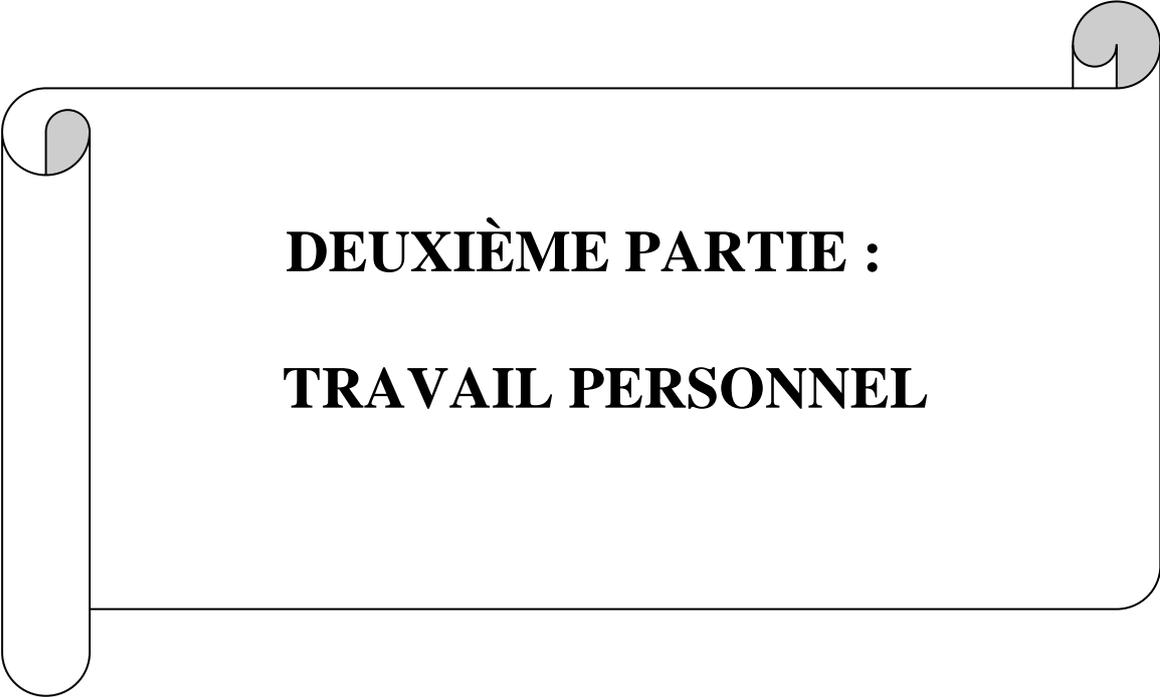
-en cosmétologie ;

-dans la conservation des produits biologiques notamment les souches de micro-organismes ;

-en gynéco-obstétrique ;

-en apiculture ;

-dans la recherche d'empreintes digitales pour l'identification des individus.



**DEUXIÈME PARTIE :**  
**TRAVAIL PERSONNEL**

## **I / CADRE D'ETUDE**

Cette étude a eu lieu laboratoire de bactériologie & virologie fondamentale et appliquée de l'UCAD II salle 215.

Elle a porté uniquement sur des souches de références qui ont été déjà identifiées et conservées au laboratoire.

## **II / MATERIEL ET REACTIFS**

### **2-1/ MATERIEL DE LABORATOIRE**

- Autoclave
- Agitateur magnétique
- Balance de précision
- Bain marie
- Becher
- Embouts stériles
- Eprouvettes
- Erlen Meyer
- Filtres millipores
- Flacons en verre avec bouchon rodé
- Micropipettes
- ph-mètre
- Tubes à essais stériles
- Agitateur magnétique
- Dessiccateur
- Etuve
- Four micro-onde
- Ecouvillons

### **2-1-1/ Pour l'enrichissement et l'isolement**

- Bec bunsen
- Autoclave
- Anse de platine
- Boite de pétri
- Etuve

### **2-1-2/ Pour l'identification**

- Anse de platine
- Becher rempli de Na CLO
- Emballage en plastique
- Lames porte-objet
- Lamelles
- Papier buvard
- Microplaques

### **2-1-3 / Pour l'étude de la croissance**

- Anse de platine
- Boites de pétri vides
- Bain marie thermostaté
- Tube avec aération de 50mL
- Râteau en verre
- Spectrophotomètre
- Etuve à 37°C
- plaques de dilution

## **2-2/ REACTIFS**

### ***2-2-1/ Pour l'enrichissement et l'isolement***

- Bouillon au thioglycolate (BT)
- Bouillon trypticase soja (BTS)
- Gélose Muller Hilton (MH)
- Gélose trypticase soja
- Gélose Mac Conkey

### ***2-2-2/ Pour l'identification***

- Acétate de plomb
- Alcool 95°
- Bleu de bromothymol
- Bromocrésol pourpre
- Citrate de fer Ammoniacal
- Citrate trisodique
- Disque ONPG
- Extrait de levure
- Extrait de viande
- Glucides: glucose, lactose, mannitol, sorbitol, saccharose  
Inositol, rhamnose...
- Gélatine
- Bouillon nutritif
- L-tryptophane, L-arginine, L-phenyl alanine, L-lysine, ornithine
- NaCL
- NaOH
- Peptone triptyque

### 2-2-3 / Réactif de révélation

- Acide sulfanilique à 8g/l
- Acide  $\alpha$  naphtylamine à 5g/L
- Alpha naphthol
- FeCL<sub>3</sub>
- KOH à 10°/°
- Réactif de kovacs
- Lugol
- Fuschine phéniquée
- Alcool 95°
- Eau distillée
- Eau

### 2-2-4/Réactif pour l'étude de la croissance

- Gélose Mac Conkey liquéfiée
- Inoculât de bactéries issues de la culture de souches préidentifiées
- Souches de B- préidentifiées
- ph-mètre
- Tubes à essais stériles
- Tube avec aération de 50mL
- Râteau en verre :
- Spectrophotomètre.

**Figure 5 :** matériel d'étude de la croissance par dénombrement sur boîte de pétri



**figure 4 :** aperçu de la paillasse avant le début de la manipulation

### **III / METHODES**

#### **3 -1/ ISOLEMENT ET IDENTIFICATION**

##### **3 -1-1/ Isolement**

En vue d'obtenir des colonies des germes à identifier, les souches conservées à -20°C ou à -80°C sont régénérées dans un bouillon d'enrichissement (BT), puis ensemencées sur la gélose EMB. L'incubation se fait à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

##### **3 -1-2 / L'IDENTIFICATION**

###### **3 -1-2-1/ EXAMEN MACROSCOPIQUE**

- *E.coli* sur EMB ou MH donne de grosses colonies sèches, lactose positive à contour irrégulier.
- K.pneumoniae* : grosses colonies muqueuses, lactose + ayant un aspect de goutte de miel, avec une tendance à la confluence.
- P.aeruginosa* donne sur MH colonies rappelant « un œuf sur le plat » avec un pigment bleu-vert à odeur caractéristique (acacia ou seringa)
- Acinetobacter* sur MH donne colonies des lisses à bordure nettes.

###### **3 -1-2-2 / EXAMEN MICROSCOPIQUE**

###### **• ETAT FRAIS**

###### **- PRINCIPE ET TECHNIQUE**

C'est un examen de mise en œuvre très simple et qui a lieu au microscope optique à l'objectif x 40. IL permet d'apprécier la morphologie des bactéries, leur mode de groupement, leur abondance et leur mobilité.

Sur une lame porte objet stérile, déposer une goutte d'eau physiologique et une goutte de colonie. Homogénéiser et recouvrir d'une lamelle en évitant d'emprisonner les bulles d'air, lire au microscope.

#### -RESULTATS :

*E.coli* : bacilles polymorphes mobiles péritriches

*K.pneumoniae* : donne des bacilles immobiles courts

*Acinetobacter* : bacilles courts et trapus groupés en diplobacilles qui sont immobiles.

*Pseudomonas aeruginosa* : bacilles longs et fins à mobilité polaire

#### • COLORATION DE GRAM

##### -PRINCIPE

C'est la coloration de base en Bactériologie et elle permet une classification des bactéries selon leur structure. Elle est l'un des caractères essentiels de la classification des bactéries. Plusieurs facteurs vont intervenir dans cette coloration :

- la différence de composition chimique de bactéries ;
- la différence de perméabilité de la paroi bactérienne.

##### -TECHNIQUE

La coloration de Gram se déroule en plusieurs étapes qui se succèdent et consistent à :

- fixer le frottis à la flamme d'un bec bunsen ;
- recouvrir le frottis de la solution de cristal violet, laisser agir une minute (violet de gentiane ;
- rejeter le colorant puis laver à l'eau ;

- recouvrir la préparation de Lugol, laisser agir une minute ;
- rejeter le Lugol puis laver à l'eau ;
- décolorer à l'alcool 95° ;
- rincer à l'eau courante et recouvrir la lame de solution de fuchsine diluée, laisser agir quelques secondes ;
- rejeter la fuchsine, laver abondamment, égoutter, sécher entre deux feuilles de papier buvard propres.

-RESULTATS :

Après la coloration de Gram, on voit des bacilles ou diplobacilles à Gram négatif colorés en rose.



**Figure 6 :** *E.coli* après coloration de Gram [46].

### **3 -1-2-3 RECHERCHE D'OXYDASE**

#### ◇ PRINCIPE

Cette réaction est recherchée sur des cultures en milieu gélosé exemptes de sucres fermentes cibles ou de sang. Les bactéries possédant des oxydases en présence de sucres donnent des métabolites qui se combinent avec le réactif utilisé pour donner une coloration variable selon la bactérie.

#### ◇ TECHNIQUE

La réaction des oxydases se fait à l'aide de disques de commerce prêts à l'emploi, imprégnés d'eau distillée sur lequel on dépose une colonie.

#### ◇ RESULTAT

Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où on a déposé la colonie, soit immédiatement, soit quelques secondes après.

En fonction du délai d'apparition de la coloration, on a :

- Entérobactéries (Oxydase négative) ;
- *Acinetobacter* (Oxydase négative) ;
- *Pseudomonas aeruginosa* (Oxydase positive après 20 à 30 secondes).

### **3 -1-2-4/ MILIEUX MINIMUM D'IDENTIFICATION**

#### • MILIEU MANNITOL MOBILITE

C'est une gélose molle conditionnée en tubes et qui permet d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des germes.

Elle estensemencée par piqûre centrale jusqu'au fond des tubes à l'aide d'une anse de platine.

La fermentation du mannitol se matérialise par un virage du milieu au jaune (*E.coli* ; *K.pneumoniae*).

Les bacilles mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement, créant un trouble du milieu alors que les bacilles immobiles poussent uniquement le long de la strie d'ensemencement (*E.coli* ; *Acinetobacter*).

- **SUR MILIEU KLIGER HAJNA**

C'est un milieu solide coulé en pente contenant du thiosulfate, des ions ferreux, de la lysine, du glucose, du lactose et des éléments nutritifs permettant la multiplication et la croissance des bactéries.

Sur ce milieu on peut rechercher les 6 caractères suivants :

- ONPG ;
- Fermentation du lactose:milieu rouge vire au jaune (indicateur coloré rouge de phénol) ;
- fermentation du glucose ;
- la production ou non de gaz sous forme de bulles d'air ;
- la présence de lysine décarboxylase ;
- la production de SH<sub>2</sub>.

**RESULTAT** : *E.coli* est glucose+, lactose+, gaz + et SH<sub>2</sub> -

*K.pneumoniae* : glucose+, lactose-, gaz + et SH<sub>2</sub> +

*Pseudomonas aeruginosa* : glucose-, lactose-, gaz - et SH<sub>2</sub> -

*Acinetobacter* : glucose-, lactose-, gaz - et SH<sub>2</sub> -

- **UTILISATION DU CITRATE DE SIMMONS (CS)**

**Ce milieu coulé en tubes est utilisé pour l'étude de l'utilisation du citrate comme seule source de carbone par les germes.**

Il contient un indicateur de pH qui est le bleu de bromothymol, ce qui confère au milieu une coloration verte à l'état acide.

Les germes qui utilisent le citrate comme seule source de carbone entraînent une alcalinisation du milieu, d'où le virage du vert au bleu.

RESULTAT : *E.coli* est CS-

*K.pneumoniae* : CS+

*Pseudomonas aeruginosa* CS+

*Acinetobacter* : CS+

### 3 -2) ETUDE DE LA CROISSANCE ET RECHERCHE DE L'EFFET INOCULUM SUR L'IDENTIFICATION PAR LES GALERIES MICRO- CSB

#### 3 -2-1/ étude de la croissance par dénombrement

L'étude de la croissance nécessite une parfaite connaissance des facteurs influençant cette croissance.

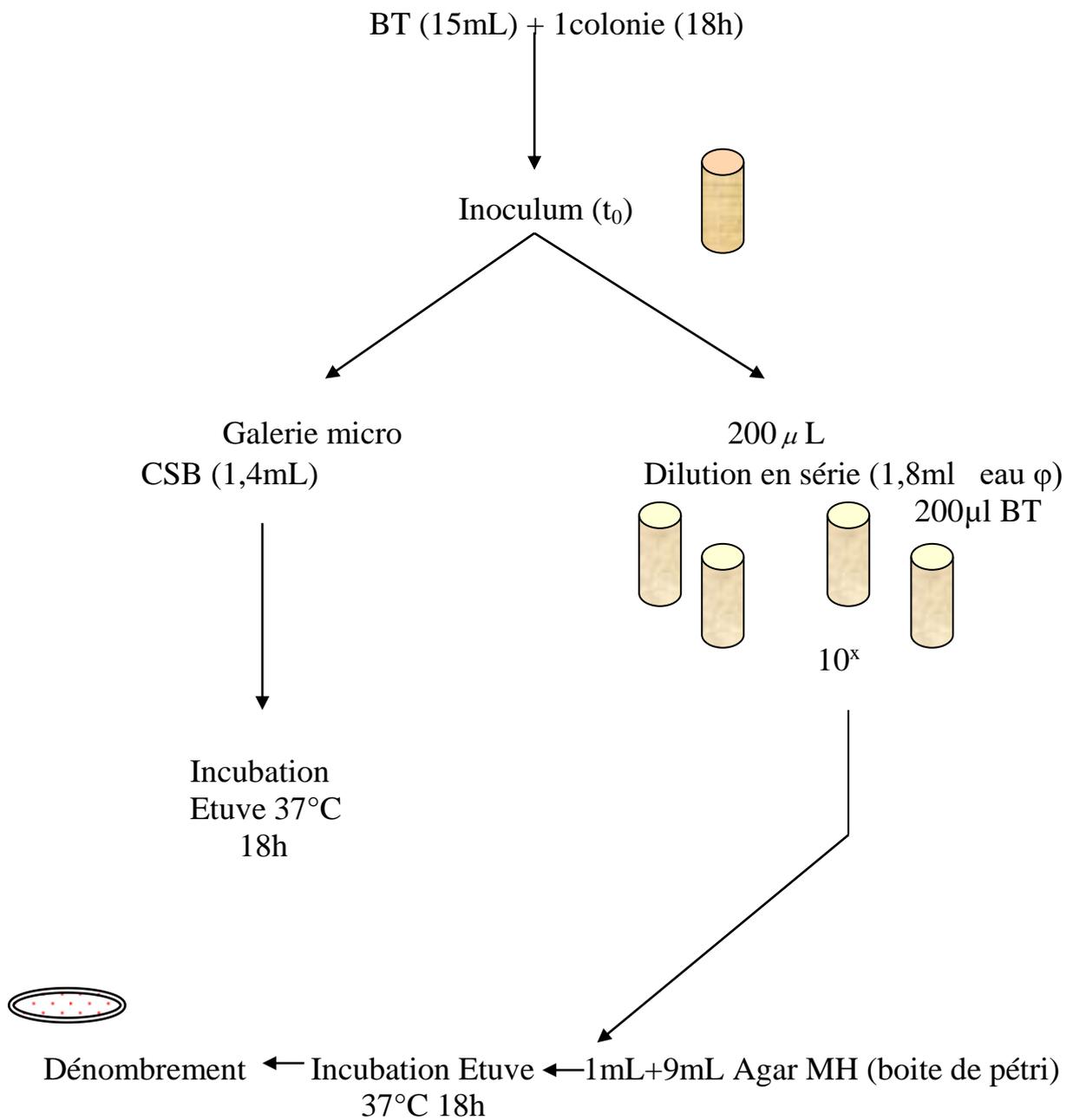
Nous allons étudier la croissance de quelques bacilles à gram négatif en utilisant comme milieu de culture de l'agar simple. Ce milieu synthétique est assez suffisant pour permettre la croissance de ces bacilles peu exigeants.

Après identification des bactéries sur lesquelles va porter notre étude nous allons prélever à l'aide d'une anse de platine une colonie de la culture dans 15ml de bouillon thioglycolate (BT).

Après homogénéisation nous obtenons alors une suspension qui constitue notre échantillon de volume  $V_0=15\text{ml}$  et de concentration  $C_0$  à l'instant  $t = 0 \text{ min } (T_0)$ .

A partir de ce moment, un prélèvement de 2 ml est effectué toutes les 20 à 30 min et ceci pendant 2 à 3 h. Sur les 2ml, les 350 $\mu$  vont servir pour la lecture de la DO, les 200 $\mu$ l pour le dénombrement bactérien. Les 1,4 ml restant sont utilisés pour l'ensemencement de la galerie micro-CSB.

Cependant l'inoculum de départ c'est-à-dire à  $t_0$  ne présente pas d'intérêt sur l'étude de la positivité de la galerie micro CSB et par conséquent, il ne sera pas ensemencé.



**Figure7** : Schémas des différentes étapes de la manipulation

- Le dénombrement bactérien

• PRINCIPE :

C'est la méthode la plus simple pour étudier la croissance bactérienne. Elle repose sur le calcul du nombre de germes viables en culture à des intervalles de temps régulier.

IL utilise l'UFC pour unité formant colonie qui considère que chaque colonie identifiée correspond à une bactérie.

• TECHNIQUE :

Avec les 200µl prélevés à des intervalles de temps régulier autrement dit toutes les 20 à 30min ; nous effectuons une dilution en série de cet aliquote . 1ml de la dernière dilution est déposé au milieu d'une boite de pétri vide et stérile avec 9ml d'agar simple préalablement liquéfié au bain marie et refroidie à la température du laboratoire.

Homogénéiser et laisser la gélose se solidifier avant de mettre les boites a l'étuve à 37°C pendant 24H au bout duquel nous procéderons au dénombrement des colonies.

Dans un souci de minimiser les erreurs de dénombrement, nous avons décidé d'ensemencer à chaque point de prélèvement deux boites de la dernière dilution.

Au début ( $T_0$ ) une dilution à  $10^{-4}$  est réalisée puis, progressivement  $T_1$  ( $10^{-5}$ ),  $T_2$  ( $10^{-6}$ ),  $T_3$  ( $10^{-7}$ ),  $T_4$  ( $10^{-8}$ ) et  $T_5$  ( $10^{-9}$ ).

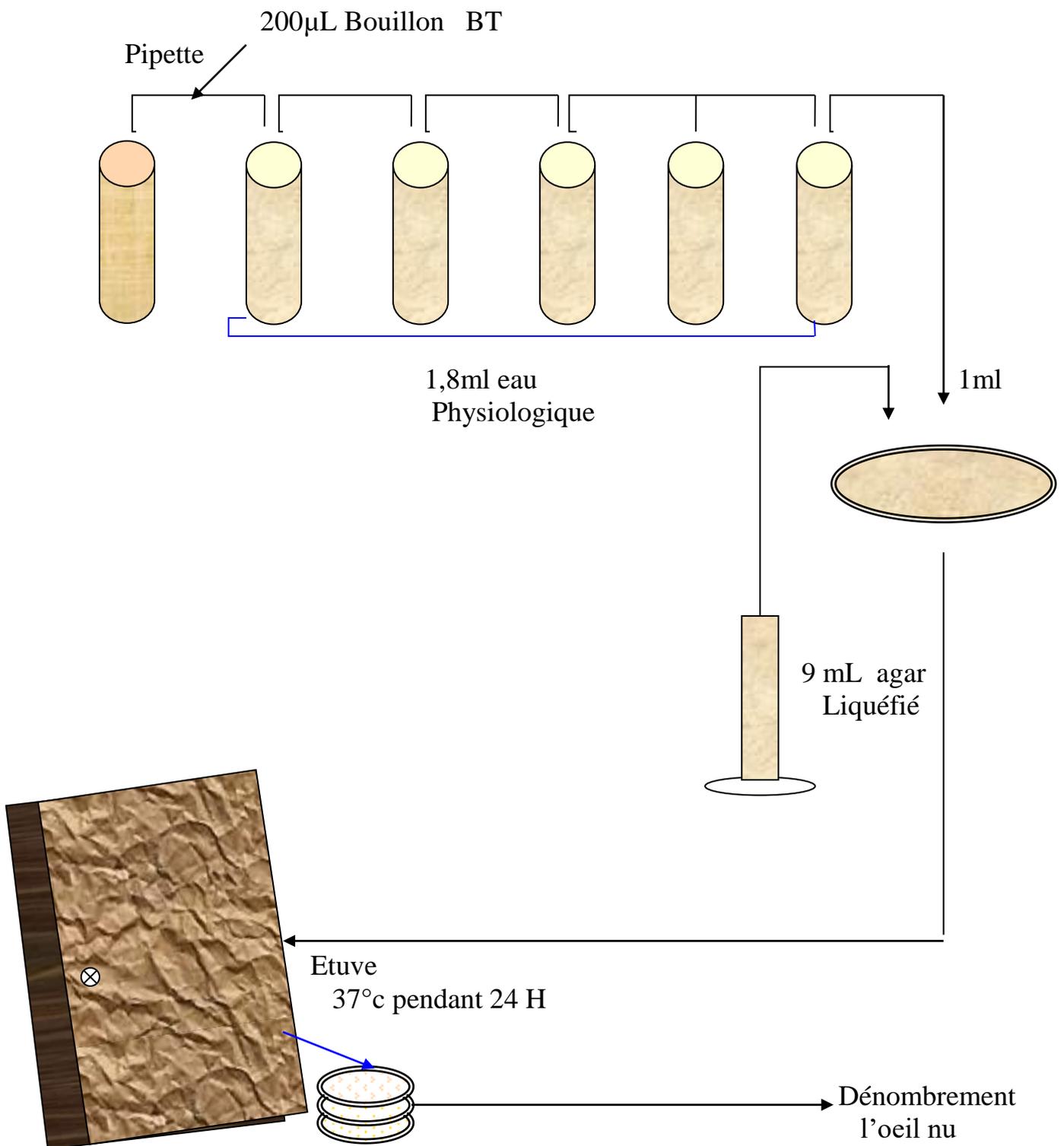
Homogénéiser et laisser refroidir les boites à la température du laboratoire, puis Incuber à l'étuve 37°C pendant 18 H au bout desquelles on procédera au dénombrement des colonies viables obtenues.

Après chaque dénombrement, établir un tableau des résultats en calculant à chaque fois la moyenne des colonies obtenues.

Tracer pour chaque espèce étudier les courbes :

$$\rightarrow N_m = f(t)$$

$$\rightarrow \text{Log } N_m = f(t)$$



**Figure 8 :** Dénombrement des colonies après dilution en série

### 3-2-2/ recherche de l'effet inoculum sur l'identification par les galeries micro-CSB

#### •PRINCIPE :

**Il s'agit d'une méthode miniaturisée permettant la mise en évidence d'activités enzymatiques, de la fermentation des sucres et de la croissance en milieu hostile.**

**Les galeries Micro-CSB BGN et bacilles à Gram négatif non fermentaires permettent de réaliser respectivement 16 tests biochimiques et de faire le diagnostic d'espèces de la plupart des entérobactéries et des bacilles à Gram négatif non fermentaires.**

#### •TECHNIQUE :

La technique consiste à ensemer des microplaques constituées de cupules renfermant des substrats destinés à la mise en évidence d'activités enzymatiques ou d'assimilation des substrats carbonés.

Après incubation, la lecture des réactions est effectuée à partir d'un tableau :

- soit directement (virage de l'indicateur coloré utilisé)
- soit après addition de réactifs de révélation conformément au protocole figurant dans le coffret.

#### •PREPARATION DE L'INOCULUM

Les colonies obtenues après 18 heures de culture sur milieu EMB sont mises dans 15 ml de bouillon BT. De ce bouillon nous prélevons 1,4 ml répartis à raison de 100 $\mu$  par micro cupule à l'exception de celles destinées à l'identification des sucres.

## •ENSEMENCEMENT ET INCUBATION

### ➤ POUR LES ENTEROBACTERIES

Distribuer 100 µl d'inoculum bactérien par micro cupule de ADH à ESC, puis le reste de l'inoculum est mélangé et homogénéisé avec 1 ml de MEVAG Entérobactéries. Cette dernière préparation est distribuée entre les cupules GLU et ARA à raison de 100 µl par cupules.

### ➤ LES BACILLES A GRAM NEGATIF NON FERMENTAIRES

Distribuer 100 µl d'inoculum bactérien par micro cupule de NIT à ONPG, puis le reste est mélangé et homogénéisé avec 1 ml de MEVAG Entérobactéries. Cette dernière préparation est répartie à raison de 100 µl par cupule en allant de GLU à XYL.

Recouvrir les puits destinés à la recherche des décarboxylases, d'uréase et des sucres avec 2 gouttes de paraffine afin de maintenir l'anaérobiose nécessaire à ces réactions.

Incuber les galeries à 37°C sur un plateau recouvert de papier buvard imbibé d'eau.

Lire les galeries après 24 H d'incubation.

La lecture repose sur le changement de la coloration initiale des différents milieux.

## •LECTURE ET INTERPRETATION

Cette lecture se fait soit directement, soit après l'addition de réactifs de révélation (voir tableaux **VII** et **VIII**).

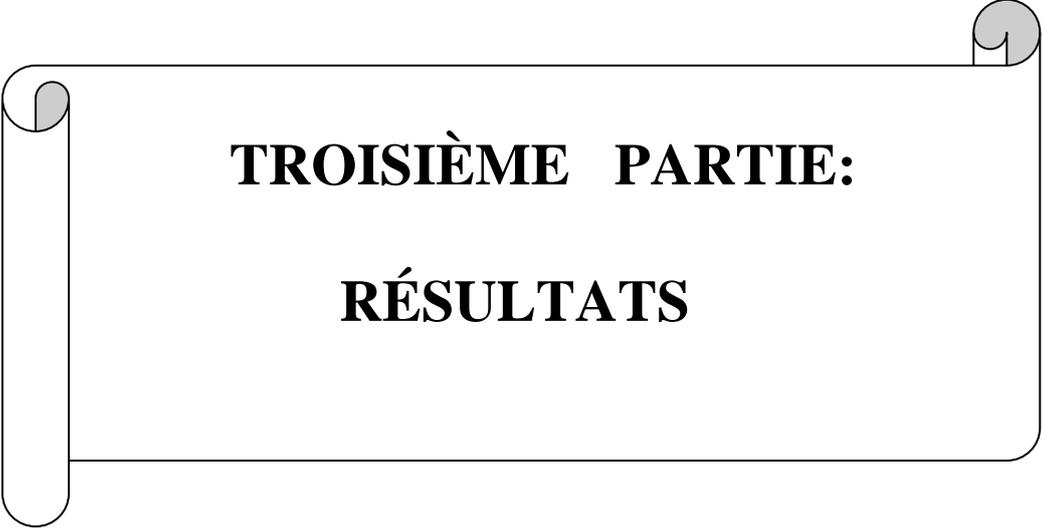
**TABLEAU VII : Tableau de lecture de l'entérobactérie [32]**

Tests	Substrats	Réactions/ Enzymes	Réactifs de révélation	Résultats positifs	Résultats négatifs
LDC	<b>Lysine</b>	Lysine décarboxylase		Rouge	Jaune
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase		Rouge	Jaune
ADH	Arginine	Arginine décarboxylase		Rouge	Jaune
URE	Urée	Uréase		Rose framboise	Orange
VP	Glucose Pyruvate	Production d'acétoïne	<b>VP1 + VP2</b>	Rose-rouge	Incolore
GEL	Gélatine	Gélatine		Diffusion du charbon	Inchangé
CS	Citrate de Sodium	Utilisation du citrate		Bleu	Vert
CC	Citrate de sodium	Utilisation du citrate		Rose	Jaune claire
H <sub>2</sub> S	Sulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S		Noir	Incolore
IND	Tryptophane	Tryptophanase	1 goutte de Kovacs	Anneau rouge	Anneau incolore
MAL	Malonate de sodium	Utilisation du malonate		Bleu	Jaune vert
PDA	Phénylalanine	Phénylalanine désaminase	1 goutte de perchlorure fer	Vert	Jaune
ONPG	ONPG	β-galactosidase		Jaune	Incolore
GLU ARA	Glucose Arabinose	Fermentation		Jaune	Bleu

**Tableau VIII : Tableau de lecture des bacilles à Gram négatif non fermentaire [33]**

Tests	Réactifs à ajouter	Interprétation	
		Positif	Négatif
NIT	1 goutte d'acide sulfanilique 1 goutte d' $\alpha$ -naphtylamine $\pm$ poudre de zinc	Rose	Incolore
UREE		Rouge violacé	Jaune
MAL		Bleu	Jaune vert
PDA	1 goutte de $\text{FeCl}_3$	Vert	Jaune
ADH		Violet	Jaune
CS		Bleu	Vert
CC		Rose	Jaune clair
ESC		Nuage Noir	Jaune
GEL		Diffusion du pigment	Pas de diffusion
H <sub>2</sub> S		Précipité noir	Incolore
IND	1 goutte de Kovacs	Anneau rouge	Anneau jaune
ONPG		Jaune	Incolore
GLU		Jaune	Bleu vert
LAC		Jaune	Bleu vert
SOR		Jaune	Bleu vert
MAN		Jaune	Bleu vert
XYL		Jaune	Bleu vert

Après la lecture des galeries, calculer le pourcentage de positivité des réactions et procéder à la détermination de l'inoculum qui permet d'obtenir la meilleure identification avec la galerie micro-CSB.



**TROISIÈME PARTIE:**

**RÉSULTATS**

# I / EXPLOITATION DES RESULTATS DU DENOMBREMENT ET DES GALERIES MICRO CSB

## 1-1 / Escherichia coli

### 1-1-1 / Résultats du dénombrement des colonies

L'étude de la croissance de *E.coli* par dénombrement sur boîte de pétri a donnée les résultats du tableau suivant :

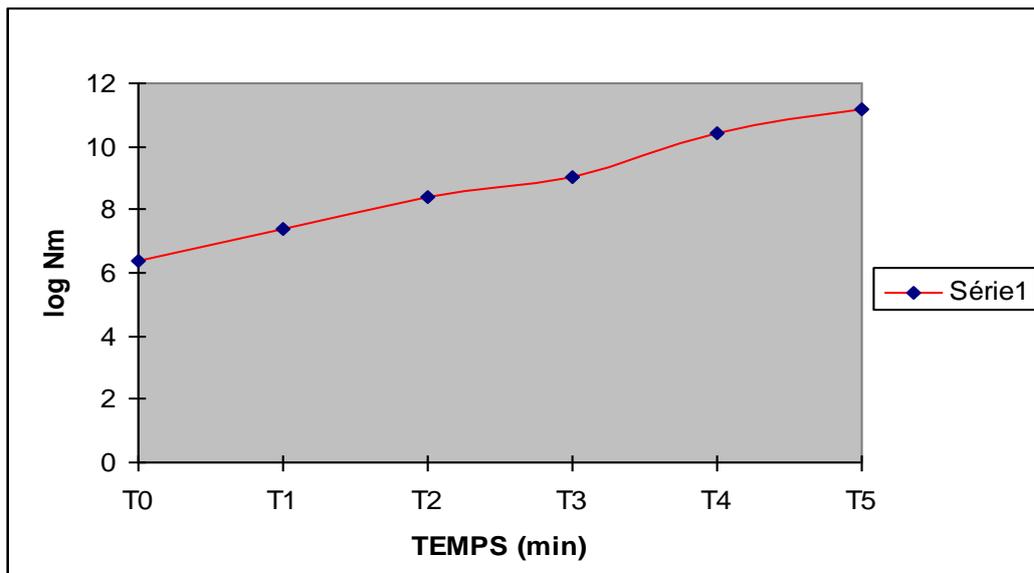
**TABLEAU XI : distribution du nombre de colonies de *Escherichia coli* et de son logarithme décimale au cours du temps**

<i>TEMPS (min)</i>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>80</b>	<b>100</b>
<b>N (UFC/ml)</b>	<b>237 .10<sup>4</sup></b>	<b>259 .10<sup>5</sup></b>	<b>241 .10<sup>6</sup></b>	<b>105 .10<sup>7</sup></b>	<b>251 .10<sup>8</sup></b>	<b>149 .10<sup>9</sup></b>
<b>Log N</b>	<b>6,374</b>	<b>7,413</b>	<b>8,382</b>	<b>9,021</b>	<b>10,400</b>	<b>11,173</b>

La croissance de *E.coli* étudiée sur une période de 100 min, a montré un accroissement de sa population de : **237 .10<sup>4</sup>** à **149 .10<sup>9</sup>** UFC/ml.

### 1-1-2 / Courbe de croissance

A partir de ce tableau, la représentation graphique de la fonction  $\log N = f(t)$  nous a donné la courbe ci-dessous.



**Figure 9 Evolution du logarithme décimal de *E.coli* au cours du temps.**

Cette courbe  $\log N = f(t)$  a montré un accroissement de la densité ; mais elle est apparue un peu étalée.

De cette courbe de croissance nous avons déduit le temps de latence noté lag.

L'intersection de la parallèle à l'axe des abscisses passant par  $\log N_0$  et la tangente au point d'inflexion de la courbe, donne par projection sur l'axe des abscisses un point dénommé lag [6].

Ainsi pour *E.coli* **Lag = 6 min.**

### 1-1-3 / Détermination des paramètres de la croissance ( $\mu$ et G)

Elle repose essentiellement sur la loi de reproduction des bactéries ou encore loi de la scissiparité.

$$N_t = 2^n N_0$$

$$\Rightarrow \frac{\log N_t - \log N_0}{\ln 2} = n$$

$$\Rightarrow n = \frac{11,173 - 6,374}{0,693} = 6$$

  
$$n = 6$$

et  $G = t / n$    $G = 100 / 6$

  $G = 16 \text{ min}$

Or  $\mu = n / t$    $\mu = 0,043$

Dans les conditions d'étude de la croissance définies, le temps de génération (G) de *E.coli* est de 16 min pour une vitesse de multiplication de 0,043.

#### 1-1-4 / Résultats de la galerie micro CSB BGN

##### Conditions d'interprétation [38]

L'identification d'une bactérie est régie par un certain nombre de critères qui permettent de catégoriser leur interprétation en cinq groupes selon le pourcentage de positivité des galeries testées.

Avec ce pourcentage nous avons :

-  *excellente identification: 99,9%*
-  *très bonne identification : 99%*
-  *bonne identification: 90%*
-  *identification acceptable : 80%*
-  *identification inacceptable < 80% .*

##### Tableau des résultats

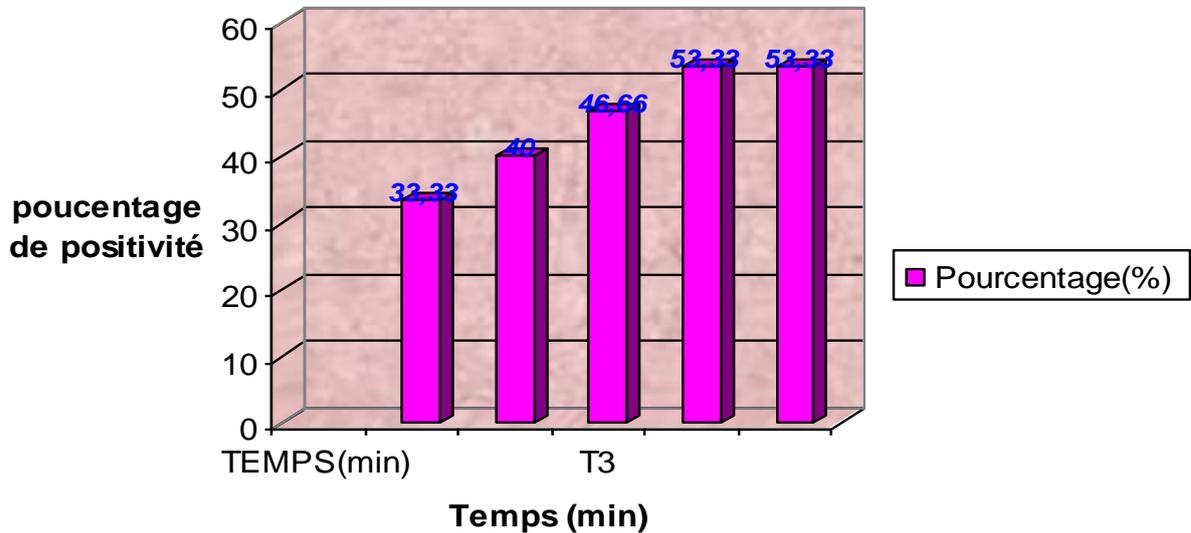
A  $T_0 = 0 \text{ min}$  nous avons eu un inoculum de faible densité ( $237 \cdot 10^4 \text{ UFC/ml}$ ). C'est la raison pour laquelle nous avons jugé nécessaire de démarrer l'étude de la galerie à partir de  $t_1 = 20 \text{ min}$  pour *E.coli*.

Les résultats de l'étude des caractères biochimiques qui ont été obtenus après 24 H d'incubation, figurent dans le tableau suivant:

**Tableau X: évolution du pourcentage de positivité des tests biochimiques au cours du temps et selon la taille de la population de *E.coli***

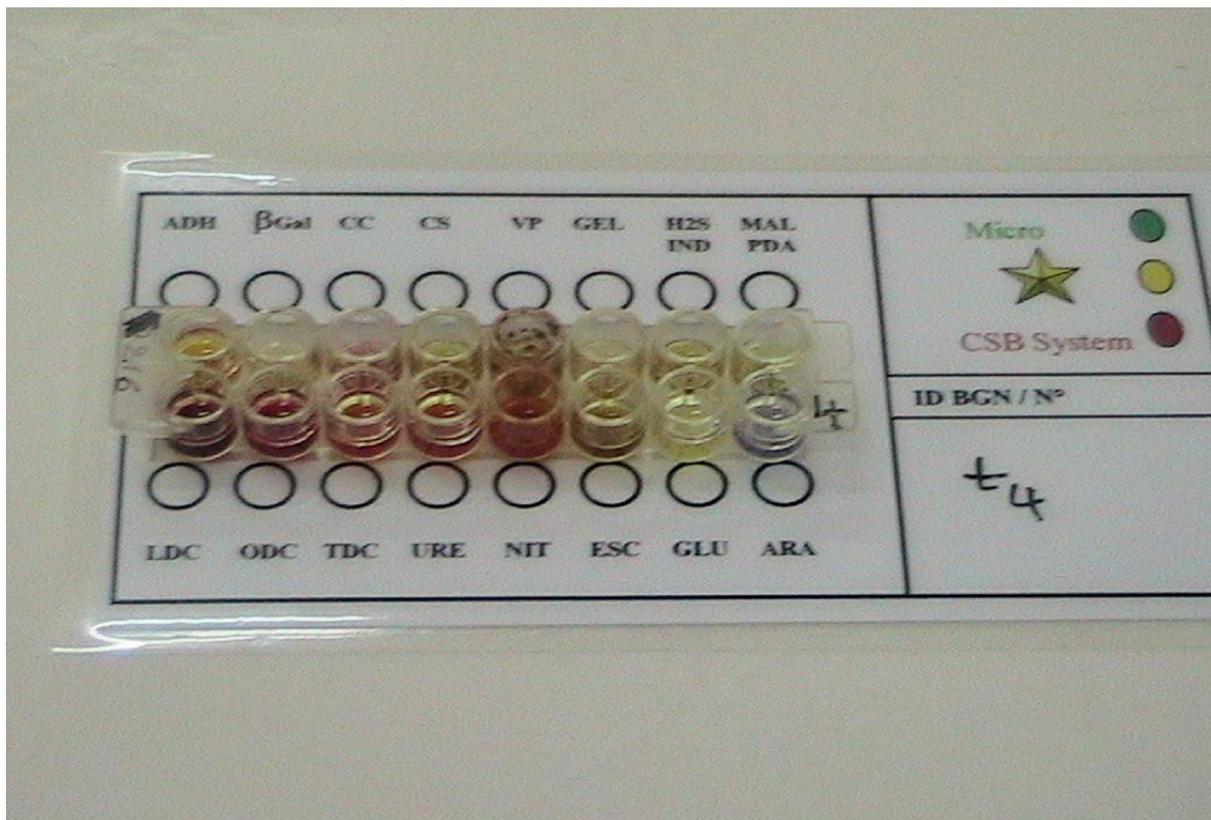
<b>TEMPS (min)</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>80</b>	<b>100</b>
<b><i>N</i> (UFC/ml)</b>	<b>259 .10<sup>5</sup></b>	<b>241 .10<sup>6</sup></b>	<b>105 .10<sup>7</sup></b>	<b>251 .10<sup>8</sup></b>	<b>149 .10<sup>9</sup></b>
<b>ADH</b>	-	-	-	-	-
<b><i>β Gal</i></b>	-	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>CC</b>	-	-	(+)	(+)	(+)
<b>CS</b>	-	-	-	-	-
<b>VP</b>	-	-	-	-	-
<b>Gel</b>	-	-	-	-	-
<b>IND/ H<sub>2</sub>S</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>MAL/PDA</b>	-	-	-	(+)	(+)
<b>LDC</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>ODC</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>URE</b>	-	-	-	-	-
<b>NIT</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>ESC</b>	-	-	-	-	-
<b>GLU</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>ARA</b>	-	-	-	-	-
<b>% (pourcentage)</b>	<b>33,33</b>	<b>40</b>	<b>46,66</b>	<b>53, 33</b>	<b>53,33</b>

Une représentation de ce pourcentage sous forme d'histogramme, a permis une meilleure exploitation de ces résultats (voir figure ci-dessous).



**Figure 10 :** distribution du pourcentage de positivité de la galerie micro CSB BGN de *E.coli* au cours du temps.

Ce diagramme montre une évolution progressive du pourcentage de T<sub>1</sub> à T<sub>4</sub>. Nous constatons cependant le même pourcentage maximal à T<sub>4</sub> et à T (**53,33**). Ce pourcentage bien qu'étant maximal, reste inférieur à 80 % . Ce qui rend inacceptable cette identification.



**Figure 11** : Vue de la galerie micro-CSB BGN obtenue avec un inoculum de *E.coli* à  $T_4 = 80$  min.

## 1-2/ *Klebsiella pneumoniae*

### 1-2-1/ Résultats du dénombrement

Après 24 H d'incubation des boîtes de culture de *K.pneumoniae* par incorporation sur gélose agar, nous avons obtenu les résultats suivants:

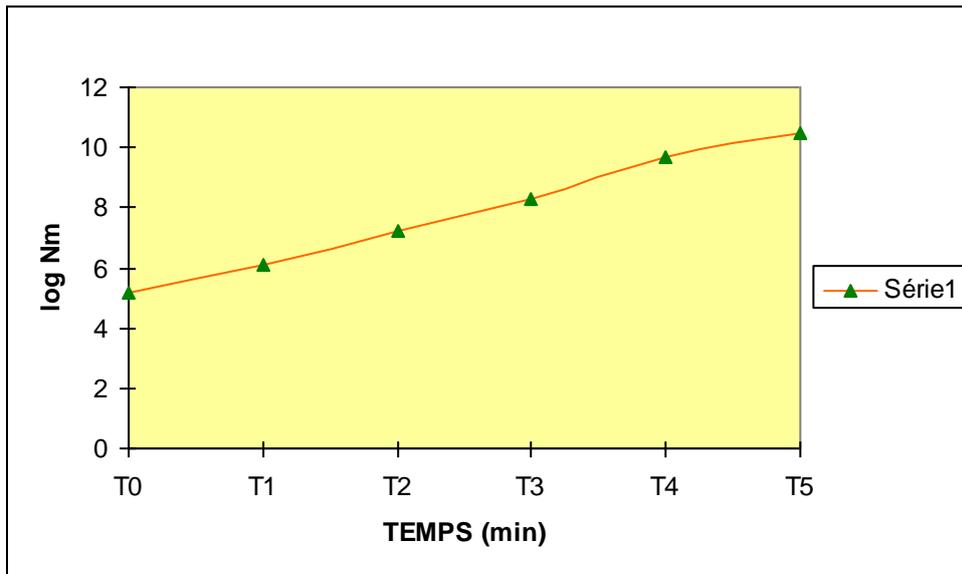
**Tableau XIII : Distribution du nombre de colonies (N) et de son logarithme (log N) en fonction du temps de *K.pneumoniae***

Temps	0	30	60	90	120	150
N (UFC/ml)	$15.10^4$	$12.10^5$	$16.10^6$	$20.10^7$	$51.10^8$	$30.10^9$
Log N	5,176	6,079	7,204	8,301	9,707	10,477

Ce tableau traduit une augmentation progressive de la population de *K.pneumoniae* sur une durée de 150 min avec une densité bactérienne maximale à T<sub>5</sub>.

### 1-2-2 / Courbe de croissance

Avec les résultats du dénombrement sur boîtes de pétri de *K.pneumoniae* nous avons tracé la courbe de croissance logarithmique ci-dessous:



**Figure 13** : Progression du logarithme de la densité de *K. pneumoniae* au cours du temps

A partir de cette courbe le temps de latence de *K. pneumoniae* a été déduit. Il a été obtenu par projection sur l'axe des abscisses du point d'intersection de la tangente à la phase exponentielle avec la parallèle à ce même axe passant par  $\log N_0$ .

Ainsi, **lag** de *K. pneumoniae* est égale à **10 min 50s**.

### 1-2-3 /Détermination des paramètres

La détermination du temps de génération (G) et du taux de croissance ( $\mu$ ) a été effectuée à partir du nombre de division (n) exprimé par la formule suivante :

$$n = \frac{\text{Log } N_t - \text{log } N_0}{\text{Ln}2}$$



$$n=7$$

Or  $G = t/n$   **G = 21 min**

Avec  $t = 150$  min

De plus,

$$\mu = \frac{\ln 2}{G} \quad \img alt="blue arrow" data-bbox="328 301 378 324"/> \quad \span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">**\mu = 0,033**$$

En résumé, le temps de génération de *K.pneumoniae* est égal à 21 min et le taux de croissance  $\mu$  quant à lui tourne autour de 0,033.

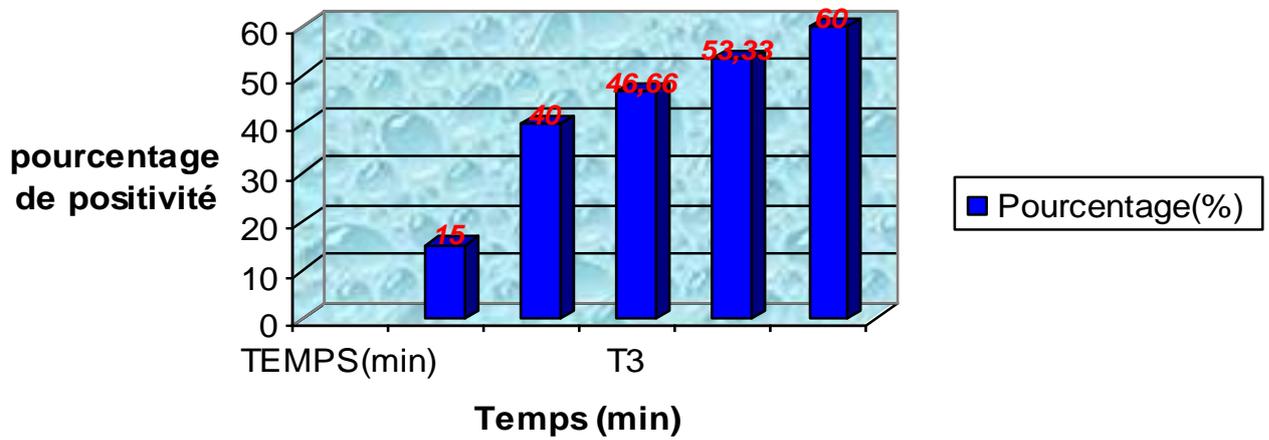
#### 1-2-4/ Résultats de la galerie micro CSB BGN

Ces résultats ont été enregistrés au bout de 24 H d'incubation de la galerie de *K.pneumoniae* et sont consignés dans le tableau ci-après.

**Tableau XIV** : Résultats des tests biochimiques de *K.pneumoniae* au cours du temps selon la taille de la population. (N)

Temps (min)	30	60	90	120	150
N (UFC/ml)	12 10 <sup>5</sup>	16 10 <sup>6</sup>	20.10 <sup>7</sup>	51.10 <sup>8</sup>	30.10 <sup>9</sup>
ADH	—	—	—	—	—
B Gal	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CC	(+)	(+)	—	(+)	(+)
CS	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Gel	—	—	—	—	—
H2S/IND	—	(+)	(+)	(+)	(+)
MAL/PDA	—	—	(+)	(+)	(+)
LCD	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
OCD	—	—	—	—	—
URE	—	—	—	(+)	(+)
NIT	—	—	—	—	—
ESC	—	—	—	—	—
GLU	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
ARA	—	—	—	—	—
VP	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
%	40	46,666	53,333	60	60

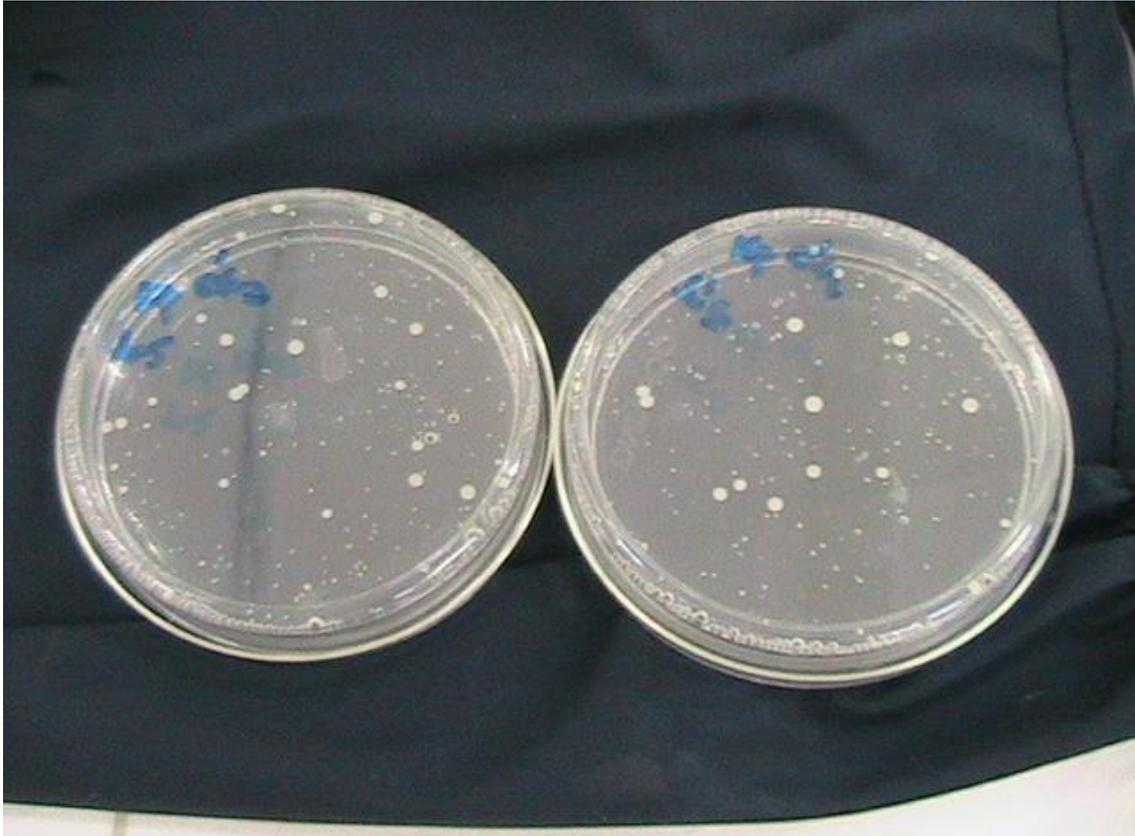
Une représentation simplifiée de cette galerie micro CSB BGN en fonction de la densité et du pourcentage de positivité a donné l'histogramme suivant :



**Figure 14** : Répartition du pourcentage de positivité de la galerie micro-CSB BGN de *K.pneumoniae* au cours du temps.

Sur ce graphique, nous constatons un saut de pourcentage entre T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub>.

Puis, il évolue progressivement pour atteindre un maximum à T<sub>5</sub> (60 %) ; toujours inférieur à 80 % (seuil d'acceptabilité d'une identification).



**Figure 15** : Aperçu des colonies de *K. pneumoniae* au bout de 150 min (T5) d'étude de la croissance et après incubation de 24 H.

### **1-3/ *Pseudomonas aeruginosa***

#### **1-3-1 / Résultats du dénombrement des colonies de *P.aeruginosa***

L'étude de la croissance de *P.aeruginosa* mesurée par dénombrement sur boîtes de pétri a fourni les résultats du tableau suivant :

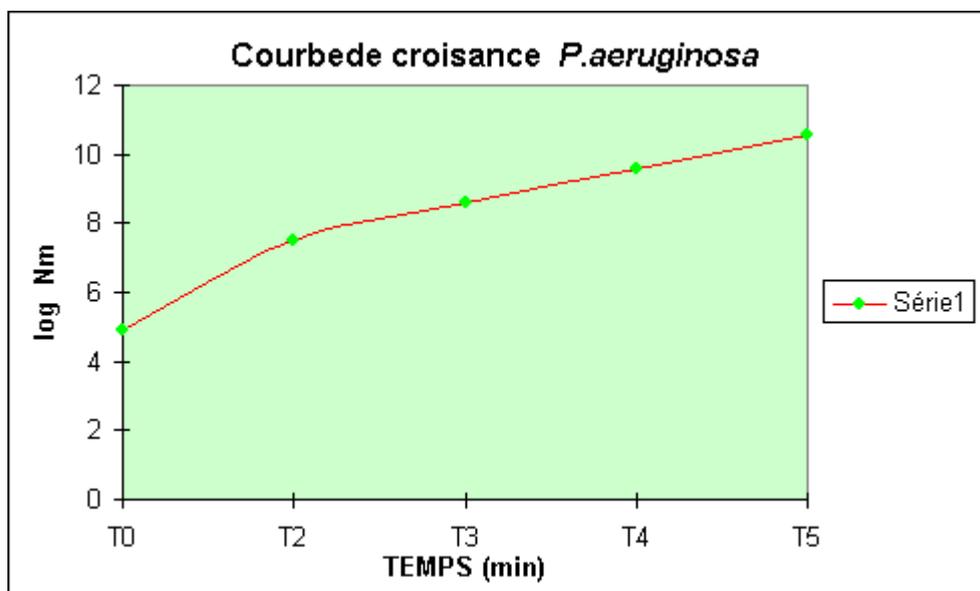
***Tableau XVII : Expression de la population de P.aeruginosa et de son logarithmique en fonction du temps***

<b>Temps (min)</b>	0	30	60	90	120	150
<b>N (UFC/ml)</b>	$8.10^4$	$10.10^5$	$31.10^6$	$38.10^7$	$38.10^8$	$37.10^9$
<b>Log N</b>	4,903	6	7,491	8,579	9,579	10,568

Ce tableau indique un accroissement de la population de P.aeruginosa de  $8.10^4$  à  $37.10^9$  UFC/ml sur une période de 150 min.

1-3-2/ La courbe de croissance

Les données fournies par l'exploitation des résultats du dénombrement nous ont permis de tracer la courbe  $\log N = F(t)$ . qui est la suivante.



**Figure 17 :** Evolution du logarithme décimal de P.aeruginosa au cours du temps

De cette courbe de croissance a été déduite la valeur du temps de latence qui est :

$$\text{Lag} = 11\text{min}25$$

### 1-3-3/ Les paramètres d'étude de la croissance

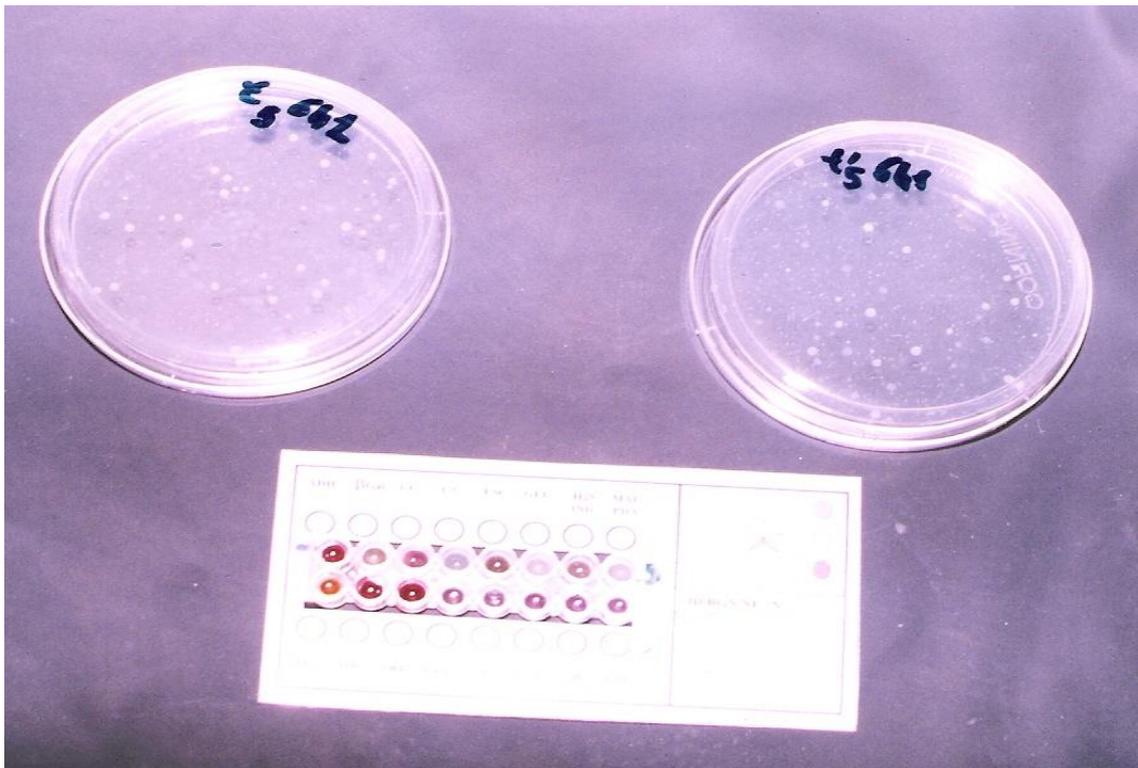
Ces paramètres ont été déterminés de la même manière que pour *K.pneumoniae* et les résultats qui ont été obtenus sont les suivants :

$$G = 19 \text{ min}$$

et

$$\mu = 0,036$$

Le temps de génération de *Klebsiella pneumoniae* est  $G = 19 \text{ min}$  ; avec un taux de croissance de 0,036.



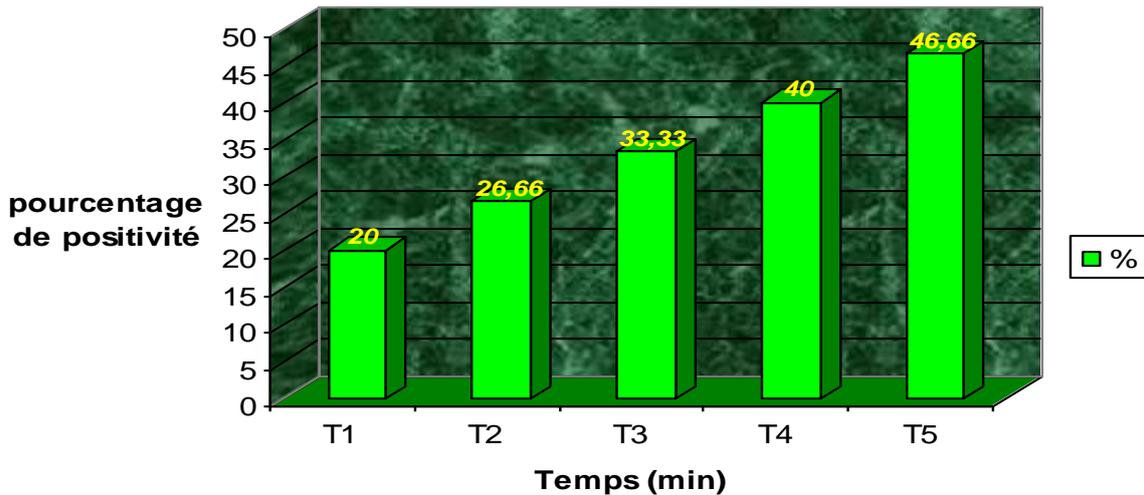
**Figure 18 :** Aperçu des boîtes de culture de *P.aeruginosa* dénombrées à  $T_5 = 150$  min et résultat de la galerie micro CSB BGNNF.

### **1-3-4/ Résultats de la galerie micro-CSB BGNNE**

***Tableau XVIII : Etude des caractères biochimiques de P. aeruginosa N°1 en fonction du temps, du nombre de colonies et estimation du pourcentage de positivité de la galerie.***

Temps (min)	30	60	90	120	150
N (UFC/ml)	10.10 <sup>5</sup>	31.10 <sup>6</sup>	38.10 <sup>7</sup>	38.10 <sup>8</sup>	37.10 <sup>9</sup>
ADH	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
B Gal	-	-	-	-	-
CC	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
ESC-	-	-	-	-	-
Gel	-	(+)	-	(+)	(+)
H2S/IND	-/-	-/-	-/(+)	-/(+)	-/(+)
MAL/PDA	-	-	-	-	(+)
NIT	-	-	(+)	(+)	(+)
URE	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Glu	-	-	-	-	-
Lac	-	-	-	-	-
Man	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-
XYL	-	-	-	-	-
<b>%</b>	<b>20</b>	<b>26,66</b>	<b>33 ,33</b>	<b>40</b>	<b>46,66</b>

Ce tableau a été résumé sous forme d'histogramme (voir figure ci-après) :



**Figure 20** : Répartition du pourcentage de positivité de positivité de la galerie micro CSB BGNNF de *P.aeruginosa* au cours du temps.

Le pourcentage de positivité augmente progressivement au cours du temps pour atteindre un maximum de **46,66 % à T<sub>5</sub> = 150 min.**

Nous sommes toujours dans une identification inacceptable.

#### **1-4/ Acinélobacter. sp**

##### **1-4-1 / Le dénombrement des colonies**

Les résultats qui ont été obtenus sont regroupés par le tableau suivant

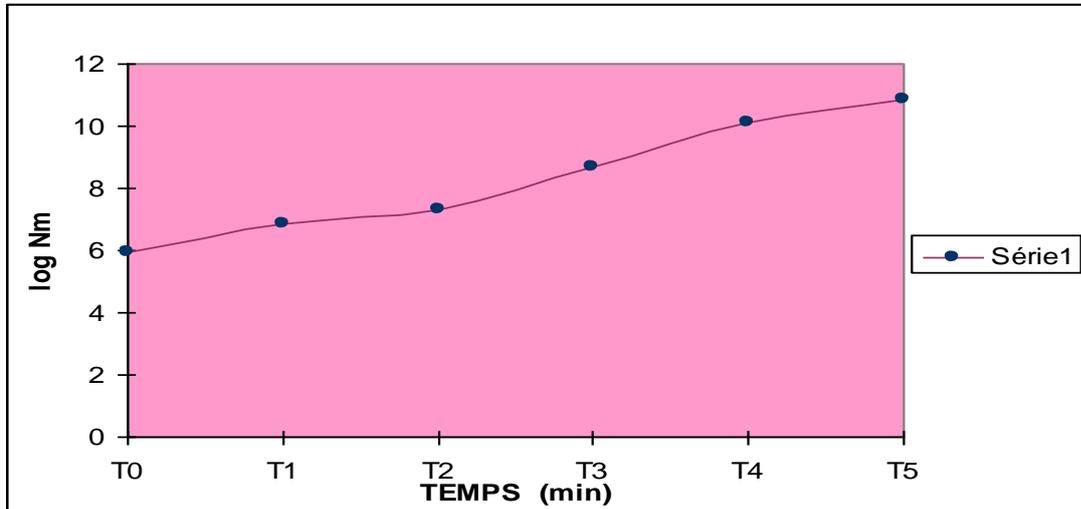
**Tableau XXI** : Répartition du nombre de colonies de *Acinélobacter.sp* et de leur logarithme au cours du temps

Temps (min)	0	30	60	90	120	150
N (UFC/ml)	$91.10^4$	$67.10^5$	$20.10^6$	$49.10^7$	$123.10^8$	$75.10^9$
Log N	5,959	6,826	7,301	8,690	10,089	10,875

La densité maximale ( $75.10^9$  UFC/ml) a été obtenue au bout de à T<sub>5</sub> = 150 min ce qui équivaut 10,875 à l'échelle logarithmique base 10.

### 1-4-2 / Courbe de croissance

Avec la représentation graphique de la fonction  $\log N = f(t)$  nous avons pu retrouver le temps de latence de *P.aeruginosa* qui est  $Lag = 12 \text{ min}$



**Figure 21** : Représentation logarithmique de la courbe de croissance de *Acinetobacter.sp*

### 1-4-3/ Détermination des paramètres

Comme pour les espèces précédentes, la détermination de G ou temps de génération de même que celle du taux de croissance  $\mu$  passe par le calcul du nombre de divisions cellulaires ou encore de générations (n).

Les résultats qui ont été obtenus sont :

$$n = 7$$

$$G = 21\text{min}$$

$$\mu = 0,033$$

### 1-4-4/ Résultats de la galerie micro CSB – BGNNF

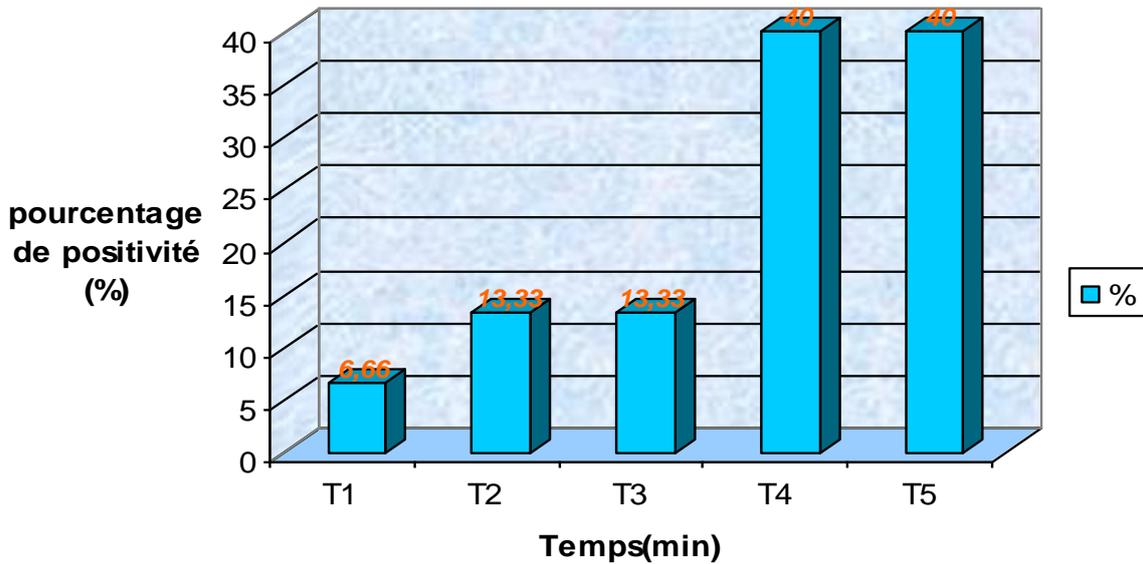
Après 24 heures d'incubation de la galerie micro-CSB BGNNF avec les prélèvements qui ont été obtenus aux différents points d'étude de la croissance,

*Acinetobacter.sp* a donné le tableau suivant :

**Tableau XXII** : Répartition du pourcentage de positivité de la galerie micro-CSB. BGNNF de *Acinetobacter.sp* au cours du temps en fonction de la taille de la population

Temps (min)	30	60	90	120	150
N (UFC/ml)	5.10 <sup>5</sup>	32.10 <sup>6</sup>	29.10 <sup>7</sup>	34.10 <sup>8</sup>	39.10 <sup>9</sup>
ADH	-	-	-	-	-
B Gal	-	-	-	-	-
CC	-	-	(+)	(+)	(+)
CS	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
ESC	-	-	-	-	-
Gel	-	-	(+)	(+)	(+)
H <sub>2</sub> S/IND	-	-	-	-	-
MAL/PDA	-/-	-/-	(+)/-	(+)/-	(+)/-
NIT	-	(+)	(+)	(+)	(+)
URE	-	-	(-)	(+)	(+)
GLU	-	-	-	-	-
LAC	-	-	-	-	-
MAN	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-
XYL	-	-	-	-	-
%	6,66	13,33	33,33	40	40

Pour mieux apprécier ces résultats du métabolisme biochimique, nous allons traduire ce tableau *XXII* en histogrammes (voir figure ci –après)



**Figure 22 :** Répartition du pourcentage de positivité de la galerie micro CSB BGNNF de *Acinetobacter.sp* au cours du temps en fonction de la taille de l'inoculum.

Sur ce graphique, nous constatons une évolution du pourcentage en paliers T<sub>2</sub>-T<sub>3</sub> d'une part (13,33%) et T<sub>4</sub>-T<sub>5</sub> (40%) d'autre part.

Cependant, même au temps maximum de notre étude nous sommes toujours dans une phase d'identification inacceptable.

## **II / Ajustement des résultats du dénombrement et prédiction du temps de seuil**

La méthode d'inférence de Bayes a été utilisée pour ajuster les résultats de la croissance notamment la densité bactérienne N. Ceci, dans le but d'avoir des valeurs plus proches de la réalité et la formule qui a été employée est la suivante :

$$\begin{cases} t < \text{lag}, N(t) = N_0 \\ t \geq \text{lag}, N(t) = N_0 + \frac{\mu (t - \text{lag})}{\ln 10} \end{cases}$$

Avec  $N_0$  la densité de l'inoculum de départ c'est-à-dire à  $T = 0$  min.

$N_t$  = densité bactérienne à l'instant  $t$ .

$\mu$  = taux de croissance

$t$  = temps

lag = temps de latence

La détermination du temps de seuil critique a été réalisée selon la méthode de l'inférence de Bayes à l'aide de l'équation ci-dessous :

$$T_s = \frac{\text{Exp}(K) + (N_s - N_0) \ln 10}{\mu}$$

Avec  $K = \ln(\mu \times \text{lag})$

## 2-1/ Escherichia Coli

### 2-1-1 / Ajustement de la taille de l'inoculum(N)

L'ajustement des paramètres de la croissance a été réalisé sur les premiers points de la cinétique de la courbe de croissance et ceci à partir des données suivantes :

Lag = 6 min

$N_0 = 237\,104$  UFC / ml

$\mu = 0,043$

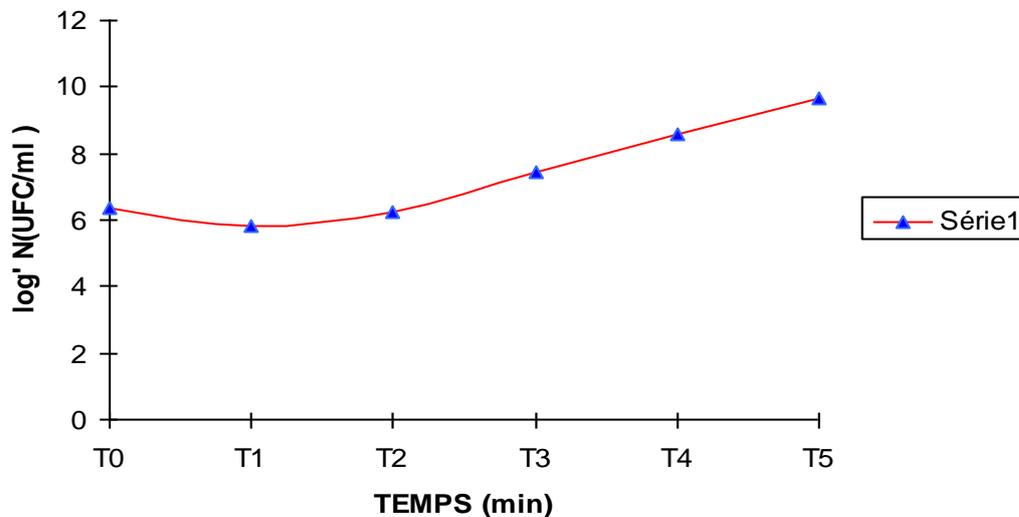
Les résultats de l'ajustement figurent dans le tableau ci-après :

**Tableau XXIII: Répartition du logarithme ( $\log N'$ ) de *E. Coli* en fonction du temps.**

Temps (min)	0	20	40	60	80	100
$N'(t)$	$237.10^4$	$63.10^3$	$63.10^5$	$10.10^6$	$13.10^7$	$17.10^8$
Log $N'$	6,374	4,794	6,799	7	8,113	9,230

Ainsi, à  $T_5 = 100$  min la population de *E.coli* devient  $17.10^8$  UFC/ml et son logarithme à base 10 passe de 9,230 à **11,173**.

La représentation graphique de la fonction  $\log N' = f(t)$  a donné la courbe ci-dessous



**Figure 23 :** Représentation logarithmique de la densité ajustée de *E.coli* en fonction du temps.

Après un délai de latence lag' de 10 min, ce germe entre dans une phase de multiplication ( $T_1-T_2$ ).

Durant la phase exponentielle de croissance, cette courbe a une allure presque

linéaire.

Si, nous reconsidérons les résultats de l'ajustement ; les paramètres d'étude de la croissance de *E.coli* deviennent respectivement  $G' = 25 \text{ min}$  et  $\mu' = 0,027$ .

### **2-1-2 / détermination du temps de seuil**

Elle est effectuée à partir de l'équation suivante :

$$T_s = \frac{\text{Exp}(K) + (N_s - N_0) \text{Ln } 10}{\mu}$$

Où K est une constante dénommée densité à priori informative car étant établie à partir des données expérimentales fournies par la courbe de croissance selon la relation suivante

$$K = \ln(\mu \times \text{lag})$$

Pour *E.coli*, ces données sont :

$$\mu = 0,027$$

$$\text{Lag} = 10 \text{ min}$$

$$N_0 = 237 \cdot 10^4 \text{ UFC/ml}$$

$$N_s = 149 \cdot 10^9 \text{ UFC/ml}$$

Ainsi, le temps de seuil critique est  $T_s = 2 \text{ H } 30 \text{ min}$ .

### **2-2/ Klebsiella pneumoniae**

#### **2-2-1/ ajustement de la taille de l'inoculum**

$$\text{lag} = 10 \text{ min } 5 \text{ s}$$

$$N_0 = 15 \cdot 10^4 \text{ UFC/ml}$$

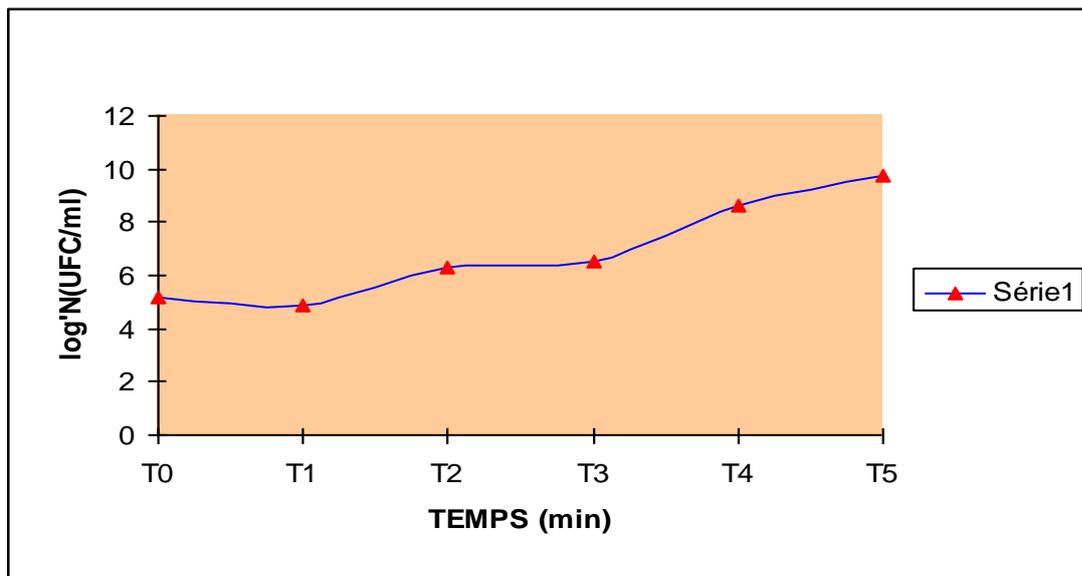
$$\mu = 0,033$$

Avec les données initiales de l'expérimentation, l'ajustement de la croissance de *K.pneumoniae* par la même méthode que pour *E.coli* a fourni les résultats consignés dans le tableau ci-après.

**Tableau XXIV : Ajustement du nombre de colonies de *K. pneumoniae* au cours du temps.**

Temps (min)	0	30	60	90	120	150
N' (UFC/ml)	1510 <sup>4</sup>	4310 <sup>3</sup>	7010 <sup>4</sup>	1110 <sup>6</sup>	1510 <sup>7</sup>	1910 <sup>8</sup>
Log N'	5,176	4,633	5,845	7,041	8,176	9,278

Avec ces résultats de la densité ajustée de *K.pneumoniae*, nous avons tracé la courbe de croissance ci-dessous :



**Figure 24** : Représentation graphique du logarithme décimal de la densité ajustée de *K.pneumoniae* en fonction du temps.

Dans ces conditions, les paramètres d'étude de la croissance deviennent :

- **G' = 30 min**
- **$\mu'$  = 0,023**
- **lag' = 15 min**

Par ailleurs, nous avons noté sur cette courbe ajustée de *K.pneumoniae* ;

l'existence de deux phases de latence respectivement entre  $T_1 - T_2$  et  $T_3 - T_4$ .  
Cela pourrait être dû à un phénomène d'adaptation de ce germe dans le milieu de culture à l'occurrence le bouillon BT.

### 2-2-2 / prédiction du temps de seuil

Il a été réalisé à partir des données expérimentales de la courbe de croissance de *K.pneumoniae* (fig.13) avec la même formule que pour *E.coli*.

$$\mu = 0,023$$

$$\text{Lag} = 15 \text{ min}$$

$$N_0 = 15.10^4$$

$$N_s = 30.10^9$$

Ce temps de seuil est  $T_s = 3 \text{ H}$

### 2-3 / *Pseudomonas aeruginosa*

#### 2-3-1 / ajustement de la taille de la population

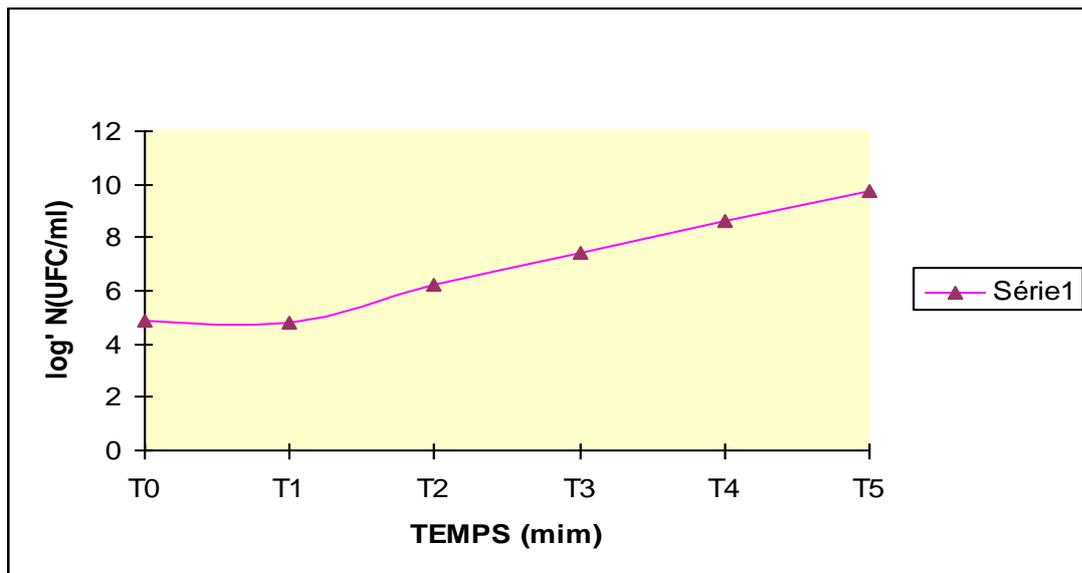
$$\mu = 0,036, \quad \text{lag} = 11 \text{ min } 25, \quad N_0 = 8.10^4 \text{ UFC/ml}$$

L'ajustement qui a été effectué sur les premiers points de la croissance de ce germe, a abouti aux résultats du tableau suivant :

**Tableau** : Valeurs ajustées du nombre de colonies et de son logarithme au cours du temps *P. aeruginosa*

Temps (min)	0	30	60	90	120	150
N' (UFC/ml)	$810^4$	$2910^3$	$7610^4$	$1210^6$	$1710^7$	$2110^8$
Log N'	4,903	4,462	5,880	7,079	8,230	9,322

La représentation graphique de la fonction  $\log N' = f(t)$  est la courbe ci-après.



**Figure 25** : Evolution du logarithme décimal de la densité ajustée de *P.aeruginosa* au cours du temps

Avec l'ajustement par l'inférence de Bayes les paramètres d'étude de la croissance deviennent :

- **$G' = 25$  min**
- **$\mu' = 0,027$**
- **$lag' = 16$  min**

### 2-3-2 / prédiction du temps de seuil

La formule VIII de la méthode d'ajustement par l'inférence de Bayes utilise les résultats expérimentaux de la courbe de croissance de *P.aeruginosa* (fig.17) avec les données suivantes :

$$\mu = 0,027$$

$$Lag = 16 \text{ min}$$

$$N_0 = 810^4$$

$$N_s = 3710^9$$

Le temps de seuil critique de *P.aeruginosa* qui a été obtenu est :  $T_s = 3$  H

## 2.4. *Acinetobacter.sp*

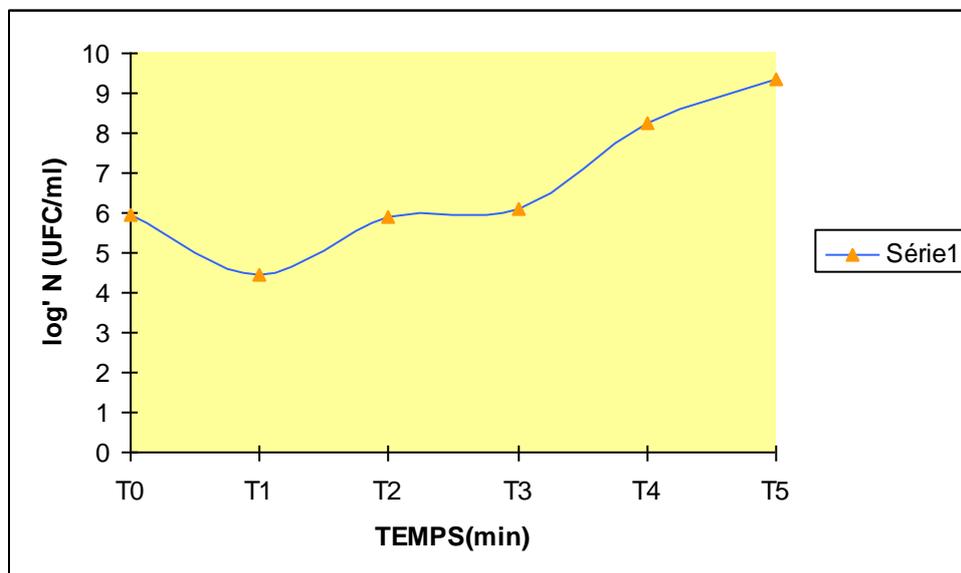
### 2-4-1 / Ajustement de la densité de l'inoculum

$$\mu = 0,033 \quad \text{Lag} = 12 \quad \text{No} = 91.10^4$$

Avec ces données les résultats qui ont été obtenus de l'ajustement par la méthode de Bayes, figurent dans le tableau suivant :

**Tableau :** Valeurs ajustées de la densité de *Acinetobacter.sp* au cours du temps.

Temps (min)	0	30	60	90	120	150
N' (UFC/ml)	$91.10^4$	$25.10^3$	$68.10^4$	$11.10^6$	$15.10^7$	$19.10^8$
Log N'	5,959	4,397	5,832	7,041	8,176	9,278



**Figure 26 :** Courbe ajustée de la densité de *Acinetobacter.sp*

Avec l'ajustement par la méthode de l'inférence de Bayes les paramètres d'étude de la croissance deviennent :

- $G' = 38 \text{ min}$
- $\mu' = 0,018$
- $\text{lag}' = 18 \text{ min}$

**Remarque :**

L'exploitation des courbes qui ont été obtenues après ajustement de la croissance selon la méthode de l'inférence de Bayes, montre qu'en réalité, nous avons eu une diminution du nombre de bactérie durant la phase d'adaptation ou phase de latence.

***2-4-2 / Prédiction du temps de Seuil par l'inférence bayésienne***

Cette prédiction utilise les données expérimentales suivantes :

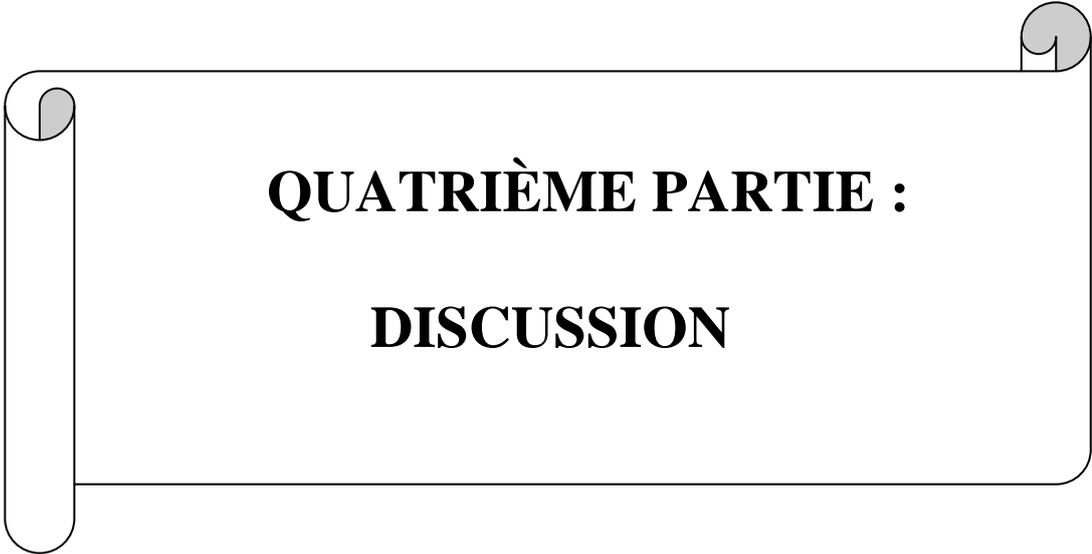
$$\mu = 0,018$$

$$\text{Lag} = 18 \text{ min}$$

$$N_0 = 9110^4$$

$$N_s = 7510^9$$

Ces données qui ont été appliquées à la formule VIII ont donné pour *Acinetobacter.sp*, temps de seuil  $T_s = 9 \text{ H}$ .



**QUATRIÈME PARTIE :**  
**DISCUSSION**

## **I/ Les souches**

La recherche de l'effet inoculum sur les galeries micro-C.S.B par l'étude de la croissance bactérienne a été effectuée sur des souches pré identifiées et conservées à -20 ou -80°C.

Mais, animé par le souci d'obtenir des résultats fiables, une identification sommaire a été faite sur trois milieux de culture à savoir :

- Milieu MM (Mannitol– mobilité)
- Milieu Kligler Hajna
- Milieu Citrate de Simmons.

L'intérêt de ce mini galerie est de confirmer que les colonies dénombrées sont bien du germe étudié. En effet, la pureté de la souche est élément indispensable pour une bonne étude de la croissance [25].

## **II/ L'Etude de la croissance par la méthode du dénombrement**

Le dénombrement des colonies d'une bactérie donnée sur boîte de pétri, est une méthode de mesure de la croissance bactérienne dont la mise en œuvre est très simple.

Plusieurs techniques d'ensemencement peuvent être utilisées telles que ;

- l'ensemencement en profondeur
- l'ensemencement en surface
- par stries
- par inondation
- par incorporation [26].

Cette dernière méthode a été retenue dans nos travaux.

Le dénombrement par technique d'incorporation d'une suspension bactérienne sur gélose agar fournit des résultats très fiables.

D'ailleurs, il a été utilisé dans de nombreux travaux d'étude de la croissance bactérienne [3, 6, 12, 30].

Cependant, cette technique est très fastidieuse et les sources d'erreurs peuvent provenir de :

-la température de l'agar qui lorsqu'elle est très élevée tue les bactéries en culture.

Mais, cette température même si au début des manipulations posait problème, a pu être maîtrisée par la suite.

-la confluence des colonies qui influe sur le dénombrement.

C'est justement, pour palier à ces difficultés que des séries de dilution très élevées ont été effectuées.

De plus, à chaque point de prélèvement (T<sub>0</sub>, .....T<sub>5</sub>) deux boîtes de culture ont été ensemencées pour la même dilution conformément au protocole décrit dans la deuxième partie.

Avec nos travaux, l'exploitation de la courbe de croissance logarithme a donné un temps de latence de **lag =6 min** ; ce temps est très court et à peine visible sur la courbe (fig.9).

Des études antérieures menées par des chercheurs français ont donné des résultats similaires [49].

Pour les bacilles à gram négatif non fermentaires, plus précisément *P.aeruginosa*, ce temps de latence tourne autour de 12 min.

Pourtant, c'est le même bouillon BT qui a servi de milieu d'étude pour ces deux germes. Cela laisse supposer que ce bouillon BT est plus favorable au développement des entérobactéries en l'occurrence *E.coli* qu'à celui des non fermentaires.

Des études réalisées par des chercheurs de l'université de Lyon 1 ont montré que pour la croissance des bacilles à gram négatif non fermentaires, le bouillon BTS (Trypto-caséine Soja) reste le milieu de prédilection [ ].

### **III/ Méthode d'ajustement des paramètres de la croissance**

Le choix de modéliser les résultats de l'étude de la croissance bactérienne par la méthode de l'inférence de Bayes est guidé par le fait que ce dernier prend en compte la phase de latence et la fonction de freinage [30] ; contrairement au modèle primaire qui se limite à une étude de la phase exponentielle sans temps de latence [12].

L'intérêt de cette modélisation est d'ajuster les paramètres de croissance bactérienne ( $G, \mu$ ) afin de rendre ces résultats expérimentaux beaucoup plus proche de la réalité.

L'utilisation de cette méthode nous a permis de ramener le temps de génération de *E.coli* de 16 à 20 min.

Ces résultats ont été retrouvés par d'autres chercheurs dans des travaux similaires où ils sont parvenus à  $G= 20$  min pour ce même germe [44].

En effet, la plupart des entérobactéries ont un temps de génération compris entre 20 et 30 min [42].

Par contre, pour *Pseudomonas aeruginosa*, ce temps de génération passe de 21 à 25 min.

De pareils résultats ont été trouvés dans des études de la croissance de cette bactérie [24, 7, 1].

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires, le plus souvent ont un temps de génération qui varie entre 30 et 40 min [17].

Le temps de génération ou de division d'une bactérie donnée est intimement lié aux conditions d'étude prédéfinies [44].

De plus, le temps de latence de *E.coli* sur la courbe ajustée (fig.23) est de 10 min à la place des 6 min de l'expérimentation.

Ce temps de latence dépend entièrement des conditions d'étude de la croissance et par conséquent, il varie d'une expérience à une autre.

Ainsi, pour *K.pneumoniae* nous avons obtenu un temps de latence  $lag' = 15\text{min}$  au lieu de 10 min 50s (fig.24).

*P.aeruginosa* le temps de latence qui a été obtenu après ajustement est :  $lag' = 16\text{min}$  (fig.25).

*Acinetobacter.sp* a donné quant à lui un temps de latence dénommé  $lag' = 18\text{min}$  à temps de seuil (fig.26).

Ces résultats confirment le choix de démarrer notre recherche de l'effet « inoculum » sur les galeries micro CSB à partir de  $T_1 = 20\text{min}$  pour *E.coli* et 30 min pour les autres espèces qui sont :

- *K. pneumoniae*
- *P .aeruginosa*
- *Acinetobacter*

#### **IV / « Effet inoculum » sur l'identification des bacilles à gram négatif avec les galeries micro-CSB**

Deux types de galeries micro-CSB ont servi pour cette étude de l'effet inoculum.

Ce sont :

- Micro-CSB BGN pour l'identification des entérobactéries en particulier *Escherichia Coli* et *Klebsiella pneumoniae*.
- Micro-CSB BGNNF pour les bacilles à gram négatif non fermentaires à savoir *P.aeruginosa* et *Acinetobacter .sp*.

Ces études ont abouti à un pourcentage de positivité de 53,33% à  $T_5 = 100\text{min}$  pour *E.coli* avec un inoculum de  $149.10^9\text{ UFC/ml}$ .

Cependant, ce pourcentage est inférieur à 80% seuil d'acceptabilité d'une identification [41]. Donc nous n'avons pas eu une identification de ce germe avec la galerie micro-CSB BGN à partir de cet inoculum à  $T_5$ .

Il en est de même pour *K. pneumoniae* qui a donné un pourcentage de positivité de 60% à  $T_5 = 150\text{min}$  avec un inoculum de  $30\ 10^9\text{ UFC/ml}$ .

Par contre, pour *P.aeruginosa* ce pourcentage n'a pas atteint les 80% du seuil d'acceptabilité d'une identification car étant égal 46,66%.

Pourtant, ce pourcentage est obtenu au bout de 150 min d'inoculum du bouillon BT ce qui correspond à une densité bactérienne de  $37 \cdot 10^9$  UFC/ml avec la galerie micro-CSB BGNNF.

Avec ces mêmes conditions d'étude, *Acinetobacter.sp* donne un résultat de 40% qui est beaucoup plus faible que celui de *P.aeruginosa*.

Dans tous les cas, avec ces résultats nous n'avons pu identifier convenablement les bacilles à Gram négatif avec ces galeries micro-CSB.

Qu'est ce qui peut être à l'origine de cette " mauvaise " identification ?

Est-ce la faiblesse de l'inoculum ? Ou la durée d'étude de la croissance bactérienne ?

Pour trouver des réponses à ces questions, nous avons déterminé le temps de seuil ( $T_5$ ) de chacune de ces 4 espèces étudiées.

### **REMARQUES :**

Le pourcentage de positivité des galeries micro-CSB BGN qui a été obtenu lors de l'étude de *E.coli* et de *K.pneumoniae* est à relativiser dans la mesure où, la majorité des caractères fondamentaux d'identification de ces germes sont apparus à  $T_4$  et à  $T_5$  (voir tableau II, III). Cela est dû en partie à l'utilisation de galeries non spécifiques.

De même, le pourcentage de positivité qui a été donné par les galeries micro-CSB BGNNF utilisées pour l'identification de *P.aeruginosa* et de *Acinetobacter.sp* est également à relativiser puisque tous les caractères phares de ces germes ont été visibles entre  $T_4$  et  $T_5$ .

Les galeries micro-CSB entérobactériennes qui comportent plus de sucres donneraient un meilleur résultat avec un pourcentage pouvant aller vers une très bonne identification de *E.coli* et de *K.pneumoniae*.

En effet, la difficulté de l'identification des bacilles à Gram négatif est à lier à la grande variabilité de l'assimilation des sucres par ces derniers.

## **V / Prédiction du temps de seuil et application aux galeries micro CSB**

Le temps de seuil d'une bactérie donnée n'est rien d'autre que le point qui coïncide avec la fin de la phase exponentielle et le début de celle stationnaire. [30, 12].

La méthode utilisée pour sa prédiction est l'inférence de Bayes [30] qui s'appuie sur les lois de la probabilité conditionnelle (équation).

Cette méthode d'inférence bayésienne appliquée à *E.coli* a donné un temps de seuil  $T_s = 2 \text{ H } 30 \text{ min}$ .

D'autres chercheurs sont parvenus à des résultats proches de ce que nous avons obtenu avec un temps de seuil qui variant entre de 110min et 120 min dans la majorité des cas [44].

Cette légère différence est liée à la variabilité des conditions d'études de la croissance d'une expérience à une autre [6].

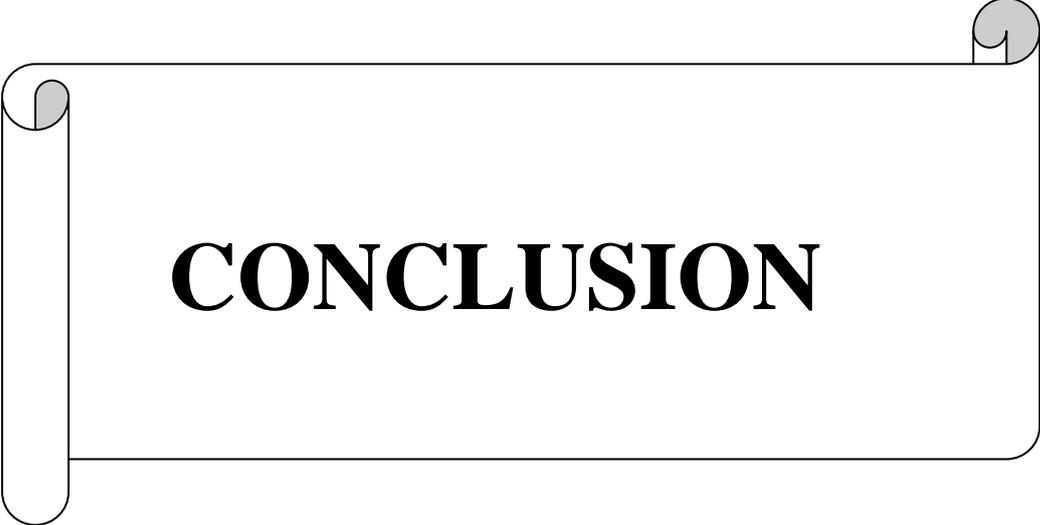
Cela veut dire que pour obtenir une bonne identification de *E.coli* avec les galeries micro-CSB BGN, une incubation de 2 heures des colonies de 18h de culture sur EMB est nécessaire.

Pour *K.pneumoniae* qui a donné un temps de seuil de 3 H, une incubation de 3 heures pourrait permettre une bonne identification avec ces mêmes galeries micro-CSB.

Le même temps de seuil a été obtenu avec *P.aeruginosa* 3 H d'incubation du bouillon BT suffiraient pour donner une identification acceptable de ce germe avec les galeries BGNNF.

Avec, *Acinetobacter.sp* nous avons obtenu un temps de seuil égal à 9 H. Par conséquent, 9 H d'incubation de la galerie micro-CSB BGNNF donneraient une identification acceptable.

Cependant, nous ne devons pas perdre de vue que c'est sur un modèle d'étude de croissance que cette prédiction a été effectuée et par conséquent ces résultats ne sont valables que si ces conditions d'études sont scrupuleusement respectées.



**CONCLUSION**

L'importance des bacilles à Gram négatif en pathologie humaine n'est plus à démontrer. Ils sont responsables de diverses infections et fréquemment isolés au laboratoire. Parmi les galeries permettant leur identification, figurent les micro-CSB mises au point au laboratoire de bactériologie et virologie de l'HALD.

Ces galeries ont montré leur efficacité depuis plusieurs années, mais on ne dispose pas d'un inoculum adéquat pour chaque type de galerie.

C'est en vue d'améliorer cet aspect que nous avons étudié, via la croissance bactérienne, « l'effet inoculum » sur l'identification des entérobactéries et des bacilles à Gram négatif non fermentaires, respectivement par les galeries micro-CSB BGN et micro-CSB BGNNF.

Cette étude a porté sur des souches de référence et de contrôles pré-identifiées. Elle s'est déroulée au laboratoire de bactériologie et virologie fondamentale et appliquée de l'UCAD II entre octobre 2006 et juin 2007.

Nous avons étudié la croissance bactérienne par la méthode de dénombrement sur boîte de Pétri.

Les points obtenus ont été utilisés pour la recherche de la taille de l'inoculum adéquat afin d'identifier les bacilles à Gram négatif avec les galeries micro-CSB.

Avec ces travaux, nous n'avons pas eu une identification acceptable des entérobactéries en particulier *E.coli* (53,33 %) et *K.pneumoniae* (60 %) sur les galeries micro-CSB BGN.

De même les galeries micro-CSB BGNNF n'ont pas donné un pourcentage de positivité qui rend acceptable l'identification de *P.aeruginosa* (46,66 %) et *Acinetobacter.sp* (40 %).

Ceci nous a amené à faire un ajustement de ces résultats expérimentaux par la méthode d'inférence de Bayes.

En partant, du concept de modèle, nous avons pu prédire le temps de seuil critique de la croissance de chacune des espèces étudiées.

Ainsi, pour *E.coli*, nous avons obtenu un temps de seuil de 2 H 30min

correspondant à un inoculum de  $149.10^9$  UFC / ml. Pour *K.pneumoniae* un temps de seuil de 3 H a été trouvé pour un inoculum de  $30.10^9$  UFC / ml.

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires notamment *P.aeruginosa* et *Acinetobacter.sp*, nous avons eu 3 H et 9 H respectivement pour des inocula de  $37.10^9$  UFC/ml et  $39.10^9$ .UFC / ml.

Cette étude contribuera à améliorer les conditions d'utilisation des galeries micro-CSB BGN et micro- CSB BGNNF.

L'amélioration de ces conditions permettrait :

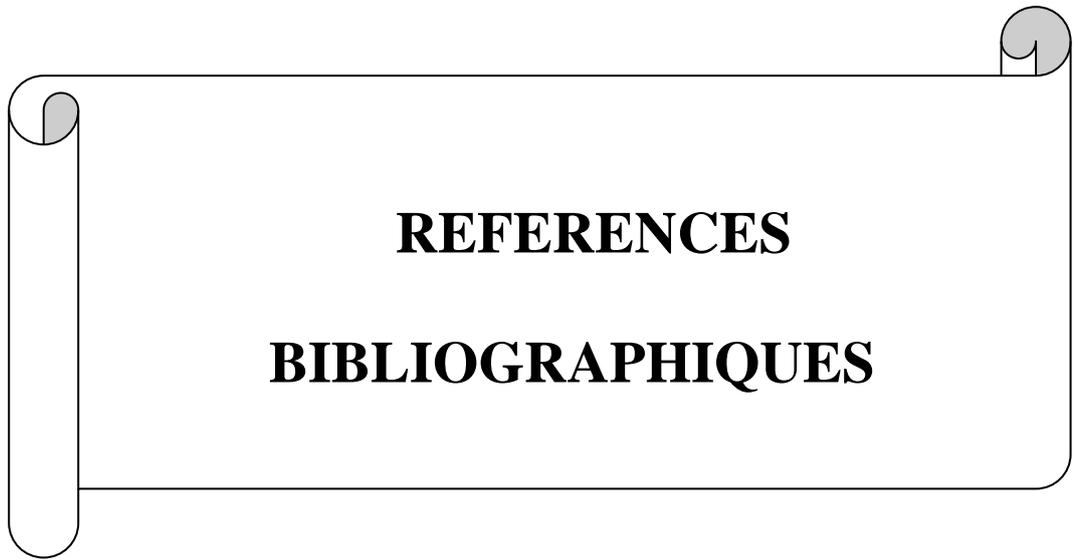
- de rendre plus performante la méthode d'identification
- d'obtenir des résultats fiables
- de réduire le temps du diagnostic bactériologique

Ce gain de temps a toute son importance dans la prise en charge des patients.

Le médecin peut alors entamer le plutôt possible un traitement approprié.

Plutôt un traitement adéquat est initié, meilleure est la prise en charge du patient.

Par conséquent, toutes les recherches qui visent à réduire le temps du diagnostic bactériologique sont à encourager en vue de sauver le maximum de vies possibles.



**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

**1) AP. Cystic fibrosis foundation therapeutic.**

Improvising Disease Treatment through Genome Research.

*Pseudomonas* Genome Database V<sub>2</sub>, Mars 2007 : 1

**2) Avril. J. L, Monteil. H, Dobernat.H, Denis. F.**

Bactériologie Clinique.

Édition ELLIPSE: 171, 172, 175, 208 ,294 ,295

**3) Bajard S. C.**

Modélisation à visée prévisionnelle de la cinétique de croissance d'une population de *Listeria monocytogenes*.

Thèse Université Claude Bernard de Lyon I, France. N° 312 (1996) : 25, 44,77, 79.

**4) Barbe et al.**

Nucleic Acids Res.

October 28 .2004:32(19) 5766-5779.

**4) Boye C.S.**

Travaux Pratiques de Microbiologie

Agrégation de Biochimie Génie biologie. (1999). UCAD Dakar. : 1 à 13.

**6) Bréand S.**

Etude biométrique de la réponse d'une population bactérienne à une variation défavorable de température ou de pH.

Thèse Université Claude Bernard de Lyon I, France. (1998). N° 89 : 67, 69, 76 79.

**7) Burrows. W, Moulder. J. W., Lewerl R. M.**

Text book of Microbiology. Eighteen editions. (1996): 93, 100.

**Campbell R.**

Le cycle cellulaire chap. 12: 67, 68.

**8) Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec.**

Recherche des Coliphages F. spécifiques et des Coliphages somatiques : méthodes Présence/ absence. Edition MA. 700 - cdph 1.0, 2003 - 10- 24.

**9) Centre Hospitalo-universitaire Pitié. Salpêtrière**

Entérobactéries et autres bacilles à gram négatif non exigeants. Cours de Bactériologie DCEM1 : 7 : 1 à 3.

**10) Collignon A.**

Nutrition, Croissance bactérienne. Cours de bactériologie fichier pdf. (2002) : 2, 3, 8.

**11) Cornu M.**

Dynamique des populations bactériennes en cultures mixtes. Thèse Université Claude Bernard de Lyon I, France. N° 213. (2000).  
: 33-36, 49, 50.

**12) Courol R.**

Physiologie - Croissance. Cours de bactériologie générale.  
Faculté de Médecine - Université Lille 2. (2007) : 2, 6, 8.

**13) Dieterlé M.**

Institut II, Albert- Ludwigs Fribourg ; Susanne Wagner

Eppendorf ®, Hambourg. Culture des bactéries vue sous un angle

économique - Gain de temps, de place et de matériel grâce à l'utilisation de tubes avec couvercle membrane Eppendorf ® Lid <sub>Bac</sub> : 1 à 5.

**14) Diop R.**

Sepsis, Sepsis sévère et choc septique : applications des critères de définition des états septiques à la clinique des maladies infectieuses du CHU de Fann. Thèse Pharm, Dakar N° 27. (2005).

**15) Edler L.**

. Biometry - The Role of the Biostatistician.

Introduction to Clinical Drug Research. Vienna School of Clinical Drug Research. 22 – 26, Janvier 2001: 15.

**16) Espace étudiants.**

Définition, Classification et Nomenclature des bactéries. Cours de bactériologie générale. 21, Novembre, 2002 : 1, 4, 5, 10.

**17) Euzeby J.P.**

Dictionnaire de Bactériologie vétérinaire. Courriel CV SBSV. Décembre. (2003) : 3, 5, 8.

**18) Euzeby J. P.**

Abrégé de Bactériologie générale et médicale Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Courriel CV SBSV. (1998) : 2 – 10.

**19) Faculté de Médecine Necker Enfants malades.**

Cours de Bactériologie Systématique DCEM 1. (2002/2003) : 4, 5, 33.

**20) Ferron A.**

(1979).BACTERIOLOGIE MEDICALE : 10<sup>ème</sup> édition Crouan et Roques. 21 : 1, 4, 5. 22 : 1, 3. 31 : 1, 3.

**21) Flaudrois J. P.**

Bactério Génér/ croissance bactérienne Cours de Bactériologie Médicale DCEM1 UFR Médecine Lyon Sud- Laboratoire de Biométrie, Biologie Evolutive UMR 5558. (2004) : 1, 3, 10.

**22) Flaudrois J. P., Chomorat M.**

Bactériologie médicale pratique. Editon MEDSI /Mc GRAW HILL. (1988): 51.

**23) Fraillery D.**

Mise au point d'un modèle de pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa* chez la souris, et utilisation à des fins d'immuno prévention passive. (2001) : 5 – 7, 11, 12, 14.

**24) Health and Safety Department.**

Good Microbiological Practice Containment University of Edinburgh. (August 2003): 1 – 8.

**25) Larpent J. P.**

coordonnateur. (1997). Microbiologie alimentaire : techniques de laboratoire. Editon Lavoisier Tec & Doc : 111, 132, 136, 139

**26) Lobril J. R.**

Réévaluation du modèle de croissance de Monod : effets des antibiotiques sur l'énergie de maintenance. Thèse Université de Lyon I, France. (1998) : 42, 77.

**27) Ministère de l'Environnement du Québec**

centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. Recherche de coliphages spécifiques et des coliphages somatiques : méthodes présence/absence. Edition : MA700-Colph 10. (2003) : 8, 18,20

**28) Mossoro K. C. D.**

Biométrie et Croissance bactérienne Cours de DEA de Microbiologie fondamentale et appliquée. (2005-2006) : 14, 22, 32.

**29) Muller M. L. D.**

Méthodes de prédiction des aptitudes de croissance des populations de micro-organismes. Thèse Université Claude Bernard Lyon I, France. N° 118 (1995) : 67, 69,76, 79.

**30) Nassif X., Philipion A.**

Relations hôte - Pathogène. Cours de Bactériologie générale. (2002) : 5, 36, 75.

**31) Ndir I.**

Mise au point microméthode d'identification des entérobactéries. Thèse Pharm, Dakar N°5. (1996) : 13, 14, 16, 31.

**32) Ndoye R.**

Algorithmes d'identification des entérobactéries et des bacilles à Gram négatif non fermentaires. Thèse Pharm, Dakar N° 83. (2004) : 3 – 6, 60, 61.

**33) Perrière G.**

Application d'une présentation par objet des connaissances de modélisation de certains aspects de l'expression des gènes chez *E.coli* UCBL. Thèse Université de Lyon I, France. (1992): 14, 77.

**34) Philipion A.**

Bacilles à gram-négatif non fermentaires opportunistes : Arinetobacter, Pseudomonas cours de bactériologie médicale. Faculté de Médecine Cochin-Port Royal, Paris : 1 à 13.

**35) Pilet, Bourdon J. L, Toma.B, Marchal.M, balbasta. C.**

Bactériologie médicale et vétérinaire. Collection: Biologie appliquée. Maison Doin. Editeur, Paris. (1983, 163

**36) Plesiat P.**

CHU Besançon.

Cours1 Pseudomonas. (1997): 1 à 5

**37) Sanaa M.**

Microbiologie prévisionnelle : principaux modèles de croissance utilisée en appréciation quantitative des risques.

Epidemiol et Santé Anim, 2002, 41, 169 – 177: 2, 4.

**38) Sarr T.**

Algorithme d'identification de *staphylococcus* à coagulase négative et de *Streptococcus* non groupable.

Thèse Pharm, Dakar. N° 27. (2004).

**39) SMAI : 4e rencontres Math- Industrie.**

Microbiologie prévisionnelle : Un outil pour estimer la durée de vie des Aliments (DLC) et Assurer la qualité jusqu'à la consommation.

Article Adria Développement, 4 Avril, 2006 : 2, 3, 20.

**40) Standards Unit.**

Evaluations and Standards Laboratory. Identification of glucose no fermenting Reds.

Reference no: BSOP ID 17i (2003): 6, 16.

**41) Todar's K.**

Nutrition and Growth of Bacteria.

University of Wisconsin Madison Department of Bacteriology. (2005): 1 à 16.

**42) University of Edinburgh.**

Good Microbiological practice and containment biosafety unit.

Health and safety department. August 2003: 1 à 8.

**43) Wiley J. S.**

Bacterial Growth

Microbial Growth. 2005).

## **REFERENCES WEB**

**44) Article de wikipedia,**

*Pseudomonas aeruginosa:*

«[http://fr.wikipedia.org/wiki/pseudomonas aeruginosa](http://fr.wikipedia.org/wiki/pseudomonas_aeruginosa). »

Dernière modification de la page 22 avril 2007 à 14h50.

**45) Article de Wikipedia,**

*Acinetobacter:* « <http://fr-wikipedia.org/wiki/acinetobacter> ».

Dernière modification de la page 14 mars 2007 à 3h43.

**46) Article de wikipedia**

*Escherichia Coli:* «[http://fr wikipedia.org/wiki/ escherichia coli](http://fr.wikipedia.org/wiki/escherichia_coli)» dernière modification: 23 avril 2007 à 16h12.

**47) Modèle de Gompertz (1825).** Acrobat Reader -[Gompertz. pdf] dernière mise à jour 27/03/03 pages : 1.

**48) Article de Wikipedia.**

*Klebsiella:* « <http://fr.wikipedia.org/wiki/klebsiella> »

Dernière modification 23 fevrier 2007 à 18h14.

**49) SLTBGB de Versailles**

Ressources Cinétique d'une croissance Microbienne discontinue htl dernière modification 20/12/2006 9h47.

**50) Article Wikipedia,**

*Microbiologie:* « <http://fr.wikipedia.org/wiki/Microbiologie> »

Dernière modification 26 avril 2007 : 1h 35.

**51) Article Wikipedia**, Pseudomonas aeruginosa «[http://fr.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas aeruginosa](http://fr.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa) »

Dernière modification 22 avril 2007 14h50.

[www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com)

[www.microbes-educ.org/etudiant/phisio-croissance.html](http://www.microbes-educ.org/etudiant/phisio-croissance.html)

[www.univ-ubs.fr/ecologie/modele\\_croissance.html](http://www.univ-ubs.fr/ecologie/modele_croissance.html)

[www.vet-lyon.fr/ens/expa/micro\\_immuno/m\\_croissance\\_bact.html](http://www.vet-lyon.fr/ens/expa/micro_immuno/m_croissance_bact.html)

[www.microbes-educ-org/etudiant/pathogene](http://www.microbes-educ-org/etudiant/pathogene)

[www.ina.dz/programme/2microbiologie.pdf](http://www.ina.dz/programme/2microbiologie.pdf)

[www.cob.uha.fr](http://www.cob.uha.fr)

[www.1fremer.fr/docelec.doc](http://www.1fremer.fr/docelec.doc)

[Www.Wikipedia.org/wiki/croissance\\_bacterinne](http://Www.Wikipedia.org/wiki/croissance_bacterinne)

[www.wikipedia.org/wiki/facteur\\_de\\_croissance](http://www.wikipedia.org/wiki/facteur_de_croissance)

[www.docismef.fr](http://www.docismef.fr)