

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE



ANNEE : 2007

N° 109



ETUDE BIOMETRIQUE DE LA
CROISSANCE ET MODELISATION DE LA
SURVIE DE *Streptococcus pneumoniae* ;
Moraxella catarrhalis et *Haemophilus*
influenzae

THESE

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

Présentée et soutenue publiquement le 11 Décembre 2007

Par

Mlle Victoire Paule NDONG NGALE

Née le 13 Septembre 1984 à Douala (CAMEROUN)

MEMBRES DU JURY

<u>Président :</u>	M. Moussa Efa	CISSÉ	Professeur
<u>Membres :</u>	M. Cheikh Saad Bouh	BOYE	Professeur
	M. Sara	NDIAYE	Maître de conférences agrégé
<u>Directeur de Thèse :</u>	M. Cheikh Saad Bouh	BOYE	Professeur

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	
I. STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE.....	5
1.1. TAXONOMIE.....	5
1.2. HABITAT.....	5
1. 3. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES.....	5
1.3.1. Caractères morphologiques	5
1.3.2. Caractères culturaux	5
1.3.3. Caractères biochimiques.....	6
1.4. PHYSIOPATHOLOGIE-POUVOIR PATHOGENE.....	6
II. HAEMOPHILUS INFLUENZAE.....	9
2.1. TAXONOMIE.....	9
2.2. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES.....	9
2.2.1. Caractères morphologiques	9

[Tapez un texte]

2..2.2 Caractères culturaux	9
2.2.3. Caractères biochimiques.....	10
2.3. HABITAT-POUVOIR PATHOGENE	10
III. MORAXELLA CATARRHALIS.....	12
3.1. TAXONOMIE.....	12
3.2. HABITAT.....	13
3.3. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES.....	13
3.3.1. Caractères morphologiques	13
3.3.2. Caractères culturaux	13
3.3.3. Caractères biochimiques.....	13
3.4. POUVOIR PATHOGENE	13
IV. PHYSIOLOGIE ET CROISSANCE BACTERIENNES.....	15
4.1. PHYSIOLOGIE ET METABOLISME BACTERIENS.....	15

4.2. CROISSANCE BACTERIENNE.....	20
4.2.1. Définition.....	22
4.2.2. Facteurs influençant la croissance.....	23
4.2.3. Suivi de la croissance bactérienne	26
4.2.4. Cinétique de la croissance	30
4.2.5. Classification des modèles de croissance.....	36
4.2. MICROBIOLOGIE PREDICTIVE.....	44
4.2. LIMITE DE LA MODELISATION.....	46
V. ETUDE DE LA REPOSE BACTERIENNE A UNE MODIFICATION DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX.....	48
5.1. FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET TYPE DE VARIATIONS.....	48
5.1.1. Facteurs environnementaux.....	48
5.1.2. Classifications des variations.....	49
VI. DESCRIPTION DE LA MORTALITE.....	54
6.1. COURBES DE SURVIE LINEAIRE.....	54

[Tapez un texte]

6.1.1. Théorie de la cible unique.....	54
6.1.2. Descripteurs de la mortalité	55
6.2. COURBES DE SURVIE NON LINEAIRE.....	56

DEUXIEME PARTIE : NOTRE EXPERIENCE

I. METHODOLOGIE.....	62
1.1. MATERIEL ET MILIEUX.....	62
1.1.1. Matériel.....	62
<i>1.1.1.1. Cadre d'étude.....</i>	62
<i>1.1.1.2. Souches bactériennes.....</i>	62
<i>1.1.1.3. Matériel pour l'identification</i>	62
<i>1.1.1.4. Matériel pour l'étude de la croissance.....</i>	63
<i>1.1.1.5. Matériel pour la conservation des souches.....</i>	64
1.1.2. Milieux.....	64
1.1.3. Contrôle de stérilité et d'efficacité des milieux	64
1.2. METHODES.....	65
1.2.1. Streptococcus pneumoniae.....	65

1.2.1.1. <i>Identification</i>	65
1.2.1.2. <i>Etude de la croissance</i>	69
1.2.1.3. <i>Etude de la survie</i>	71
1.2.2. Haemophilus influenzae et Moraxella catarrhalis	72
1.3.2.1. <i>Identification</i>	72
1.3.2.2. <i>Etude de la croissance</i>	76
1.3.2.3. <i>Etude de la survie</i>	79
II. EXPLOITATION DES RESULTATS ET COMMENTAIRES	80
2.1. HAEMOPHILUS INFLUENZAE.....	80
2.1.1. <i>Courbes de croissance</i>	80
2.1.2. <i>Courbes de survie</i>	83
2.2. MORAXELLA CATARRHALIS.....	88
2.2.1. <i>Courbes de croissance</i>	88
2.2.2. <i>Courbes de survie</i>	91
2.3. STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE.....	96
2.3.1. <i>Courbes de croissance</i>	96
2.3.2. <i>Courbes de survie</i>	97

III. MISE EN PLACE DES OUTILS MATHÉMATIQUES.....	99
3.1. PREDICTION DE LA DURÉE DE CONSERVATION DE H.INFLUENZAE A -20°C	100
3.2. PREDICTION DE LA DURÉE DE CONSERVATION DE M. CATARRHALIS A -20°C	101
3.3. PREDICTION DE LA DURÉE DE CONSERVATION DES BACTÉRIES A – 80°C.....	103
IV. DISCUSSION.....	104
4.1. LES SOUCHES BACTÉRIENNES.....	104
4.2. CINÉTIQUE DE CROISSANCE.....	104
4.3. PREDICTION DE LA CONSERVATION.....	105
4.4. APPORTS ET PERSPECTIVES.....	111
<u>CONCLUSION</u>.....	114
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	118

[Tapez un texte]

INTRODUCTION

A decorative graphic element consisting of a thick gray L-shaped bar. It starts with a horizontal bar extending from the left edge of the page, then turns 90 degrees upwards to form a vertical bar on the right side. The word "INTRODUCTION" is centered on the horizontal part of this bar.

Streptococcus pneumoniae est une bactérie responsable de nombreuses affections (sinusites, otites moyennes aiguës de l'enfant, conjonctivites, méningites), c'est l'agent pathogène le plus fréquent des pneumonies communautaires. *Haemophilus influenzae* est un pathogène occasionnel responsable d'otites de sinusites de conjonctivites, de méningites de pneumonies et de bronchites. *Moraxella catarrhalis* est également un pathogène des voies respiratoires. Du fait de la diversité, de la fréquence et de la gravité des affections qu'entraînent ces germes, nécessité est de caractériser et de sérotyper les souches virulentes en vue de la mise au point de vaccins efficaces.

D'un point de vue épidémiologique, il est nécessaire de connaître la répartition géographique des différents sérotypes circulants. En effet les efforts de prévention sont souvent gênés par le manque d'efficacité des vaccins mis sur le marché, sur les sérotypes rencontrés en Afrique. L'étude de la colonisation nasopharyngée de ces trois bactéries dans les pays Africains, ainsi que le sérotypage des souches isolées sont nécessaire pour la mise au point de vaccins efficaces dans nos populations.

Le sérotypage des souches se fait le plus souvent dans les laboratoires de références, ce qui nécessite une conservation à plus ou moins long terme des souches identifiées. La congélation est la méthode de conservation la plus commune et la plus accessible. Pour ces trois bactéries des problèmes de conservation sont souvent rencontrés du fait de la fragilité de ces germes.

Notre travail vise à améliorer les conditions de conservation de ces bactéries qui sont en fait des germes exigeants et fragiles, en déterminant la viabilité des souches dans deux milieux de conservation (MGY et Bouillon cœur cerveau additionné de glucose et de glycérol), à différentes températures. Cette détermination passe par :

- l'étude de la croissance de *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* et *Haemophilus influenzae*
- et la modélisation de leur survie dans les différents milieux.

[Tapez un texte]

PREMIERE PARTIE :

GENERALITES



RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE(26)

I.1 Taxonomie

S. pneumoniae appartient à la famille des *Streptococcaceae* rassemblant plus de 80 espèces bactériennes. Elle regroupe les cocci à Gram positif, dépourvus de catalase et cytochrome oxydase, produisant de l'acide lactique par fermentation.

I.2 Habitat

Le pneumocoque est une bactérie commensale des voies aériennes supérieures, il colonise le rhinopharynx très précocement (tous les enfants ont été en contact avant l'âge de deux ans(37) ; 50% des enfants de cet âge sont porteurs).

I.3 Caractères bactériologiques

1.3.1 Caractères morphologiques

Ce sont des diplocoques gram positifs, capsulés (souches virulentes), souvent à morphologie lancéolée, disposés en courtes chaînettes.

1.3.2 Caractères cultureux

La culture de *S.pneumoniae* nécessite l'adjonction de facteurs de croissance. Les milieux les plus couramment utilisés sont la gélose trypticase soja ou la gélose Columbia enrichies en sang défibriné de mouton ou de cheval. On peut également utiliser la gélose chocolat polyvitex. La culture en milieu liquide se fait en bouillons cœur-cerveille ou Todd Hewitt qui favorisent la croissance bactérienne.

Les pneumocoques induisent une hémolyse alpha sur gélose au sang. Une atmosphère enrichie en CO₂ (5 à 10%) ou une atmosphère anaérobie favorise la croissance du pneumocoque et l'expression de l'hémolyse. La température optimale est de 35°C à 37°C.

1.3.3 Caractères biochimiques

Ils sont fragiles, particulièrement aux agents tensioactifs (détergents, bile) qui provoquent leur lyse, probablement en inactivant les inhibiteurs des autolysines.

Depourvus de catalase et d'oxydase les pneumocoques sont lysés par les sels biliaires et sensibles à l'optochine.

1.4 Physiopathologie-Pouvoir pathogène(26)

1.4.1 Physiopathologie

Les facteurs majeurs de virulence de *S.pneumoniae* sont la capsule bactérienne et la pneumolysine (PLY). La capsule, couche la plus externe de la bactérie, est constituée de macromolécules polysaccharidiques. En culture, sa présence donne un aspect mucoïde aux colonies (colonies "smooth"). Seules les souches capsulées possèdent un pouvoir pathogène expérimental, par opposition aux souches dépourvues de capsules dites rugueuses ("rough"). Sa composition extrêmement polymorphe est à la base du sérotypage des souches (90 sérotypes décrits). Son action principale est la résistance à la phagocytose et sa capacité à diminuer l'opsonisation. La pneumolysine appartient à la famille des thioles-activables. Apparentée à la streptolysine O de *Streptococcus pyogenes*, sa pathogénicité est multifonctionnelle. Cette dernière est liée d'une part à son activité cytotoxique directe vis-à-vis des cellules respiratoires et endothéliales permettant l'envahissement de l'arbre respiratoire et d'autre part à un effet proinflammatoire.

Ce dernier effet est dû à sa capacité de liaison au fragment Fc des immunoglobulines et de fixation au fragment C1q du complément. La localisation de cette pneumolysine nécessite sa libération dans le milieu extérieur par l'action d'une autolysine.

D'autres facteurs interviennent. L'adhésion aux cellules ciliées de l'arbre bronchique est liée à la présence de diverses protéines de surfaces : PspA (pneumococcal surface protein), PsaA (pneumococcal surface adhesine A), PspB

(protéine apparentée aux protéines R des streptocoques pyogènes), les perméases peptidiques PipA et AmiA et les acides lipotéichoïques de la paroi. Certaines protéines hydrolytiques cytoplasmiques (neuraminidase, IgA1 protéase, hyaluronidase) contribuent également aux phénomènes de colonisation. La neuraminidase interviendrait en particulier dans la diffusion méningée du pneumocoque en clivant les acides sialiques des glycoprotéines et glycolipides à la surface des muqueuses et des liquides biologiques(26).

1.4.2 Pouvoir pathogène

Agent pathogène le plus fréquent des pneumonies communautaires bactériologiquement documentées (37) ; c'est également l'une des bactéries les plus fréquentes dans les otites moyennes aiguës de l'enfant (moins de 2 ans), les mastoïdites ; les sinusites et les conjonctivites.

Il est responsable d'infections invasives telles que les méningites ; chez les personnes âgées : c'est le principal agent causal. Chez l'enfant de moins de 5 ans, en dehors de la période néonatale dans laquelle *S.agalactiae* prédomine depuis l'introduction de la vaccination anti-*Haemophilus b*, sa fréquence est maintenant identique à celle de *Nisseria méningitidis*(26).

Certains facteurs prédisposent aux pneumonies à pneumocoques:

- les atteintes des voies respiratoires (infections virales, obstructions, etc.)
- l'alcoolisme
- les dysfonctions cardio-circulatoires, rénales
- l'anémie à hématies falciformes
- l'âge (enfants, personnes d'âge supérieur à 65 ans)
- la splénectomie, les dysfonctions spléniques

[Tapez un texte]

- **Antibiotiques:** pénicillines (1er choix), tétracyclines, macrolides. La résistance aux pénicillines, aux tétracyclines et aux macrolides est en constante propagation.
- **Vaccination :**

Streptococcus pneumoniae est responsable de la grande majorité des pneumonies bactériennes; pour le développement de la maladie, les facteurs prédisposant sont plus importants que l'exposition aux pneumocoques (10 à 50% de porteurs), d'où l'intérêt de la vaccination des populations à risque.

Des vaccins contenant les sérotypes les plus fréquemment associés aux infections invasives à pneumocoque sont disponibles; le vaccin polysaccharidique contenant 23 sérotypes est disponible et peut être administré à partir de 2 ans (PNEUMO 23®).

II. HAEMOPHILUS INFLUENZAE

II.1 Taxonomie

L'espèce du genre *Haemophilus*, *H.influenzae* a été décrite à tort par Pfeiffer en 1892 comme étant l'agent causal de la grippe sur la base de données épidémiologiques. En fait, cette bactérie était tout simplement isolée de façon plus fréquente chez les patients atteints de grippe, quelquefois comme agent de surinfection.

La taxonomie des bactéries du genre *Haemophilus* a été souvent remaniée. Le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* répertorie 16 espèces dans le genre *Haemophilus* en fonction des exigences en facteurs X et V. Chacune des espèces ayant une certaine spécificité d'hôte, elles peuvent être aussi répertoriées en fonction de leur origine.

La taxonomie du genre *Haemophilus* a été parsemée de modifications et fait encore l'objet de nombreuses interrogations. Ce genre a été inclus dans la famille des *Brucellaceae* (1957) puis dans le groupe de bactéries d'affiliation incertaine dans la 8^e édition du *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* puis plus récemment dans la famille des *Pasteurellaceae*(34) aux côtés des genres *Actinobacillus* et *Pasteurella*.

II.2 Caractères bactériologiques

2.2.1 Caractères morphologiques

Haemophilus influenzae: bacilles Gram négatif polymorphes, parfois capsulés.

2.2.2 Caractères cultureux

Ce sont des bactéries à croissance difficile car elles nécessitent des milieux qui apportent le facteur X ou hémine et le facteur V ou NAD (nicotinamide adénine dinucléotide).

Le facteur X ou hémine entre dans la composition des enzymes respiratoires contenant du fer (cytochromes, cytochrome oxydase, catalase, peroxydase). Il est indispensable aux bactéries ne possédant pas les enzymes de la chaîne de transformation de l'acide delta amino-lévulinique en protoporphyrine. Il est thermostable.

Le facteur V est une co-enzyme de déshydrogénase. Le NAD est détruit par chauffage 30 minutes à 120°C et ne supporte donc pas l'autoclavage. Le sang frais contient des inhibiteurs du NAD ; la cuisson 15 minutes à 75°C permet leur destruction.

La gélose au sang cuit apporte suffisamment d'hémine, mais doit être complétée en NAD. L'incubation en atmosphère humide de 5 à 10 % de CO₂ est recommandée, et la température optimale est de 35 -37°C.

2.2.3 Caractères biochimiques

H.influenzae est catalase positive (lente) et cytochrome oxydase positive.

II.3Habitat-Pouvoir pathogène

H. influenzae est commensale de l'oro-pharynx et du nasopharynx. Les souches peuvent posséder ou non une capsule. Six types capsulaires (a-f) ont été décrits (47). Dans la flore normale de ces sites anatomiques, on observe une colonisation par les souches non capsulées chez 50 à 80% des individus. Les souches capsulées sont moins fréquentes. On ne les observe que chez 20 à 40% des sujets pour le type b et moins de 1 à 2% pour les autres types capsulaires.

Les souches capsulées de type b sont à l'origine de 95 % des pathologies invasives : méningites, septicémies, épiglottites, pneumonies, cellulites, arthrites aseptiques. Ces isolats sont souvent de biotype I.

Les pathologies invasives touchent essentiellement l'enfant, classiquement de 3 mois à 3 ans, en fait de moins de 5 ans avec un pic d'incidence des âges entre 6 mois et 2 ans, période pendant laquelle l'immunité, en particulier les anticorps anti-polysaccharides de capsule peuvent être inexistantes.

Commensal des voies respiratoires supérieures: environ 50% des enfants sont porteurs de *H. influenzae* dans le nasopharynx; c'est un pathogène occasionnel.

Il faut distinguer:

1) Les souches invasives

Ce sont celles qui développent la plus grande pathogénicité grâce à la présence d'une capsule (sérotypes: b, le plus fréquent; a et c-f, moins fréquents). Elles sont généralement responsables de:

- Méningites
- Epiglottites (enfants inférieure à 6 ans), septicémies
- Infections (souvent surinfections) des voies respiratoires basses (pneumonies, bronchites); ces infections sont aussi provoquées par des souches non encapsulées.

2) Les souches non invasives

[Tapez un texte]

Elles ne sont pas encapsulées, mais leur pathogénicité potentielle est associée à certains biotypes. Elles sont généralement responsables de sinusites, d'otites, de conjonctivites.

- **Vaccination:** depuis 1990 sont à disposition des vaccins constitués par des extraits poly-saccharidiques capsulaires conjugués à des protéines (protéine de la membrane externe de *N. meningitidis*, toxoïdes diphtérique ou tétanique). Ils sont recommandés aux nourrissons à partir de l'âge de 2 mois.

Depuis l'introduction du vaccin contre *Haemophilus influenzae* b, on note une forte baisse des cas de méningites bactériennes à Hib (44).

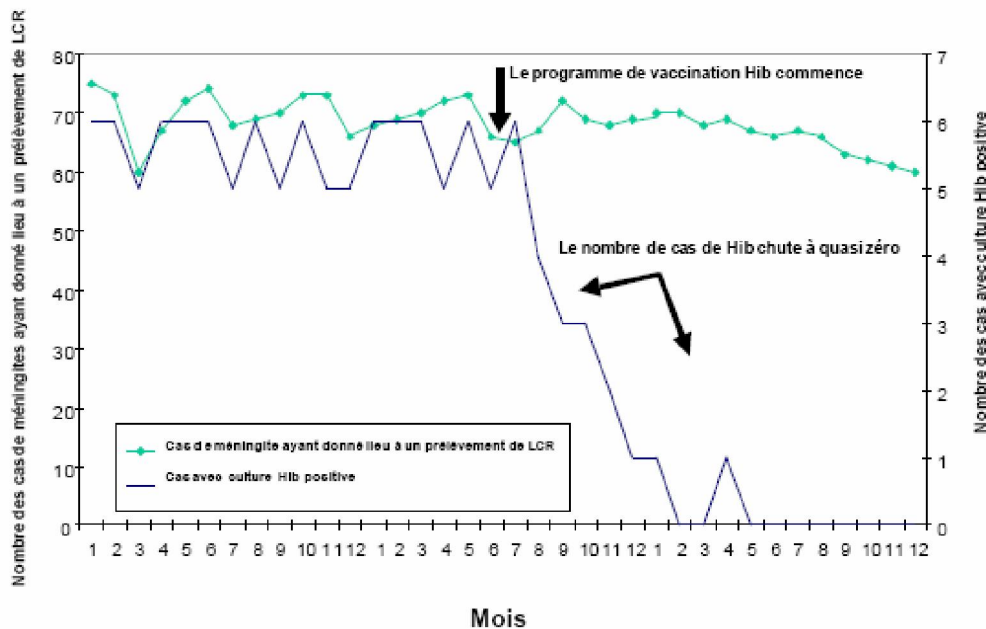


Figure 1 : Evolution des cas de méningites pédiatriques ayant donné lieu à un prélèvement de LCR et des cas de méningites avec culture Hib positive. (44)

III. MORAXELLA CATARRHALIS

III.1 Taxonomie

La position taxonomique la plus communément admise actuellement est celle qui a été décrite par Catlin(13) en 1991, position reprise dans le « Manual of Clinical Microbiology » de 1995(35). Ainsi la famille de *Nisseriaceae* a été séparée en deux familles en 1991 par Catlin(13) qui a créé la famille des *Branhamaceae* tout en conservant l'ancienne famille des *nesseriaceae*. La famille des *Branhamaceae* comprend le genre *Branhamella* (coques) et le genre *Moraxella* (bacilles). Les études génomiques ont conduit à rapprocher ces genres malgré leurs différences morphologiques, et à exclure le genre

Branhamella de la famille des *Nisseriaceae* bien qu'il s'agisse dans les deux cas de coques à Gram négatif.

III.2 Habitat

B. catarrhalis est retrouvé exclusivement chez l'homme. Cette bactérie est un germe commensal des voies respiratoires supérieures et occasionnellement des voies génitales de la femme. Plusieurs études ont permis d'établir la prévalence de la colonisation des voies respiratoires supérieures dans différentes populations(41).

III.3 Caractères bactériologiques

3.3.1 Caractères morphologiques

Ce sont des diplocoques Gram positif à faces adjacentes plates, parfois disposés en tétrades.

3.3.2 Caractères cultureux

[Tapez un texte]

Ils se développent sur gélose chocolat, gélose au sang, Mueller Hinton et gélose ordinaire. Les colonies sont blanchâtres à bords nets, et glissent sur la gélose.

3.3.3 Caractères biochimiques

Aérobies stricts, ils possèdent une catalase et une cytochrome oxydase.

III.4 Pouvoir pathogène

Le rôle pathogène de *B.catarrhalis* dans différentes infections semble en augmentation. Cette augmentation pourrait être due à un meilleur diagnostic bactériologique. Néanmoins la quasi-totalité des auteurs considèrent qu'il y a un accroissement important de la prévalence de ces infections(21).

Pour expliquer ce phénomène plusieurs hypothèses ont été évoquées :

- une augmentation de la virulence de la bactérie ;
- la pression antibiotique, les -lactamines étant principaux antibiotiques incriminés.

B.catarrhalis est un pathogène(14) reconnu responsable d'otites(8), de sinusites(8), de laryngites, d'infections broncho-pulmonaires(21), d'infections oculaires, mais aussi d'infections invasives telles que des méningites, des endocardites, des septicémies(32). Il a été reconnu comme un pathogène des voies respiratoires(41).

C'est un germe commensal des voies respiratoires supérieures et occasionnellement des voies génitales de la femme. Chez les adultes, 5% peuvent être colonisés au niveau des voies respiratoires supérieures par *M.catarrhalis* (53). Chez les enfants le niveau de colonisation des voies respiratoires est nettement supérieur à celui des adultes (66 à 100%) avec un maximum pendant l'hiver. Il a été reconnu comme un agent nosocomial des voies respiratoires (46).

IV PHYSIOLOGIE ET CROISSANCE BACTERIENNES

IV.1 PHYSIOLOGIE ET METABOLISME BACTERIENS

Selon Claude Bernard, la physiologie a pour projet d'étudier les phénomènes des êtres vivants et de déterminer les conditions matérielles de leur manifestation. Les caractères physiologiques des bactéries sont donc liés aux conditions **(54)** dans lesquelles nous pouvons les observer.

Pour se maintenir, croître et se reproduire, les bactéries doivent trouver dans le milieu extérieur des conditions physicochimiques favorables ainsi que les aliments qui leur sont nécessaires. **(24)**

Le métabolisme bactérien est l'ensemble des réactions cataboliques, consistant à dégrader les éléments nutritifs du milieu, à transférer et à stocker l'énergie résultant de ces dégradations, afin de réaliser les réactions anaboliques permettant aux bactéries de réaliser la synthèse de leurs propres constituants. **(36)**

4.1.1. Nutrition (24, 36,42)

La nutrition consiste en l'assimilation par la bactérie des divers éléments chimiques offerts par le milieu.

Il y a un éventail de variations des conditions nutritionnelles des différentes bactéries. L'analyse chimique des bactéries indique qu'elles ont besoin des éléments suivants pour la synthèse de leurs protoplasmes : oxygène, hydrogène, azote, carbone, soufre, phosphore ainsi qu'en moindres quantités de nombreux autres éléments : ions phosphates, chlorures, sulfates, potassium, sodium, calcium, et magnésium.

Les aliments servent non seulement de matériaux de construction et de

sources d'énergie nécessaires à la synthèse des constituants des bactéries en phase de croissance, mais aussi de source d'énergie nécessaire au maintien de la vie bactérienne en dehors de toute croissance.

Les aliments des bactéries peuvent être assimilés directement s'ils sont sous une forme simple (glucose, acides aminés...) ; par contre lorsqu'ils sont fournis sous forme complexe, ils doivent d'abord être dégradés par des exo-enzymes avant d'être assimilés (polymères, polyoses, protéines...). Un petit nombre de molécules traversent la membrane cytoplasmique par diffusion libre : ce sont des gaz (O_2 , CO_2), des acides gras, certains nutriments liposolubles. La majorité des substances pénètrent grâce à des perméases, systèmes membranaires augmentant la vitesse de passage à travers la membrane.

Deux principaux groupes de bactéries peuvent être distingués en fonction de leur mode d'alimentation :

- les bactéries autotrophes qui sont principalement les organismes qui n'ont aucun intérêt médical direct. Ces organismes peuvent vivre dans un environnement entièrement inorganique. Ils tirent leur carbone du CO_2 et des ions carbonates. Certaines bactéries sont des autotrophes obligatoires ;
- les bactéries hétérotrophes comprennent toutes les bactéries pathogènes. Elles utilisent des composés organiques comme source de carbone et d'énergie. Les sources de carbone des hétérotrophes sont des sucres simples, des disaccharides, des alcools polyvalents, des acides organiques aliphatiques.

L'azote est assimilé par les bactéries sous forme ammoniacale. Les bactéries autotrophes, ainsi que nombre de bactéries hétérotrophes pour l'énergie et le

carbone se contentent d'une source inorganique d'azote.

Beaucoup de bactéries hétérotrophes pathogènes ne peuvent pas synthétiser des substances principales telles que des vitamines, des purines et des pyrimidines. Elles peuvent seulement se développer quand ces facteurs sont formés dans le milieu, prêts à l'emploi. Ainsi quelques streptocoques exigent 17 acides aminés, 9 vitamines B, des purines : adénine et guanine, des pyrimidines : cytosine, thymine, uracile et de l'hydrate de carbone pour l'énergie.

4.1.2. Respiration (24, 36,42)

- l'anhydride carbonique : toutes les bactéries exigent le CO_2 pour leur développement et leur métabolisme. Et dans beaucoup de cas, ils peuvent être produits en quantités suffisantes dans la culture elle-même. Quelques unes exigent beaucoup plus de CO_2 qu'elles peuvent trouver dans leur environnement. Par exemple, la croissance des streptocoques est améliorée par l'addition de CO_2

- l'oxygène : les bactéries peuvent être groupées dans trois catégories selon leurs exigences en oxygène :

- les aérobies strictes ou obligatoires sont celles qui se développent en présence d'oxygène,
- les anaérobies strictes ou obligatoires se développent seulement en l'absence d'oxygène,
- les aéro-anaérobies facultatives sont des bactéries qui se développent aussi bien en conditions aérobiques qu'anaérobiques. Dans ce groupe figurent la plupart des bactéries d'intérêt médical.

- l'azote : les bactéries d'importance médicale n'exigent pas d'azote sous sa forme gazeuse.

4.1.3. Métabolisme bactérien (24, 36,42)

a) Métabolisme général

Une fois à l'intérieur des bactéries, les substrats sont métabolisés grâce à des enzymes, selon les voies métaboliques propres à chaque espèce bactérienne.

Les bactéries sont sur le plan métabolique, beaucoup plus actives que l'homme et sont capables d'accomplir leurs processus de métabolisation beaucoup plus rapidement. Ceci est dû à leur grande superficie relative à leur petit volume ce qui facilite les échanges entre les aliments et les produits finaux. Ainsi, chez l'homme, le rapport entre la superficie et le volume est de 0,024. Pour les bactéries ce rapport est d'environ 5 000.

Les bactéries utilisent les substrats d'une manière différente de celle des organismes supérieurs, pour la production de l'énergie et pour la synthèse du matériel cellulaire. Les différences entre les types de substrats qui peuvent être métabolisés sont utilisées en diagnostic bactériologique.

Les types de métabolites produits par les bactéries diffèrent d'une espèce à une autre. Ce caractère est également utilisé pour l'identification des organismes.

La paroi de la cellule et la membrane cytoplasmique des bactéries sont complètement imperméables aux composés à hauts poids moléculaires tels que les protéines, les polysaccharides et les lipides. Leur assimilation nécessite d'abord leur clivage en plus petites unités au niveau extracellulaire. Pour ce faire, la bactérie secrète diverses enzymes : protéases, polysaccharidases et lipases. Ces enzymes décomposent les grandes molécules en acides aminés, en acide gras et en sucres simples qui peuvent être directement absorbés par les bactéries.

La bactérie utilise son matériel nutritif pour deux buts importants :

- pour la production de l'énergie nécessaire à la synthèse du matériel cellulaire et pour le déplacement des organismes mobiles,
- pour la synthèse de divers composants structuraux de la cellule ainsi que des enzymes et des coenzymes exigés dans le métabolisme bactérien.

b) Métabolisme énergétique

L'énergie nécessaire pour la croissance bactérienne est fournie principalement par oxydation : déplacement de molécules d'hydrogène d'un substrat oxydable. Ce processus appelé métabolisme énergétique s'effectue par l'intermédiaire de déshydrogénases qui sont spécifiques du substrat utilisé. Il y a deux types d'oxydation :

1. La respiration : on distingue :

- la respiration anaérobie : une ou plusieurs étapes supplémentaires existent dans le transport des électrons qui impliquent l'intervention de réductases comme les flavoprotéines à FNM ou FAD/et ou les quinones,
- la respiration aérobie : une ou plusieurs étapes supplémentaires existent le long de la chaîne des cytochromes et cytochromes oxydase. Elle implique l'utilisation de l'oxygène moléculaire. Certaines bactéries telles que les streptocoques et les clostridium, qui ne possèdent aucun composant de cytochrome, ne peuvent recevoir de l'énergie par ce processus.

2. La fermentation:

Contrairement à la respiration qui fait intervenir l'oxygène moléculaire, la

[Tapez un texte]

fermentation consiste plutôt en un transfert de l'hydrogène à un autre composé organique qui est réduit. Elle produit peu d'énergie puisque la rupture du substrat n'est pas aussi complète que dans la respiration.

Un exemple de la fermentation bactérienne est la dégradation du glucose par la voie d'Embden-Meyerhof-Panas par les streptocoques et les lactobacilles : ici le produit final principal est le lactose.

c) Métabolisme des hydrates de carbone

Les glucides sont le groupe de substrats le plus utilisé pour la production d'énergie par les bactéries d'importance médicale. Le glucose est l'hydrate de carbone le plus disponible habituellement. Il est généralement dégradé par la voie d'Embden-Meyerhof-Panas. Mais trois autres mécanismes par lesquels le glucose peut être décomposé sont à noter :

- la voie d'Entner-Doudoroff
- la voie des pentoses
- le cycle de l'hexose monophosphate.

Ces trois voies impliquent la phosphorylation du glucose en glucose -6-phosphate et la production d'acide pyruvique, intermédiaire important dans le métabolisme des bactéries ou produit final principal.

d) Métabolisme des protéines

Les bactéries peuvent attaquer tous les types de matériaux albumineux. Beaucoup de bactéries ne peuvent pas se développer en présence uniquement de protéines pures et sont donc équipées de simples produits de dégradation dans les milieux dans lesquels elles sont cultivées. Le terme putréfaction est généralement utilisé pour montrer la décomposition de protéines par les bactéries.

Les bactéries décomposent les protéines au moyen d'enzymes : les protéases.

IV.2 CROISSANCE BACTERIENNE

4.2.1 Définition de la croissance bactérienne

La croissance bactérienne est l'accroissement ordonné de tous les composants de la bactérie. Elle aboutit à l'augmentation du nombre de bactéries(18). Au cours de la croissance, il se produit d'une part, un appauvrissement du milieu de culture en nutriments, et d'autre part, un enrichissement en sous-produits du métabolisme, éventuellement toxiques. L'étude de la croissance peut se faire en milieu liquide ou solide.

La multiplication des bactéries peut être considérable, elle dépend de différentes conditions: les caractères propres des bactéries notamment leur état physiologique; les conditions physico-chimiques du milieu (pH, température...); la composition du milieu (lorsque la bactérie ne trouve pas dans le milieu les facteurs de croissance indispensables, elle est incapable de se développer. La croissance ne peut alors débuter que si l'inoculum contient des cellules mutantes, c'est-à-dire présentant brusquement une modification d'un caractère transmissible héréditairement).

La croissance d'une bactérie placée dans de conditions idéales peut être définie par deux constantes.

- *le temps de génération* : c'est l'intervalle de temps entre deux divisions successives ou celui nécessaire au doublement de la population. En partant d'une cellule bactérienne unique, ce dernier se fait selon une progression géométrique. Dans une population bactérienne toutes les cellules ne se développent pas au même rythme. Le temps de génération varie avec l'espèce considérée et les conditions de culture.

- *Le taux de croissance*: c'est le nombre de division par unité de temps. Autrement dit il est l'inverse du temps de génération.

[Tapez un texte]

Le développement d'une culture bactérienne est habituellement représenté à l'aide d'un graphique donnant le nombre de bactéries ou mieux le logarithme de ce nombre en fonction du temps (cf. I.5). C'est la courbe de croissance. Elle rend compte du cours de développement de la culture considérée. Celui-ci reflète l'interaction de la population bactérienne en voie de croissance et du milieu.

4.2.2 Facteurs influençant la croissance

4.2.2.1 Facteurs physico-chimiques

Tableau I: Facteurs physico-chimiques influençant la croissance.

Paramètres	Comportement	Microorganismes représentatifs
<div style="border: 1px solid blue; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 10px;"> Vue d'ensemble </div> <p>disponibilité en eau (Aw), pH, température.</p>	<p>Solutés et activité de l'eau Osmotolérant</p> <p>Halophile</p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Saccharomyces rouxii</i></p> <p><i>Halobacterium</i>, <i>Dunaliella</i>, <i>Ectothiorhodospira</i></p>
<p>pH Acidophile Neutrophile Alcalophile</p>	<p>Croissance optimale aux pH 0-5,5</p> <p>Croissance optimale aux pH 5,5-8</p> <p>Croissance optimale aux pH 8-11,5</p>	<p><i>Sulfolobus</i>, <i>Picrophilus</i>, <i>Ferroplasma coli</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Euglena</i>, <i>Paramecium</i>, <i>Bacillus alcalophilus</i>, <i>Natronobacterium</i></p>
<p>Température Psychrophile Psychotrophe Mésophile Thermophile Hyperthermophile</p>	<p>Se développe bien à 0°C, température optimale <15°C</p> <p>Peut se développer à 0-7°C, température optimale 20-30°C, et maximale 35°C</p> <p>Température optimale 20-45°C</p> <p>Peut se développer à 55°C et même plus, température optimale souvent entre 55-65°C</p> <p>Température optimale de croissance de 80°C</p>	<p><i>Bacillus psychrophilus</i>, <i>Chlamydomonas nivalis</i>, <i>Methanogenium</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Pseudomonas fluorescens</i></p> <p><i>Escherichia coli</i>, <i>Neisseria gonorrhoeae</i>, <i>Trichomonas vaginalis</i>, <i>Bacillus stearothermophilus</i>, <i>Thermus aquaticus</i>, <i>Cyanidium</i></p>

4.2.2.1.1. *La température:*

D'une manière générale, une bactérie donnée exige pour sa croissance optimum une température déterminée au-dessus et en dessous de laquelle sa multiplication est ralentie puis s'arrête.

Ces limites sont appelées température maximum et minimum de croissance ; elles varient de façon plus ou moins étroites. La température maximum est généralement proche de la température optimum.

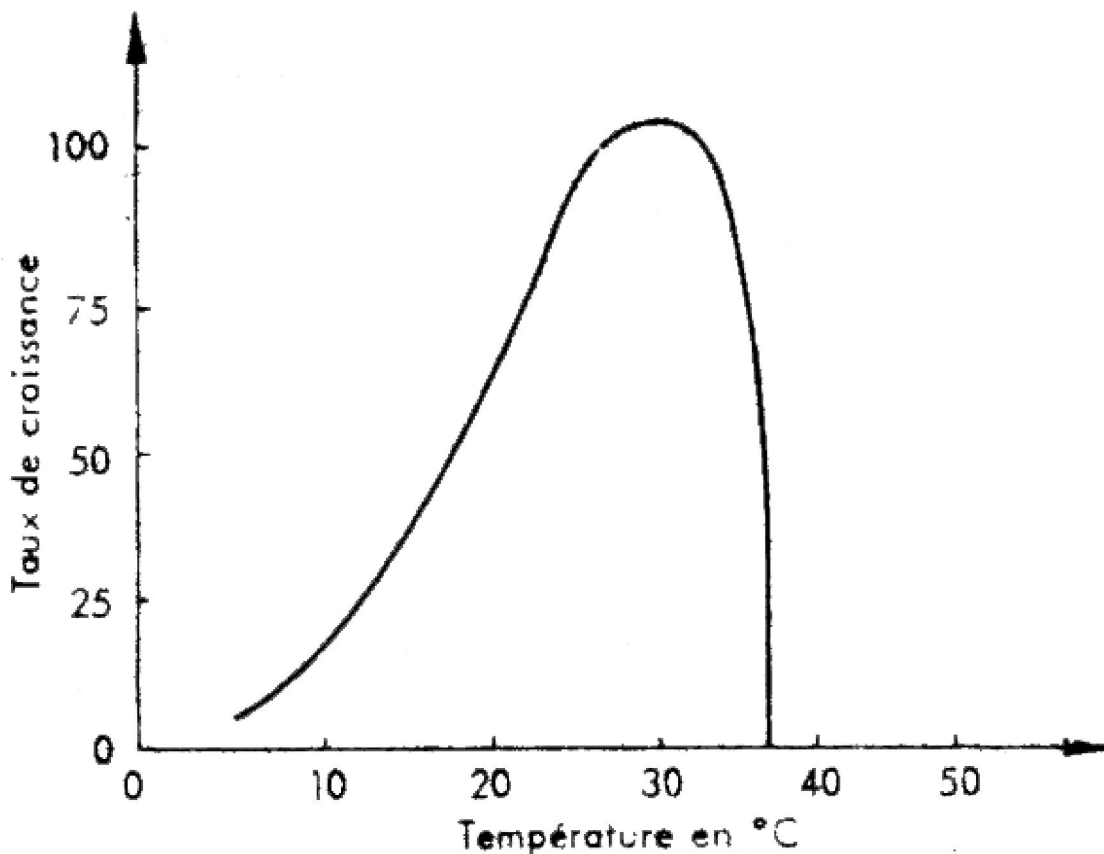


Figure 2: influence de la température sur le taux de croissance d'une souche bactérienne mésophile. Taux exprimé en pourcentage du taux maximum

En fonction des limites de température entre lesquels prolifèrent les micro-organismes on en distingue trois groupes (tableau II).

[Tapez un texte]

Tableau II - Classification des microorganismes en fonction de leur température de développement

Microorganismes	Température de développement en °C		
	Minimum	Optimum	Maximum
Psychrophiles	- 5	+ 5 à + 10	+ 20
Mésophiles	+ 10	+ 30 à + 40	+ 45
Thermophiles	+ 40	+ 50 à + 60	+ 75

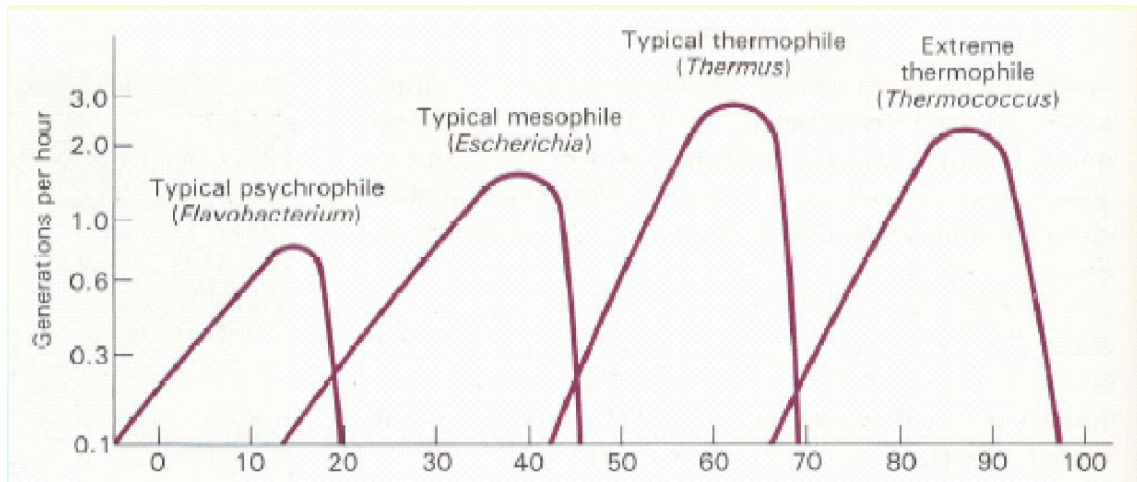


Figure 3 : influence de la température sur la croissance de quelques bactéries.

4.2.2.1.2. Le pH:

Les pH optima sont proches de la neutralité. La tolérance aux variations de pH sont très variables suivant les bactéries. Le tableau III représente la classification des bactéries en fonction de leur pH avec quelques exemples.

Tableau III : classification des bactéries en fonction du pH du milieu.

pH		
Acidophile	Croissance optimale aux pH 0-5,5	<i>Sulfolobus, Picrophilus, Ferroplasma</i>
Neutrophile	Croissance optimale aux pH 5,5-8	<i>Escherichia coli, Euglena, Paramecium</i>
Alcalophile	Croissance optimale aux pH 8-11,5	<i>Bacillus, alcalophilus, Natronobacterium</i>

.2.2.1.3 Pression osmotique :

Grâce à leur paroi les bactéries sont relativement tolérantes aux variations de pression osmotique. Toutefois des concentrations élevées de NaCl ou de sucre inhibent la croissance bactérienne.

.2.2.1.4 Oxygène :

Les bactéries se divisent en plusieurs catégories selon leur relation avec l'oxygène atmosphérique :

- les bactéries aérobies strictes ne cultivent qu'en présence d'oxygène ;
- les anaérobies strictes ne cultivent qu'en l'absence d'oxygène (ce qui nécessite des conditions de culture spécifiques) ;
- les aérobies-anaérobies facultatives cultivent en présence ou en l'absence d'oxygène. Ce sont les plus fréquentes en pathologie ;
- une dernière catégorie qui est constituée par les bactéries microaérophiles qui ne cultivent que sous faible pression d'oxygène.

4.2.3 Suivi de la croissance bactérienne

4.2.3.1 Dénombrement des populations bactériennes

L'estimation régulière du nombre de bactéries rapporté au volume de culture c'est-à-dire de la densité de population bactérienne (exprimé en nombre de cellules par ml), permet de suivre le développement des populations bactériennes.

4.2.3.1.1 Dénombrement sur boîtes de pétri

Parmi les techniques directes, le dénombrement sur boîtes de pétri constitue sans aucun doute la méthode la plus classique. Cette technique permet la mesure de densités de population comprises entre 10^1 et 10^8 - 10^9 cellules /ml ou cellules /g de produit. Le principe repose sur l'hypothèse qu'une cellule viable déposée sur le gel nutritif de la boîte se divise jusqu'à l'obtention d'un amas de cellules issues de cette seule cellule mère : une colonie.

En conséquence, le dénombrement des colonies revient au dénombrement des cellules ou groupes de cellules déposés et viables (unités formant colonie ou UFC) à condition que la dilution de la solution ne conduise à aucun chevauchement des colonies (confluence). La méthode est très simple mais peut être coûteuse en temps et en matériel et peut conduire à l'obtention de cinétiques constituées d'un nombre limité de points expérimentaux.

4.2.3.1.2 Comptages au microscope

Les cellules présentes dans un échantillon liquide peuvent également être dénombrées en microscopie en utilisant du matériel adapté. Un quadrillage gravé à la surface d'une lame en verre (cellule de Neubauer) permet de compter les cellules dans un volume connu d'échantillon.

Les techniques d'épifluorescence fondées sur l'utilisation de fluorochromes permettent un comptage direct plus spécifique en microscopie.

Principe :

- Après filtration sous vide d'une suspension bactérienne, toutes les bactéries sont retenues sur une membrane filtrante plane microporeuse en polycarbonate.

La taille des pores de cette membrane est très régulière et les pores se situent tous dans un même plan. Il est donc possible de dénombrer au microscope toutes les bactéries retenues, car celles-ci se trouvent toutes sur le même plan focal.

- La membrane est ensuite colorée par un fluorochrome, l'acridine orange, puis observée au microscope à épifluorescence. L'acridine orange colorée à 450nm émet une lumière dont la longueur d'onde dépend de la structure secondaire de l'acide nucléique sur lequel il est fixé.

4.2.3.1.3 Comptages en flux

Le comptage en flux peut être automatisé par la détection des cellules individuelles entraînées par un flux liquide.

Le compteur de Coulter (*Coulter Count*), système de comptage automatisé de particules au cours de l'aspiration d'un échantillon liquide, existe depuis 1956. La détection des cellules repose sur les changements brutaux de conductivité lors de leur passage dans un orifice.

La cytométrie de flux est un système similaire fondé sur l'émission ou la diffusion de photons par les cellules lors de leur passage devant un faisceau laser.

4.2.3.1.4 Apports de la biologie moléculaire

Le développement récent de la biologie moléculaire apporte des outils pour améliorer la spécificité de toutes ces méthodes de dénombrement.

4.2.3.2 Estimation des densités de biomasse

Au lieu de dénombrer les bactéries, il est possible d'estimer la biomasse (masse bactérienne) par unité de volume, c'est-à-dire la densité bactérienne.

La pesée de la masse sèche est peu sensible, peu reproductible, et, par la suite, peu utilisée. Mais il existe des méthodes rapides d'estimation de la densité bactérienne.

La turbidimétrie permet de suivre l'évolution de la densité optique, reliée à la densité bactérienne par la loi de Beer-Lambert. Le suivi de l'évolution de la population bactérienne se fait en mesurant l'absorbance du milieu de culture grâce à un spectrophotomètre.

a) Principe:

L'absorption de la lumière par une solution obéit à une loi exponentielle. Cela signifie que chaque molécule contenue dans la solution capte non pas la même quantité absolue de lumière, mais la même proportion par rapport à la lumière incidente. Par exemple, si 1 cm de solution traversée absorbe 50% de la lumière incidente, le centimètre suivant en absorbera 50% des 50% restants et ainsi de suite. Il en découle une relation exponentielle entre la quantité de substance absorbant la lumière et la quantité de lumière absorbée. La quantité de substance absorbante dépend de l'épaisseur de la solution traversée et de la concentration. Si on choisit une épaisseur constante (cuve de 1 cm d'épaisseur pour la plupart des spectrophotomètres), la quantité de lumière ne dépend plus que de la concentration.

[Tapez un texte]

La loi de Beer-Lambert exprime cette relation à travers la formule suivante :

$$I = I_0 \cdot 10^{-KcL}$$

Où I_0 = intensité de la lumière incidente ; I = lumière transmise ; L = épaisseur traversée (soit souvent 1 cm) ; K = constante caractéristique de la substance et c = concentration en substance.

On peut la transformer en $\log(I/I_0) = -K.c$ où $\log(I/I_0)$ est appelée absorbance ou densité optique, qu'il suffit de mesurer pour en déduire la concentration c connaissant K .

Les spectrophotomètres permettent de mesurer directement la valeur d'absorbance en lumière incidente monochromatique.

4.2.4 Cinétique de la croissance

L'étude des cinétiques est une branche de la science consacrée aux évolutions au cours du temps et aux mécanismes de procédés physiques, chimiques ou biologiques. En microbiologie, Buchanan(12) a étudié la croissance d'une population bactérienne en milieu non renouvelé (batch) et a établi un schéma standard ; mais Panikov (45) déplore que l'étude de la cinétique de la croissance se limite à un enregistrement « passif » de la croissance alors qu'au contraire elle devrait selon lui percevoir les différents phénomènes physiologiques(la croissance bien sûr ,mais aussi la survie , les adaptations , les mutations , les cycles cellulaires , les interactions avec l'environnement et d'autres organismes) et les mécanismes sous-jacents au travers de mesures expérimentales et de modélisation mathématique.

4.2.4.1 Schéma de la croissance

Une des premières observations biométriques de la croissance est due au bactériologiste anglais Ward qui fut le premier, en 1895, à représenter des données expérimentales de croissance sous forme graphique. Il introduisit le concept de temps de génération (temps mis par la population pour doubler) et identifia deux groupes de facteurs influant sur le temps de génération: les facteurs internes (l'âge du filament, la viabilité, pouvoir de germination des spores) et les facteurs externes (température, luminosité, quantité de nutriments). La même année en Allemagne, Muller établit l'existence de la phase de latence dans le développement des cultures bactériennes et distingua la phase de croissance exponentielle et la décélération. Buchanan (12) a décomposé la cinétique de croissance d'une population bactérienne en sept phases selon un schéma aujourd'hui classique. La figure (6) reproduit le dessin historique de Buchanan, où chaque point représente l'intersection entre une courbe et un segment, c'est-à-dire la transition entre deux phases. Bien que datant de 1919, cette reproduction est très proche des schémas actuels de courbes de croissance.

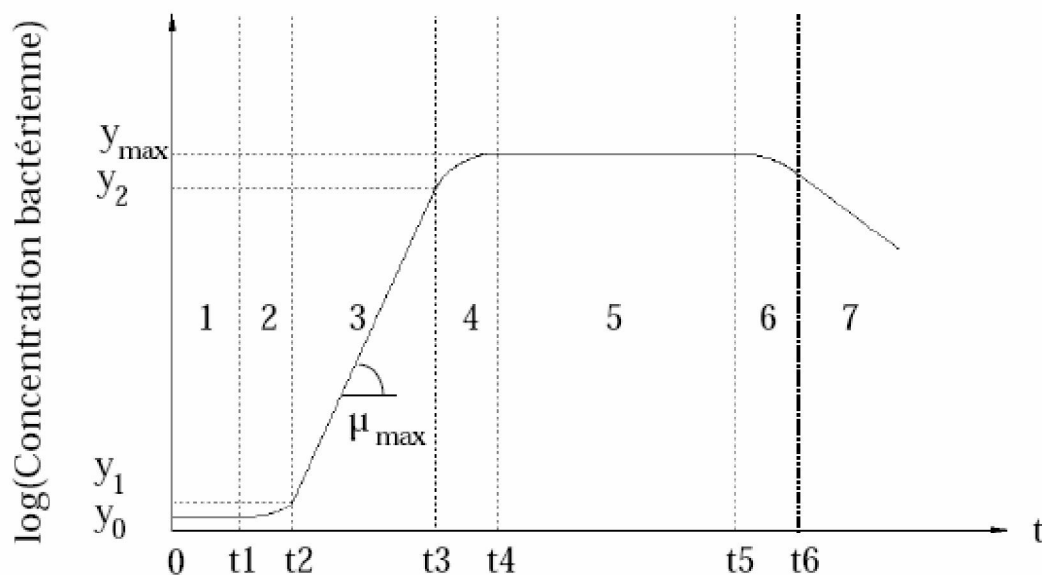


Figure 4 : différentes phases de la croissance en milieu liquide décrites par Buchanan(15)

Sont reproduites ci-dessous les descriptions des sept phases par Buchanan, dans une traduction littérale. Même si le vocabulaire peut sembler inadapté, cette décomposition est encore d'actualité.

1. **Phase stationnaire initiale.** Durant cette phase, le nombre de bactéries reste constant et le tracé est une ligne droite parallèle à l'axe des x. [Encore appelée phase de latence, elle correspond à une phase de transition entre un état physiologique initial et un état de croissance à proprement parler (phase d'adaptation au nouvel environnement)].

2. **Phase d'accélération positive de la croissance.** Durant cette phase, le taux de croissance par organisme augmente avec le temps. Cette augmentation du taux de croissance par organisme ne continue pas indéfiniment mais seulement jusqu'à un certain point déterminé par le temps de génération minimal moyen dans les conditions de l'expérience.

3. **Phase de croissance logarithmique¹.** Dans cette phase, le taux de croissance par organisme reste constant, en d'autres termes, le temps de génération moyen est maintenu à son minimum tout au long de cette période.

[Cette phase est considérée en première approximation comme purement exponentielle. La pente de la droite (lorsque la concentration bactérienne est exprimée en coordonnées semi-logarithmique) correspond à la vitesse (ou taux) de croissance maximal μ_{\max} (h^{-1})].

$$\mu_{\max} = \frac{K_2 - K_1}{t_2 - t_1} \quad [1]$$

4. **Phase d'accélération négative de la croissance.** Durant cette phase, le taux de croissance par organisme décroît, c'est-à-dire que le temps de génération moyen augmente. Le nombre de bactéries continue à augmenter mais moins rapidement que durant la phase de croissance logarithmique. [Cette phase de freinage semble intervenir au fur et à mesure que le substrat s'épuise ou que les produits toxiques issus du métabolisme bactérien s'accumulent].

5. **Phase stationnaire maximale.** Durant cette période, il n'y a aucune augmentation du nombre de bactéries. Le taux de croissance par organisme est nul et le temps de génération moyen infini.

6. **Phase de mort accélérée.** Durant cette période, le nombre de bactéries décroît, d'abord lentement puis de plus en plus vite, jusqu'à établissement d'une phase de mortalité logarithmique. Le taux de mortalité par organisme augmente jusqu'à un certain maximum.

7. **Phase de mortalité logarithmique².** Durant cette phase, le taux de mortalité par organisme reste constant. Cette phase de décroissance exponentielle apparaît lorsque le milieu devient fortement défavorable à la multiplication des cellules bactériennes.

D'après Buchanan (1919)

Cette représentation est très schématique et de telles courbes de croissance sont rarement obtenues en pratique. L'interprétation d'une courbe de croissance nécessite en fait une étude plus approfondie de chacune de ces phases, ce qui a fait l'objet de nombreux travaux tout au long du **XX**^{ème} siècle.

4.2.4.2 Champs d'application en microbiologie

Les micro-organismes sont très diversifiés et présents dans tous les biotopes où on les a cherchés. Ainsi, la microbiologie est une discipline très large, regroupant de nombreuses spécialités, et qui entretient des relations étroites avec d'autres disciplines biologiques fondamentales comme l'écologie, la biochimie, la génétique, la biologie moléculaire etc..., ou plus appliquée comme la médecine, l'agriculture, les sciences alimentaires, etc.

Les procédés de culture bactérienne occupent une place centrale dans toutes ces disciplines. L'importance de la modélisation de la croissance bactérienne et, plus généralement de la biométrie en bactériologie est ici présentée pour les différents champs d'application de la microbiologie.

4.2.4.2.1 *Microbiologie alimentaire*

De nombreux procédés de production d'aliments impliquent l'introduction de micro-organismes utiles (flore technologique). C'est le cas de tous les aliments traditionnels dont la fabrication repose sur une fermentation lactique (yaourt), alcoolique (boissons alcoolisées)... De plus, certains micro-organismes peuvent altérer le produit (flore de détérioration). Enfin, un aliment peut être contaminé par des micro-organismes dangereux pour la santé du consommateur (flore pathogène).

En bactériologie alimentaire le *batch* c'est-à-dire l'étude des cinétiques en milieu liquide non renouvelé est le modèle de choix pour étudier la croissance d'une de ces flores dans un aliment, ce qui correspond au fait que des conditions limitantes en substrat ne sont que très tardivement atteintes dans un aliment.

Au début des années 1980, l'utilisation des outils biométriques en microbiologie alimentaire (plus particulièrement en hygiène et en sécurité alimentaire) a connu un nouvel essor. Il s'agissait de construire un modèle de description de l'évolution d'une population bactérienne, pour ensuite réaliser des prédictions de ce développement dans de nouvelles conditions environnementales **(38)**. En 1983 Roberts & Jarvis ont qualifié cette démarche de microbiologie prédictive ou prévisionnelle (*predictive microbiology*). Le principe à la base de la microbiologie prévisionnelle est la prédiction de l'évolution d'une population bactérienne dans des conditions environnementales données à partir d'observations passées **(48)**. Il est alors envisageable de prédire l'évolution d'une flore pathogène dans un aliment.

4.2.4.2.2 Microbiologie industrielle

La microbiologie alimentaire a été ci-dessus réduite au contrôle de l'hygiène et de la sécurité alimentaire. C'est oublier tout ce qui concerne les biotechnologies alimentaires, qu'on peut rattacher à l'ensemble plus large de microbiologie industrielle. Le *batch* est le procédé de culture le plus simple. Quoique d'autres procédés industriels aient été développés, il reste le procédé le plus courant, surtout dans des systèmes artisanaux.

4.2.4.2.3 Microbiologie médicale

En médecine humaine et vétérinaire le procédé de culture en *batch* a été utilisé pour étudier les écosystèmes naturels des mammifères (flore nasale, cutanée, buccale, intestinale, vaginale etc.). Notons que le *batch* permet ainsi de reconstituer la colonisation par une population bactérienne d'un milieu riche en substrat et initialement axénique, tandis que le chémostat est plutôt utilisé pour simuler la survie d'une population bactérienne dans des conditions limitantes en substrat.

Ceci explique l'utilisation ponctuelle du procédé de culture en *batch* qui serait moins adapté que le chémostat à reconstituer des phénomènes physiologiques.

En revanche, en bactériologie diagnostique, la plus grande majorité des tests en milieux liquides peuvent être assimilés à des cultures en *batch*.

Des techniques d'antibiogramme automatisé utilisées en microbiologie médicale notamment la technique Vitek sont basées sur la comparaison de courbes de croissance en présence de différentes concentrations d'antibiotique à une courbe témoin sans antibiotique. Cette comparaison est en fait réalisée sur les taux de croissance estimés à partir des cinétiques **(22)**. Un des enjeux de ces techniques étant la rapidité de réponse, la problématique de prédiction des

paramètres de croissance à partir des premiers points de la cinétique expérimentale apparaît donc clairement.

4.2.5 Classification des modèles de croissance

4.2.5.1 *Modèles primaires de croissance*

Encore appelés modèles dynamiques, ils décrivent l'évolution de la densité bactérienne en fonction du temps.

Ces modèles peuvent être utilisés pour des données issues d'un dénombrement (et donc exprimées en termes de population) ou de mesures turbidimétriques (et donc exprimées en termes de densité et de biomasse). Par souci d'homogénéité, tous les modèles seront exprimés pour l'ensemble du document en se plaçant dans le cas d'un suivi de la densité de population (exprimée en ufc/ml) notée N .

Toutefois, il est évident que ces modèles existent également en se plaçant dans le cas d'un suivi de la densité de biomasse (exprimée en g/l) notée x .

Les modèles primaires usuels ont la forme :

$$N(t) = f(\mathbf{p}, t) + \epsilon_t \quad [2]$$

Avec $N(t)$: densité de population bactérienne (ufc/ml) ; t : temps (h) ; \mathbf{p} : vecteurs des paramètres de croissance et ϵ_t : erreur associée à l'observation $N(t)$.

Cette présentation se limite aux modèles primaires de croissance (c'est-à-dire en excluant les modèles de dynamique de décroissance prenant en compte les phases 6 et 7 de Buchanan).

4.2.5.1.1 Modèles de Buchanan(12)

Outre sa décomposition de la courbe de croissance en sept phases, Buchanan (1919) a proposé une approche modélisatrice, qui semble annoncer tous les modèles par la suite au cours du XX ème siècle.

Buchanan (1919) définit une équation générale

$$b = Be^{\mu t} \quad [3]$$

Avec b : nombre de bactéries, B : nombre initial de bactéries ; μ : coefficient variable d'une phase à l'autre ; k : constante ; t : temps.

Pour chaque phase, Buchanan propose une équation avec son paramètre μ (à ne pas confondre avec le taux de croissance, généralement symbolisé par la même lettre grecque).

<i>Phase de croissance</i>	<i>équation</i>
<i>Phase stationnaire initiale.</i>	$\mu=0$
<i>Phase d'accélération positive de la croissance.</i>	$\mu=t^{n-1}$
<i>Phase de croissance logarithmique.</i>	$\mu=1$
<i>Phase d'accélération négative de la croissance.</i>	$\mu=t^{-n-1}$
<i>Phase stationnaire maximale.</i>	$\mu=0$

Par rapport aux notations usuelles, on reconnaît la densité de population b , habituellement notée $N(t)$; la densité initiale B , habituellement notée N_0 et un taux de croissance instantané (μk) qui varie entre 0 et le taux de croissance maximum k , habituellement noté μ_{\max} .

4.2.5.1.2 *Modèles exponentiels*

Le modèle de dynamique de croissance le plus simple est le modèle exponentiel [4] classiquement utilisé par les microbiologistes pour mesurer le taux de croissance d'une culture microbienne. C'est une approximation couramment acceptée pour la phase 3. Toutefois le choix des points expérimentaux à prendre en considération (c'est-à-dire l'élimination des points des phases 1, 2, 4 et 5) est souvent subjectif.

$$N(t) = N_0 e^{\mu_{\max} t} \quad [4]$$

Avec N_0 : population bactérienne initiale (ufc/ml) et μ_{\max} : taux de croissance maximal (h^{-1})

Il est impossible d'ajouter une latence à ce modèle exponentiel pour décrire les phases 1 et 3 (sans transition, c'est-à-dire sans phase 2).

$$N(t) = N_0 + t \quad \text{si } t < \text{lag}$$

$$N(t) = N_0 e^{\mu_{\max}(t - \text{lag})} + t \quad \text{si } t \geq \text{lag} \quad [5]$$

Il est courant d'utiliser la transformation logarithmique de ces modèles. Cela répond à une demande de simplification (le modèle linéaire étant mieux maîtrisé dans la communauté scientifique) mais dans le cas des dénombrements sur boîtes de pétri, la justification statistique est pertinente. En effet plus la suspension bactérienne est diluée avant étalement, plus l'erreur associée au dénombrement est élevée. Au cours d'une croissance, cette erreur augmente donc et la transformation logarithmique permet de réduire l'hétéroscédasticité des observations.

Le modèle [4] devient alors :

$$\ln(N(t)) = \ln(N_0) + \mu_{\max} t \quad [6]$$

[Tapez un texte]

Le modèle [5] devient alors :

$$\ln(N(t)) = \ln(N_0) + \mu t \quad \text{si } t < \text{lag}$$

$$\ln(N(t)) = \ln(N_0) + \mu_{\max}(t - \text{lag}) + \mu t \quad \text{si } t \geq \text{lag} \quad [7]$$

4.2.5.1.3 Modèles sigmoïdes

Au début des années 1990, de nombreuses équipes en microbiologie prévisionnelle ont utilisé des modèles décrivant par une sigmoïde (fonction de gompertz ou fonction logistique) la courbe de croissance en coordonnées semi-logarithmiques. Ces fonctions sont dites modifiées car la variable expliquée est le logarithme népérien de la variable d'intérêt. Ces équations ont ensuite été reparamétrées par Zwietering et al. (55).

$$\ln(N(t)) = E + D \exp\{-\exp[-b(t-M)]\} + \mu t \quad [8]$$

Equation de Gompertz modifiée non reparamétrée

$$\ln\left(\frac{N(t)}{N_0}\right) = A \exp\left(-\exp\left(\frac{\mu_{\max}}{A}(lag - t) + 1\right)\right) \quad [9]$$

Equation de Gompertz reparamétrée

$$\ln(N(t)) = E + \frac{D}{1 + \exp\left[\frac{4}{A}(t - M)\right]} + \mu t \quad [10]$$

Equation logistique modifiée non paramétrée

$$\ln\left(\frac{N(t)}{N_0}\right) = \frac{A}{\left(1 + \exp\left(\frac{4\mu_{\max}}{A}(lag - t) + 2\right)\right)} + \mu t \quad [11]$$

Equation logistique modifiée

[Tapez un texte]

Du fait même de la forme de ces modèles, aucune phase exponentielle à proprement parler n'est décrite. Ainsi, le taux de croissance instantané (c'est-à-dire la dérivée du logarithme népérien) n'atteint son maximum qu'au point d'inflexion. Le taux de croissance et le temps de latence estimés par ajustement de ce type de modèle sont par conséquent systématiquement surestimés.

De même qu'il n'y a pas de phase exponentielle sensu stricto, ces modèles ne permettent pas de séparer d'une part l'accélération et d'autre part la décélération. Or il n'y a aucune raison biologique que ces deux phénomènes soient dépendants.

Enfin, ce sont des modèles statistiques décrivant explicitement la croissance bactérienne en conditions constantes.

Ils sont donc inutilisables en conditions dynamiques (avec un profil de changement des conditions environnementales au cours du temps).

4.2.5.1.4 Modèles de Baranyi et de Rosso

Pour ces différentes raisons, une autre famille de modèles de croissance a été construite. Il s'agit de modèles dynamiques, fondés sur une équation différentielle (ou un système d'équations différentielles), de la forme :

$$\frac{1}{N} \frac{dN}{dt} = \mu(t) \quad [12]$$

Avec $\mu(t)$: taux de croissance instantané (h^{-1})

Ainsi, le modèle le plus simple (modèle exponentiel) peut s'écrire:

$$\frac{1}{N} \frac{dN}{dt} = i(t) = i_{\max} \quad [13]$$

Le modèle [13] peut être modifié de façon à décrire de manière continue les phases de croissance (phases 1 à 5) de Buchanan). Ainsi, le taux de croissance peut

[Tapez un texte]

être multiplié par une fonction d'adaptation pour prendre en compte la phase de latence et d'accélération (phase 1 et 2) et /ou par une fonction de freinage pour prendre en compte la décélération de la phase stationnaire (phase 4 et 5).

$$i(t) = i_{\max} a(t) f(N) \quad [14]$$

Avec $a(t)$: fonction d'adaptation et $f(N(t))$: fonction de freinage

Baranyi & Roberts (1994) ont proposé une fonction d'accélération qui est aujourd'hui largement reprise

$$\alpha(t) = \frac{q(t)}{1 + q(t)} \quad [15]$$

La variable $q(t)$ représente l'état physiologique des cellules, supposé suivre une croissance exponentielle.

$$\frac{1}{q} \frac{dq}{dt} = v \quad [16]$$

En conditions constantes, [15] devient:

$$\alpha(t) = \frac{q_0 e^{vt}}{1 + q_0 e^{vt}} \quad [17]$$

Baranyi & Roberts (1994) ont proposé de fixer le paramètre v égal à μ_{\max} . Par la suite, cette fonction $a(t)$ sera utilisée sous le nom d'accélération de Baranyi.

Rosso (1995) a proposé une autre formulation de cette accélération

$$a(t) = \frac{1 - e^{-\mu_{\max} t}}{1 + e^{-\mu_{\max} (t - t_{lag})}} \quad [18]$$

La fonction de décélération largement utilisée est le freinage logistique

$$f(N(t)) = 1 - \frac{N(t)}{N_{\max}} \quad [19]$$

Il serait également envisageable d'utiliser l'équation de Monod.

$$f(S) = \frac{S}{K_s + S} \quad [20]$$

Toutefois, cela nécessite un suivi biochimique de la concentration en substrat. De plus, le concept de « substrat limitant » ne s'applique à l'entrée en phase stationnaire que dans un nombre limité de cas.

En utilisant la fonction d'accélération de baranyi et la fonction de freinage logistique dans l'équation différentielle [14], un modèle de dynamique de croissance peut être intégré formellement. Par la suite, ce modèle de croissance intégré sera utilisé sous le nom de Baranyi.

4.2.5.1.5 Notions de paramètres

L'ajustement d'un modèle de dynamique de croissance à une cinétique consiste donc en l'estimation de 4 paramètres: temps de latence (lag), taux de croissance maximal (μ_{\max}), densité bactérienne de l'inoculum (N_0) et densité bactérienne finale ou capacité maximale (N_{\max}). Par convention, ils sont nommés "paramètres de cinétiques". Parmi ces quatre paramètres seuls deux sont inhérents à la souche étudiée: le temps de latence (lag) et le taux de croissance maximal (μ_{\max}). En effet, la densité bactérienne initiale (N_0) est contrôlée par l'expérimentateur et la densité bactérienne finale dépend de la densité bactérienne initiale. Par convention on nomme "paramètres de croissance" le temps de latence (lag) et le taux de croissance maximal (μ_{\max}).

4.2.5.2 Modèles secondaires

Ces modèles prennent en compte des contraintes environnementales et décrivent l'influence des facteurs environnementaux sur les paramètres de croissance: temps de latence (*lag*), taux de croissance maximal (μ_{\max} ou plus simplement μ).

On peut distinguer les modèles polynomiaux multifactoriels dans lesquels les paramètres n'ont aucune signification biologique ou graphique, les modèles descriptifs utilisant des paramètres ayant un sens biologique ou graphique mais pas de base mécaniste et des modèles mécanistes fondés sur une hypothèse biologique.

IV.3 Microbiologie prédictive

Pendant longtemps, lorsqu'un microbiologiste voulait prédire l'évolution d'une population de micro-organismes dans un milieu donné, il devait réaliser expérimentalement des cinétiques de croissance dans les conditions environnementales correspondant aux caractéristiques physico-chimiques du produit considéré ("challenge test"). Si l'un des facteurs influençant la croissance (température, pH...) était modifié dans le milieu, le microbiologiste n'avait plus qu'à refaire ses expériences dans les nouvelles conditions considérées. Cette démarche était coûteuse, et ne permettait pas une réponse rapide. Des microbiologistes ont montré que l'on pouvait se servir des expériences antérieures pour prédire le comportement de la flore microbienne dans différents milieux (milieux de culture, produits alimentaires...), en étudiant l'influence des principaux facteurs environnementaux sur la cinétique de croissance des micro-organismes (22). C'est ainsi qu'est née une nouvelle discipline en pleine expansion: la *microbiologie prédictive*. Elle consiste à développer des modèles reliant des paramètres de croissance des populations de micro-organismes (principalement le taux de croissance spécifique maximal μ_{\max} et le temps de latence *lag*) aux principaux

facteurs physico-chimiques influençant la croissance (la température, le pH, la teneur en NaCl, l'activité de l'eau...). Ces modèles sont ensuite utilisés pour prédire l'évolution d'une flore microbienne à partir des caractéristiques physico-chimiques du milieu considéré.

Principalement deux types de modèles sont actuellement développés:

- Des modèles simples purement descriptifs basés sur le modèle de Ratowsky(1982), appelé encore *modèle de la racine carrée*
- Des modèles polynomiaux **(27)**

Le modèle de la racine carrée a été initialement proposé pour décrire l'évolution du taux de croissance spécifique maximal en fonction de la température. Puis des variantes du modèle prenant en compte d'autres facteurs (le pH et l'activité de l'eau) ont été développés **(1 ; 38)**. Les modèles polynomiaux ont dès le départ été proposés pour décrire chaque paramètre de la croissance par une fonction polynomiale, de faible degré de plusieurs facteurs (la température, le pH et la teneur en NaCl) **(27)**.

La microbiologie prédictive est une discipline prometteuse, qui a donné des résultats très intéressants. Mais il apparaît que la capacité prédictive des modèles développés peut parfois être limitée, et que ceux-ci doivent être utilisés avec prudence. Il semble en effet que l'augmentation du nombre de facteurs expérimentaux pris en compte tende à détériorer la capacité prédictive des modèles. Face à ce problème une approche complémentaire à l'approche classique de la microbiologie prédictive, qui vise aussi à accélérer et à minimiser le coût de la prise de décision a été proposée **(20)** ; il s'agit du développement des méthodes permettant de prédire la cinétique de croissance d'une population microbienne à partir des premiers points de la courbe expérimentale.

Les champs d'application de telles méthodes sont : le secteur agro-alimentaire où elles permettent non seulement de prédire l'évolution des flores contaminantes mais aussi d'optimiser le suivi des flores utiles lors des processus de fermentation.

La microbiologie médicale où certaines techniques d'antibiogramme automatisé basées sur la comparaison de courbes de croissance en présence de différentes concentrations d'antibiotique à une courbe témoin sans antibiotique, sont optimisés par la prédiction des paramètres de croissance à partir des premiers points de la cinétique expérimentale en réduisant le délai de réponse.

Notre étude constitue un autre champ d'application où ces méthodes vont permettre de prédire la durée de conservation de trois bactéries exigeantes (*S.peumoniae*, *H.influenzae*, *M.catarrhalis*).

IV.4 Limites de la modélisation

La méthode classique de prédiction d'une cinétique à partir de ces premiers points expérimentaux consiste à utiliser un modèle de croissance du type de ceux proposés au paragraphe 1.6. En ajustant le modèle choisi sur les points expérimentaux disponibles, on obtient une estimation des paramètres, ce qui permet la prédiction par le modèle de la cinétique complète. Cette démarche simple présente néanmoins un certain nombre de difficultés.

- La première difficulté apparaît dans la modélisation de données d'origine diverses. Même si l'on dispose de modèles décrivant correctement la croissance d'une population de micro-organismes, ceux-ci ne sont pas directement utilisables sur tous les types de données. Par exemple, lorsqu'on utilise une méthode indirecte de dénombrement

microbien (turbidimétrie), à modélisation des cinétiques obtenues requiert la prise en compte de paramètres liés à l'appareil de mesure, ce qui complique singulièrement le problème.

- Pour pouvoir être utilisé en prédiction, le modèle ne doit pas seulement décrire la tendance générale observée sur les données traitées, mais ajuster parfaitement les points expérimentaux, notamment en début de cinétique. Cet objectif n'est pas facile à atteindre dès lors que l'on travaille sur des données biologiques, ce qui implique une grande diversité des cinétiques observées. La figure 5 donne un exemple de modèle semblant ajuster approximativement la forme de la cinétique, mais ne permettant pas de prédire la fin de la cinétique à partir de ses premiers points.

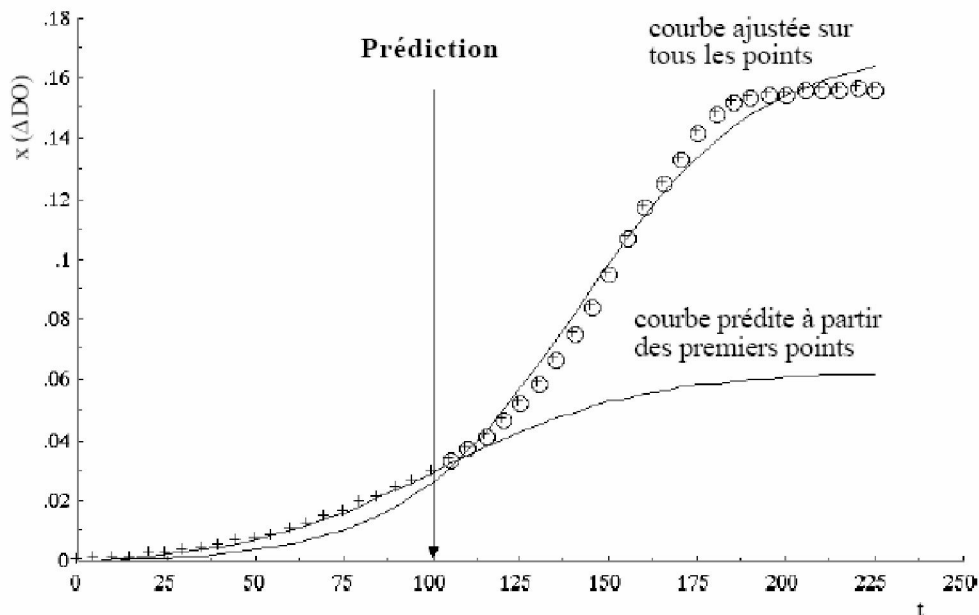


Figure 5 : Exemple de prédiction à partir du temps $t=100$ min d'une cinétique de croissance d'une population de *Klebsiella pneumoniae* par un modèle logistique forcé à l'origine(20).

[Tapez un texte]

- Plus le nombre de points sur lequel on ajuste le modèle est faible, plus l'estimation des paramètres devient sensible aux erreurs de mesure. Ceci constitue un problème fréquemment rencontré en prédiction.

V. ETUDE DE LA REPONSE BACTERIENNE A UNE VARIATION DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

L'objectif de l'étude est de décrire la réponse des populations bactériennes exigeantes à des conditions de congélation, afin de prédire la durée de conservation de ces bactéries.

Dans le cadre de cette étude le modèle empirique utilisé est celui proposé par Breand, décrivant la réponse d'une population bactérienne à une variation des conditions environnementales. Ce modèle a été décrit mathématiquement, évalué, puis validé par son utilisation en prédiction sur plusieurs données.

V.1 Types de variations et facteurs environnementaux

5.1.1 Facteurs environnementaux

Le développement d'une population bactérienne dépend de son environnement. Un environnement est défini par un nombre important de paramètres

- la température
- le pH
- l'activité de l'eau

[Tapez un texte]

- la teneur en oxygène
- La teneur en dioxyde de carbone etc...

La croissance d'une population bactérienne ne peut être observée que dans un environnement qui lui est favorable.

La distinction entre environnement favorable et défavorable est fondée sur la définition, pour chaque paramètre environnemental et chaque souche, d'un intervalle de viabilité sur lequel la croissance de la population est observée.

La borne minimale de cet intervalle est telle qu'en deçà de cette valeur la croissance ne peut être observée; la borne maximale de cet intervalle est telle qu'au-delà de cette valeur la croissance ne peut être observée. Une valeur optimale du paramètre environnemental pour lequel la croissance est la plus rapide est également définie. Ce sont les trois valeurs cardinales caractéristiques du développement d'une population bactérienne.

Les variations de température, de pH ou de l'activité de l'eau sont les plus souvent étudiées, autant en microbiologie alimentaire qu'en microbiologie médicale. La variation étudiée était la baisse de température.

5.1.2 Classification des variations

Le stress est défini comme la réponse d'une population bactérienne à un environnement défavorable à la croissance.

La classification retenue est celle proposée par Breand. Les différentes variations peuvent donc être classées selon la forme du signal. Deux catégories ont été définies :

- le signal en marche d'escalier

[Tapez un texte]

- le signal carré

Lorsque le paramètre environnemental étudié passe brutalement d'une valeur appartenant à l'intervalle de viabilité à une valeur stressante extérieure à cet intervalle, la variation est qualifiée de signal en marche d'escalier. Les caractéristiques de ce signal sont les valeurs avant stress et de stress.

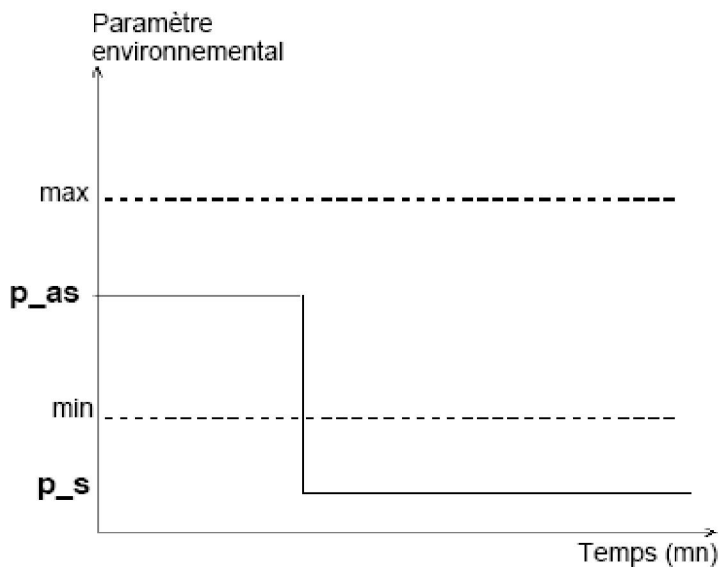


Figure 6 : signal en marche d'escalier (10).

Lorsque la valeur du paramètre environnemental passe brutalement d'une valeur viable à une valeur non viable et reste à cette valeur pendant une durée dite durée de stress, avant de retourner à une valeur viable, la variation est qualifiée de signal carré. Les caractéristiques de ce signal sont : la durée de stress la valeur du paramètre pendant la durée de stress, les valeurs du paramètre avant et après stress.

[Tapez un texte]

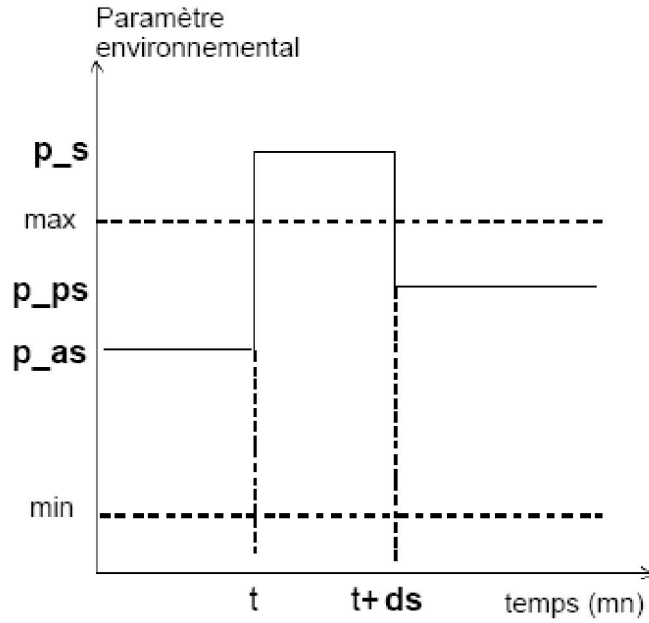


Figure 7 : signal carré (10).

Le profil le plus approprié pour notre étude est le signal en marche d'escalier; l'objectif étant de conserver le maximum de bactéries pendant un maximum de temps à une température de congélation donnée (-20°C ; -80).

Réponse de la population bactérienne

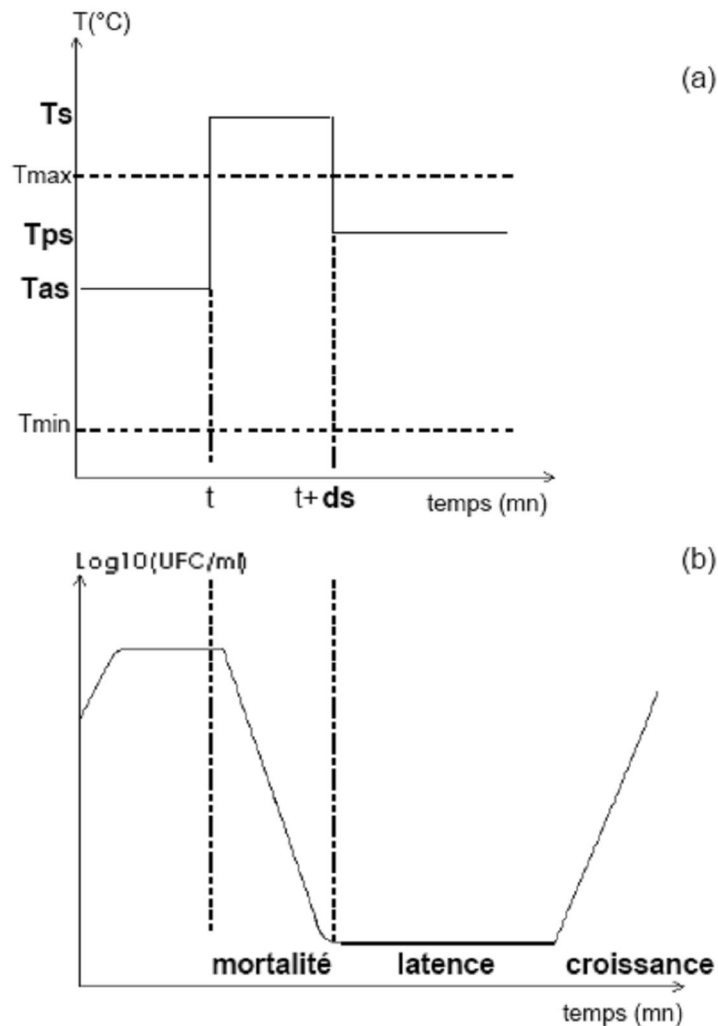


Figure 8: réponse d'une population bactérienne(b) à une hausse de la température suivant un signal carré(a) (10).

La mortalité et le temps de latence dépendent de :

- la température avant stress \bar{T}_{as} ,
- la température de stress \bar{T}_s .

Le temps de latence à la recroissance ou de la décroissance (selon les cas) dépend de :

- la température post stress \bar{T}_{ps} ,
- de la durée de stress ds .

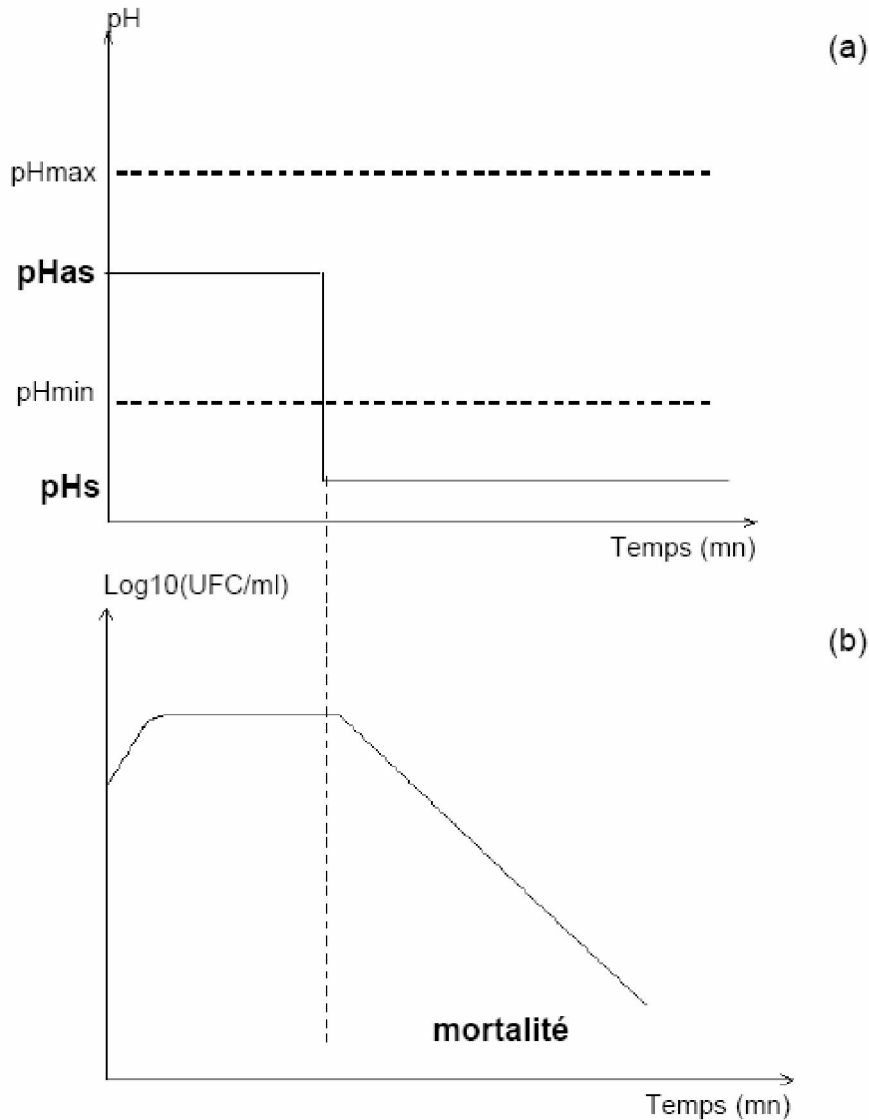


Figure 9 : réponse d'une population bactérienne (b) à une baisse de pH suivant un signal en marche d'escalier (10).

Le pH diminuant brutalement pour atteindre une valeur extérieure à l'intervalle de viabilité (FIG. 9(a)), pH_s , la population bactérienne initie une phase de mortalité (FIG. 9(b)) qui dépend de l'amplitude de la baisse de pH, de la valeur du pH préalable à la baisse, pH_s , de l'acide utilisé pour acidifier le milieu.

[Tapez un texte]

Dans le cas d'une baisse de température on note une mortalité progressive sans recroissance ; cette mortalité dépend de l'amplitude de la baisse de température. On peut en déduire que le signal correspondant à une baisse de température est un signal carré.

VI. DESCRIPTION DE LA MORTALITE

Lorsqu'à la suite d'une variation d'une condition environnementale, une population bactérienne se trouve dans un environnement non viable, la décroissance de son effectif est observée. La courbe de survie est alors obtenue en représentant le logarithme du nombre de survivants en fonction du temps d'exposition à l'environnement non viable, la durée de stress.

VI.1 Les courbes de survie linéaire

6.1.1 Théorie de la cible unique

La théorie de la cible unique est la plus fréquemment citée pour expliquer le processus de décroissance de la population bactérienne selon une courbe de survie linéaire. Selon cette théorie il y a mort d'une bactérie dès qu'une cible de cette bactérie est affectée par le traitement. Par ailleurs dans le cadre de la théorie de la cible unique il est supposé que toutes les bactéries de la population ont la même sensibilité au traitement appliqué.

6.1.2 Descripteurs de la mortalité

Selon la théorie de la cible unique le nombre de bactéries survivantes à la date $t+dt$ peut être calculé en connaissant le nombre $N(t)$ de bactéries survivantes à la date t et la probabilité k qu'une bactérie soit détruite par unité de temps.

$$N(t - dt) = N(t) + kN(t)dt \Leftrightarrow \frac{N(t - dt) - N(t)}{N(t)dt} = -k \quad [21]$$

Les deux hypothèses à la base de la théorie de la cible unique sont en effet:

- l'égalité de la probabilité de destruction, k , pour toutes les bactéries de la population.
- le caractère markovien (c'est-à-dire sans mémoire) du processus de mortalité, c'est-à-dire que la connaissance de l'effectif à l'instant t suffit pour déterminer l'effectif à l'instant $t+dt$, le caractère markovien du processus de mortalité provient de l'hypothèse déterministe d'indépendance entre le taux de mortalité, k , (fig11) et le temps d'exposition à la condition environnementale non viable et entre le taux de mortalité et la concentration bactérienne.

La théorie de la cible unique aboutit ainsi à l'hypothèse d'une courbe de survie linéaire de pente égale au taux de mortalité (fig10)

$$\text{Log}_{10} N(t) = \text{Log}_{10} N_0 - kt \quad [22]$$

[Tapez un texte]

Avec N_0 la taille de l'inoculum, $N(t)$ le nombre de survivants au bout du temps t d'exposition et k le taux de mortalité

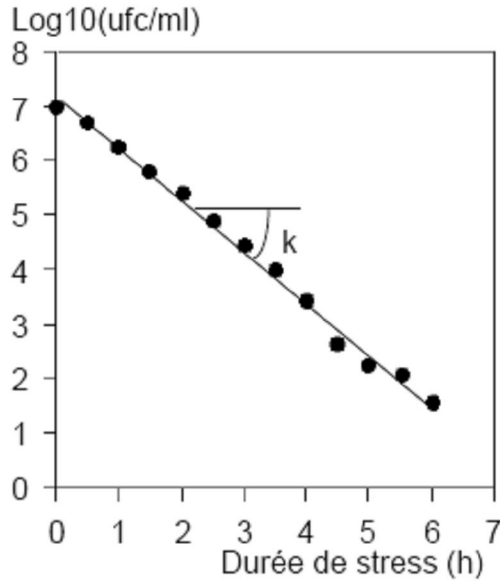


Figure 10 : courbe de survie linéaire observée par Rahn(1945). K est le taux de mortalité(10).

VI.2 Les courbes de survie non linéaires

Le profil linéaire n'est pas la règle

En réalité, des courbes de survie non linéaires ont toujours été observées

Principalement trois types de déviation de la courbe de survie linéaire ont été observés :

- Convexité,
- Concavité,
- Forme sigmoïde.

[Tapez un texte]

Jusqu'à présent aucune théorie satisfaisante pour l'ensemble des microbiologistes n'a été proposée pour expliquer les différents profils des courbes de survie. Les deux hypothèses les plus souvent citées dans la littérature sont :

- La nécessité de détruire plusieurs cibles cellulaires avant que la mort d'un microorganisme n'intervienne; cette hypothèse pourrait expliquer en partie l'existence de courbes convexes,

- L'hétérogénéité de la population bactérienne dans sa résistance à la variation d'une des conditions environnementales; cette hypothèse expliquerait en partie l'existence de courbes concaves.

Modélisation des courbes de survies non linéaires

La principale source d'inspiration pour la construction de modèles de courbe de survie sigmoïde est la modélisation des phases 1 à 5 de la cinétique de croissance. En effet lorsque seules ces phases sont considérées la cinétique de croissance est sigmoïde.

D'un point de vue mathématique, la différence entre la croissance et la décroissance est le signe du taux d'évolution de la population. IL est positif et noté μ pour la croissance. Il est négatif et noté λ pour la décroissance. Ainsi de nombreux auteurs ont construit leur modèle de décroissance simplement en changeant le signe de μ dans la description des phases 1 à 5 de la courbe de croissance.

[Tapez un texte]

- Le modèle modifié de Gompertz

Le modèle de Gompertz modifié **(20)** est couramment utilisé pour modéliser la croissance d'une population exprimée par l'évolution du logarithme du nombre de bactéries en fonction du temps.

$$\ln(N) = \ln(N_0) + A \exp\left(-\exp\left[\frac{k \times e}{A} (\lambda - t) + 1\right]\right)$$

k est le taux de mortalité, A est l'asymptote pour $t \rightarrow \infty$, λ est le temps de latence à la mortalité, N_0 est l'effectif initial.

[23]

La description de courbes de survie convexe ou concave est possible à partir du modèle de Gompertz modifié adapté à la décroissance. En revanche il n'est pas possible de décrire de courbe de survie linéaire.

- Le modèle de croissance de Baranyi **(7)**

Baranyi **(7)** a proposé une alternative à l'utilisation du modèle de

Gompertz. Ce modèle décrit l'évolution du nombre de bactéries:

- En considérant une fonction d'adaptation pour décrire le passage de la phase de latence à la phase de croissance exponentielle,

- En utilisant une fonction de freinage logistique pour décrire le passage de la phase

exponentielle à la phase stationnaire de croissance.

Geeraerd *et al.* se sont inspirés de la démarche de Baranyi **(7)** pour construire un modèle de description d'une courbe de survie sigmoïde :

[Tapez un texte]

$$\frac{dq}{dt} = k \times q$$

$$\frac{dN}{dt} = k \times N \times f(q) \times \left(1 - \frac{N_{\text{résistant}}}{N}\right)$$

k est le taux de mortalité, $N_{\text{résistant}}$ est le nombre de bactéries résistantes au sein de la population initiale, q traduit l'état physiologique initial de l'inoculum, $f(q)$ est une fonction de Michaelis-Menten qui décrit la dégradation de l'aptitude de la population à résister à la hausse de température.

[24]

Modèle exponentiel avec temps de latence

Dans cette étude nous nous sommes particulièrement intéressés à la prédiction du temps de dépassement d'un seuil critique de densité microbienne, le paramètre suivant peut par exemple rendre compte de la durée de conservation des souches; c'est pourquoi nous avons choisi ce modèle qui permet de décrire l'évolution de la densité bactérienne X au cours du temps:

$$\begin{cases} t < lag, x(t) = x_0 \\ t \geq lag, x(t) = x_0 \exp(\mu(t - lag)) \end{cases} \quad [25]$$

Où x_0 représente la densité bactérienne initiale, lag le temps de latence et le taux de mortalité spécifique ici constant. Ce modèle est en général ajusté sur le logarithme en base 10 de la densité bactérienne $X = \log_{10} x$.

$$\begin{cases} t < lag, X(t) = X_0 \\ t \geq lag, X(t) = X_0 + \frac{\mu(t - lag)}{\ln(10)} \end{cases} \quad [26]$$

Le choix de ce modèle a été guidé par un souci de simplicité et de minimisation du nombre de paramètres à ajuster. Lors de la prédiction d'un temps de seuil à partir de quelques mesures précoces de la mortalité bactérienne, l'ajustement de ce modèle aux données nécessite l'estimation de seulement deux paramètres, dès lors que X_0 est fixé et connaissant la valeur de X (valeur du premier point de la courbe

[Tapez un texte]

de croissance correspondant à l'inoculum). A partir des valeurs des paramètres du modèle, le temps T_s de dépassement du seuil de densité microbienne X_s peut être estimé facilement par :

$$T_s = lag + \frac{(X_s - X_0) \ln(10)}{\mu}$$

[27]

[Tapez un texte]

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE



I. METHODOLOGIE

I.1 MATERIEL ET MILIEUX

1.1.1 Matériels

1.1.1.1. Cadre d'étude

Ce travail a été effectué à l'unité de recherche et de biotechnologie microbienne du laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec, entre Octobre 2006 et Août 2007.

1.1.1.2. Souches bactériennes

Nous avons utilisé des souches de référence déjà identifiées et conservées à -80°C :

- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619
- *Haemophilus influenzae* ATCC 49247

Une souche de *Moraxela catarrhalis* URB/CSB/2006/247 isolée d'un produit pathologique et conservée à - 20°C.

1.1.1.3 Matériel pour identification

- Gélose Müller-Hinton (MH)
- Gélose chocolat de base
- Gélose Columbia
- polyvitex

[Tapez un texte]

- Anse de platine
- Boîtes de Pétri
- Sang de cheval lysé
- Sang de mouton
- Jarre d'incubation
- Générateur de CO₂ ou bougie
- Etuve à 37°C
- Autoclave
- Disque d'optochine
- Galerie CSB Streptocoques
- Extrait de levure à 200 µg/ml
- Solution d'hémine (chlorhydrate) à 200 µg/ml
- Galerie API NH

1.1.1.4. Matériel pour l'étude de la croissance

- Tubes à vis stériles
- Embouts stériles
- Micropipettes de 100 µl et 1000 µl
- Bain-marie
- Appareil pour le comptage des colonies muni d'un système d'éclairage sur fond noir
- étaleurs stériles

1.1.1.5 Matériel de conservation des souches

- Cryotubes NUNC®
- Bouillon cœur cervelle
- Glycérol
- Lait écrémé
- Glucose

1.1.2 Milieux :

Les milieux utilisés sont :

- Milieu pour le dénombrement : Gélose au sang cuit +polyvitex
- Milieux de conservation : MGY (Milk, Glucose, Yeast) et BCC (Bouillon cœur cervelle)

1.1.3 Contrôle de stérilité et d'efficacité des milieux :

Chaque lot de milieu préparé est soumis à un contrôle de stérilité et un contrôle d'efficacité sur le plan bactériologique.

- *Milieux liquides*

Un millilitre de chaque milieu préparé est mis dans un tube à hémolyse stérile qui est incubé à l'étuve à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Les milieux sont considérés stériles en l'absence de trouble et de virage de l'indicateur coloré.

[Tapez un texte]

- Milieux solides

Chaque boîte contenant de la gélose préparée est placée à l'étuve à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Les milieux sont considérés stériles en l'absence d'apparition de colonies ou de virage de l'indicateur coloré.

I.2 METHODES :

1.2.1 *Streptococcus pneumoniae*

1.2.1.1 Identification

1.2.1.1.1 Examen macroscopique des colonies:

Les colonies de pneumocoques sont petites, transparentes, rondes et développent une hémolyse de type alpha (α -viridans).

1.2.1.1.2 Examen microscopique:

A partir d'une colonie, on réalise un frottis qui sera coloré au Gram. L'observation microscopique à l'objectif à immersion (x100) montre des cocci Gram positif ayant une forme lancéolée, en flamme de bougie capsulée. Cette morphologie est caractéristique de pneumocoque.

1.2.1.1.3 Test à la catalase :

a) Principe :

La catalase est une enzyme qui décompose le peroxyde d'hydrogène 3% en oxygène gazeux et en eau.

[Tapez un texte]

b) Technique :

Un frottis à partir des colonies isolées a été réalisé. Ensuite quelques gouttes d'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) y sont déposées.

La libération d'oxygène s'est matérialisée par la production de bulles ; la bactérie est alors dite catalase positive.

c) Résultats :

Streptococcus pneumoniae est catalase négative.

1.2.1.1.4 Test à l'oxydase:

a) Principe :

Sous l'action d'une cytochrome-oxydase, le di-méthyl-para-phénylène diamine, incolore, est transformé en une semi-quinone violacée qui s'oxyde rapidement pour donner un composé noirâtre.

b) Technique :

- Réactif (à conserver à + 4°C et à l'obscurité)
 - o Solution aqueuse à 1% de chlorhydrate ou d'oxalate de di-méthyl-para-phénylène diamine dont on imbibera un papier buvard blanc
 - o Ou disques de papier buvard imprégnés de cette substance dans le commerce
- Placer le disque Ox sur une lame porte-objet et l'imbiber avec une goutte d'eau.

Prélever à la pipette boutonnée une parcelle de culture et la poser sur le disque. La présence d'oxydase entraînera une coloration violette.

Streptococcus pneumoniae est oxydase négative.

1.2.1.1.5 Test de lyse par les sels biliaires :

a) Principe :

Les colonies de *Streptococcus pneumoniae* sont « dissoutes » ou lysées en 30 min en présence d'une suspension de bile.

Le rôle de la bile sur les bactéries peut être rapporté à celui des sels de sodium d'acides organiques. Le desoxycholate de sodium à 10% agit comme la bile sur les bactéries.

b) Technique :

Une ou deux gouttes d'une solution de desoxycholate de sodium à 10% sont déposées sur une colonie alpha hémolytique.

La boîte de Pétri a été incubée à l'étuve à 37°C pendant deux heures avec le couvercle légèrement entrouvert pour favoriser l'évaporation du réactif. L'examen de l'endroit où le réactif déposé a été réalisé au bout de deux heures afin de rechercher la présence ou la lyse de colonies présumées de *Streptococcus pneumoniae*. L'hémolyse alpha-viridans demeure mais la colonie disparaît.

NB : La sensibilité à l'optochine et la lyse par les sels biliaires sont spécifiques des pneumocoques.

1.2.1.1.6 Test d'agglutination au latex (Slidex pneumo kit)

a) Principe :

Le Slidex pneumo-Kit est un test d'identification rapide de *S. pneumoniae* par agglutination de particules de latex.

Les antigènes capsulaires sont identifiés en utilisant des particules de latex sensibilisées par des groupes spécifiques d'anticorps anti-pneumocoque. On note la formation d'agrégats visibles lorsque les particules de latex réagissent avec les antigènes. Le latex reste en suspension en cas d'absence d'antigènes.

b) Technique :

Sur deux cercles différents d'une carte d'agglutination, une goutte d'eau physiologique a été déposée. A l'aide d'une anse de platine, quelques colonies prélevées ont été mises en suspension dans l'eau physiologique de manière à obtenir dans chaque cercle une suspension opalescente.

- dans le premier cercle une goutte de latex anti-*S.pneumoniae*(R1) a été déposée, et dans le second cercle une goutte de latex témoin (R2),

- la carte a été soumise à un mouvement rotatif pendant deux minutes au maximum après avoir homogénéisé le contenu de chaque cercle à l'aide de deux bâtonnets différents.

c) Résultats :

Une réaction positive se traduit par une agglutination visible en deux minutes dans le cercle contenant le réactif R1.

1.2.1.1.7 Test de sensibilité à l'optochine

a) Principe

S. pneumoniae est généralement sensible à l'optochine (chlorhydrate d'ethyl hydrocupréine) alors que les autres streptocoques et en particulier les streptocoques non groupables α hémolytiques ne le sont pas.

Ce test est très fiable et d'une grande valeur diagnostique.

b) Technique

Une boîte de gélose au sang est inoculée avec le germe isolé (comme pour la réalisation d'un antibiogramme). On dépose un disque imprégné de 5 μ g d'optochine.

Après incubation à 37°C pendant 18 heures, on recherche l'existence ou l'absence d'une zone d'inhibition.

c) Résultats

Pour les pneumocoques, on observe une zone d'inhibition supérieure à 15 mm. Les autres streptocoques ne sont pas inhibés.

1.2.1.2 Etude biométrique de la croissance

1.2.1.2.1 Préparation de l'inoculum:

L'inoculum est réalisé à partir d'une culture de 24 heures de la souche de référence ATCC 49619, préalablement ensemencée sur gélose au sang de manière à remplir la boîte et incubée à 37°C, sous 5% de CO₂. Toute la culture obtenue est ensemencée dans 1ml de bouillon cœur-cerveille.

1.2.1.2.2 Expérimentation :

a) Principe:

Elle consiste à suivre la croissance de *S.pneumoniae* en réalisant des ensemencements à intervalles de temps réguliers, de volumes connus de la suspension bactérienne sur gélose au sang cuit ; on réalise des dilutions (de manière à obtenir un nombre de colonies comptable à l'œil nu grâce à l'hémolyse). Les géloses sont incubées à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 24 heures. Ensuite on compte le nombre de colonies, sur chaque gélose, de manière à obtenir un nuage de points permettant de tracer la courbe de croissance de *S.pneumoniae*.

b) Technique:

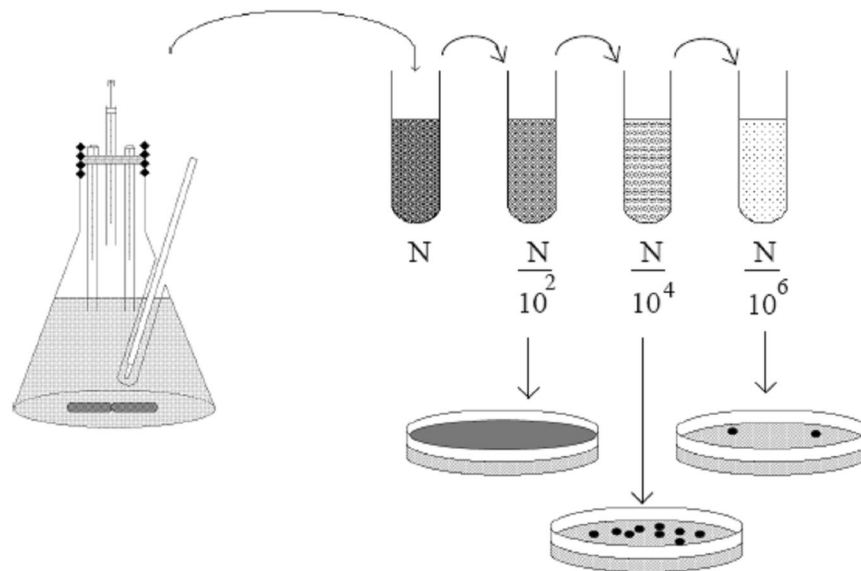


Figure 11 : technique de dilution par les étalements sur les boîtes de pétri destinées aux dénombrements.

A partir d'une culture de 24 heures obtenue en ensemencant toute la gélose, on réalise une suspension avec 1ml de bouillon cœur cerveau. On mesure la densité optique ; $DO=10^{10}$ McFarland.

[Tapez un texte]

Au temps T_0 :

- dix μl de cette suspension ont été prélevés et dilués progressivement dans 5 tubes contenant 1 ml de BCC (fig11).

- cent μl de la 5^{ème} dilution et de la 4^{ème} dilution sont prélevés et étalés sur gélose au sang cuit.

- 2 essais sont réalisés pour chaque dilution.

La suspension bactérienne initiale a ensuite été incubée à 37°C sous 5% de CO_2 .

Toutes les heures pendant 6 heures, un dénombrement en surface a été effectué suivant la même procédure qu'à T_0 .

Toutes les géloses ont été incubées 24 heures à 37°C sous 5% de CO_2 .

1.2.1.3 Etude de la survie

3.3.3.1.1 Préparation de l'inoculum

L'inoculum initial a été préparé à partir d'une culture de 18- 24 heures ensemencée en nappe sur toute la boîte de pétri, celle-ci était alors mise en suspension dans 1 ml de bouillon de culture. De la même manière 7 suspensions ont été réalisées. Les suspensions ont d'abord été incubées pendant 3 heures à 37°C dans une cloche à bougie, avant d'être conservées à -20°C et -80°C (4 suspensions à -20°C et 3 suspensions à -80°C).

3.3.3.1.2 conservation des suspensions de streptococcus pneumoniae.

Ces suspensions ont été réalisées dans le but d'éviter des successions de gel et de dégel, ainsi pour les suspensions conservées à -20°C, un échantillon était décongelé et ensemencé après 24 heures puis chaque semaine pendant 30 jours; le

[Tapez un texte]

dénombrement était effectué après dilution. Pour les suspensions conservées à -80°C, le dénombrement a été réalisé après 24 heures ; puis à J16 et à J30.

1.2.2 *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis*

1.2.2.1 Identification

1.2.2.1.1 Haemophilus influenzae

a. Aspect macroscopique

On obtient des colonies lisses, rondes, bombées ou des colonies muqueuses, volumineuses ayant tendance à s'étaler.

b. Examen microscopique au Gram

Ce sont des bacilles Gram négatif, isolés, de petite taille, polymorphes, parfois capsulés ou des coccobacilles Gram négatifs.

c. Caractères biochimiques

- Cytochrome oxydase (+)
- Catalase (+)
- Aérobie anaérobie facultatif

2 Mise en évidence de l'exigence en facteur X (hémine) et/ou en facteur V (NAD)

• Procédé en milieu liquide

Répartir dans quatre tubes à essais 5 ml d'eau peptonée, les numéroter de 1 à 4 et ajouter dans chaque tube:

- tube 1, une goutte d'extrait de levure

[Tapez un texte]

- tube 2, une goutte d'hémine
- tube 3, une goutte d'extrait de levure + une goutte d'hémine.
- tube 4, sert de témoin et ne reçoit aucun facteur de croissance.

Ensemencer chaque tube (en commençant par le tube 4) avec une goutte d'une suspension diluée préparée de la manière suivante: A partir d'une culture sur gélose au sang cuit, faire une suspension trouble dans un milieu stérile sans facteur, puis diluer cette suspension environ au centième (3 gouttes dans 10 ml d'eau).

Mélanger et placer les tubes à 37° C en position inclinée pour assurer une bonne aération du milieu.

Lecture: Au bout de 18-24 heures,

- le tube témoin ne doit présenter aucun trouble (culture en milieu carencé ce qui prouve que la souche ne se développe pas sans facteur.

- *H. influenzae* cultive dans le tube 3 (besoin en hémine et NAD)

- **Procédé sur milieux gélosés**

Repiquer la souche à identifier sur les quatre milieux suivants:

- GSC polyvitex: contient de l'hémine et du NAD.
- Gélose chocolat: contient uniquement de l'hémine.
- Gélose trypticase soja + polyvitex: contient du NAD.
- Gélose trypticase soja: ne contient aucun facteur, sert de témoin.

Incuber les trois premiers milieux sous une atmosphère enrichie en CO₂ (jarre) à 37°C; la gélose trypticase soja est incubée directement à 37°C.

[Tapez un texte]

Lecture: au bout de 24 à 48 heures d'incubation,

- la gélose TS ne présente pas de culture.
- *H. influenzae* pousse uniquement sur GSC polyvitex.

Ø Microméthodes d'identification:

Nous avons également utilisé les micro galeries API NH, ensemencées avec une suspension bactérienne dans de l'eau physiologique à 4 Mac Farland. Les réactions produites pendant la période d'incubation (2 heures) se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions a été faite à l'aide du tableau de lecture de API NH et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification du catalogue analytique.

1.2.2.1.2 Branhamella catarrhalis (Moraxella catarrhalis)

a. Aspect macroscopique des colonies

Les colonies de *Branhamella catarrhalis* sont lisses ou rugueuses légèrement convexes ou aplaties, de 1 à 2 mm de diamètre, parfois muqueuses, glissantes sur la gélose, lorsqu'on les pousse avec l'anse de platine.

b. Examen microscopique au Gram

L'examen montre des diplocoques Gram négatif à faces adjacentes aplaties avec une tendance à résister à la décoloration.

c. **Caractères biochimiques**

- Oxydase (+)

- Catalase (+)

Ø **Micro méthodes d'identification:**

L'identification formelle a été faite à l'aide des micro galeries API NH (*Neisseria Haemophilus*) ensemencées avec une suspension bactérienne dans de l'eau physiologique à 4 Mac farland sur l'échelle de turbidité. Les réactions produites pendant la période d'incubation (deux heures) se traduisaient par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions est faite à l'aide du tableau de lecture d'API NH et l'identification a été obtenue à l'aide du tableau d'identification.

La galerie est incubée une seconde fois pendant deux heures au bout desquelles une nouvelle lecture a permis de confirmer les caractères notés au cours de la première lecture.

1.2.2.2 Etude biométrique de la croissance

1.2.2.2.1 Préparation de l'inoculum:

L'inoculum était préparé de manière à obtenir densité approximative de 10^{15} UFC/ ml. Pour cela les souches de *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 et de *Moraxella catarrhalis* devaient être ensemencées sur géloses au sang supplémentées de polyvitex et incubées à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 24 heures. C'est à partir de ces cultures qu'ont été réalisés les inoculums; (totalité de chaque culture dans 1ml de bouillon cœur-cerveau et 1ml de MGY, ce qui correspond à une densité approximative de 10^{15} UFC/ ml).

1.2.2.2 Expérimentation :

a) Principe:

Elle consiste à suivre la croissance de chaque bactérie en réalisant des ensemencements à intervalles de temps réguliers, de volumes connus de chaque inoculum sur les milieux adéquats. Les géloses sont incubées à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 24 heures. Ensuite on compte le nombre de colonies, sur chaque gélose, de manière à obtenir un nuage de points permettant de tracer la courbe de croissance de chaque germe.

b) Technique:

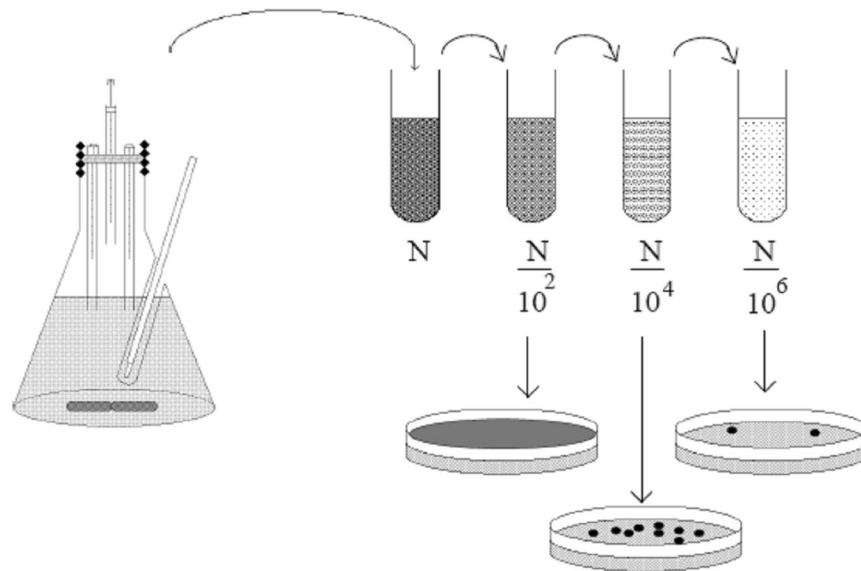


Figure 11 : technique de dilution par les étalements sur les boîtes de pétri destinées aux dénombrements.

La densité de l'inoculum étant d'environ 10^{15} UFC/ml ceci nécessitait alors de réaliser 8 dilutions de raison 2.

Au temps T_0 : disposant de la suspension bactérienne à 10^{15} UFC/ml ; la procédure suivante a été appliquée :

[Tapez un texte]

- repartition de 1 ml de BCC dans 8 tubes
- puis prélèvement de 10µl de suspension bactérienne et dilution progressive (du 1^{er} au 8^{ième} tube)
- étalement de 100µl de la 8^{ième} dilution et 100µl de la 7^{ième} dilution sur gélose au sang cuit supplémentée de polyvitex à l'aide d'un étaleur stérile.

Les suspensions bactériennes étaient ensuite incubées à 37°C dans une cloche à bougie et toutes les heures jusqu'à la 6^{ième} heure, un dénombrement en surface était effectué suivant la même procédure qu'à T₀.

Toutes les géloses étaient alors incubées pendant 24 heures à 37°C dans une cloche à bougie.

Les intervalles de temps entre les ensemencements ont ainsi été choisis pour avoir le maximum de point dans la phase exponentielle de la croissance (fig13) : l'intervalle entre deux ensemencements est donc fonction de la température ; puisque la phase exponentielle est d'autant plus courte que l'on est proche de la température optimale de croissance **(21)**. Après incubation on compte le nombre de colonies sur chaque gélose.

La technique des dénombrements suppose qu'à un micro-organisme déposé au départ correspond après culture, une colonie **(19)**. La croissance est ainsi mesurée en *unités formant colonies* par ml (UFC/ml), et le plus souvent représentés après transformation en logarithme décimal en fonction du temps.

[Tapez un texte]

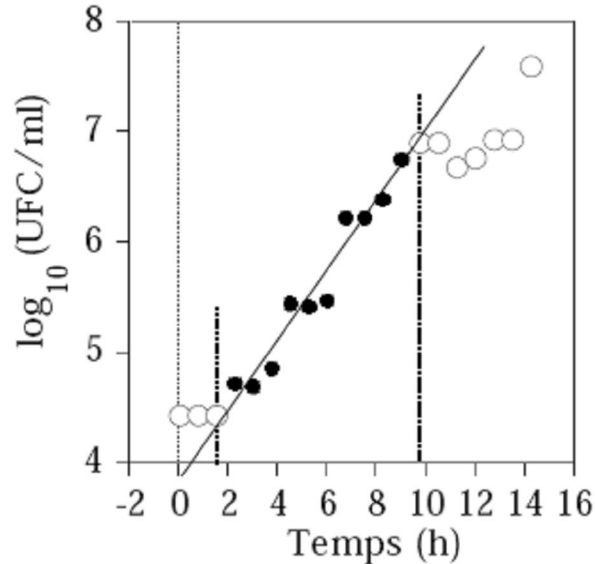


Figure12 : nuage de points obtenus après ensemencement d'une suspension bactérienne à intervalle de temps réguliers.

1.2.2.3 Etude de la survie

1.2.2.3.1 Préparation de l'inoculum

L'inoculum initial était préparé à partir d'une culture de 18- 24 heures ensemencée en nappe sur toute la boîte de pétri, celle-ci devait être mise en suspension dans 1 ml de bouillon de culture. Douze suspensions ont été réalisées pour chaque germe. Les suspensions étaient incubées pendant 4 heures à 37°C (temps nécessaire pour que les bactéries soient en phase exponentielle de croissance) avant d'être conservées à -20°C et -80°C.

[Tapez un texte]

1.2.2.3.2 Conservation des suspensions *H. influenzae* et *M. catarrhalis*

Des 12 suspensions effectuées 6 étaient conservées à – 20°C et 6 à - 80°C.

Chaque semaine deux échantillons (à -20°C et à – 80°C) de chaque germe étaient décongelés et ensemencés en vue d'un dénombrement en surface. La durée de conservation était de 6 semaines.

// RESULTATS

//.1 *Haemophilus influenzae*

2.1.1 Courbes de croissance

Les points obtenus à intervalles de temps réguliers à partir d'une culture de la souche de référence *Haemophilus* ATCC 49247, ont permis de tracer la courbe de croissance.

Les données brutes sont reportées dans le tableau suivant.

Tableau IV : nombre de colonies obtenu après culture dans le BCC à 37°c (*H.influenzae*)

Temps (heures)	Nombre de colonies N (UFC/ml)	Log N
0	10^{11}	11
1	10^{11}	11
2	$1,210^{12}$	12,07
3	$2,5810^{13}$	13,41
4	$5,410^{14}$	14,73
5	$5,410^{14}$	14,73
6	$1,0710^{13}$	13,02

La courbe de croissance de *H.influenzae* ainsi obtenu se decompose en 4 phases ; une phase de latence qui dure environ une heure (densité bactérienne constante)

[Tapez un texte]

suivie d'une phase de croissance exponentielle est caractérisée par les paramètres suivants:

- Temps de génération (TG) = $\frac{t}{3,3 \log\left(\frac{b}{B}\right)} = \frac{60}{3,3 \log\left(\frac{2,58 \cdot 10^{13}}{1,2 \cdot 10^{12}}\right)} = 13,64$ minutes

Avec b=nombre de colonies à t=3heures et B=nombre de colonies à t=2 heures.

Ce qui signifie que la population bactérienne de *H.influenzae* se dédouble à chaque quart d'heure.

- Taux de croissance maximum (μ_{\max}) = $\frac{\ln 2}{TG} = \frac{\ln 2}{13,64} = 0,050$

La courbe décrit également une phase de croissance stationnaire comprise entre la 4^{ème} et la 5^{ème} heure et une phase de décroissance exponentielle

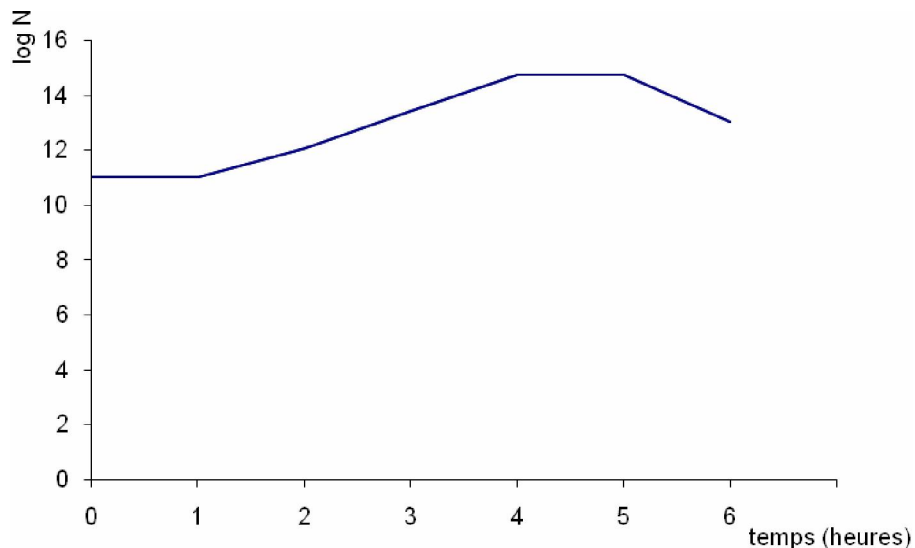


Figure 13: courbe de croissance observée après culture dans le BCC (*H.influenzae*).

L'étude la croissance en milieu MGY donne une allure différente à la courbe de croissance. La courbe est caractérisée par une phase de latence plus longue que

[Tapez un texte]

celle observée avec le BCC suivie d'une phase de décroissance "anormale" à partir de la troisième heure jusqu'à cinquième heure.

En considérant que la phase comprise entre la cinquième et la sixième heure est la phase exponentielle de croissance; cette dernière sera donc caractérisée par les paramètres suivants:

$$\bullet \text{ Temps de génération (TG)} = \frac{t}{3,3 \log\left(\frac{b}{B}\right)} = \frac{60}{3,3 \log\left(\frac{3 \cdot 10^{16}}{5,5 \cdot 10^{14}}\right)} = 10,46 \text{ minutes}$$

Avec b=nombre de colonies à t=5 heures et B=nombre de colonies à t= 4 heures

$$\bullet \text{ Taux de croissance maximum } (\mu_{\max}) = \frac{\ln 2}{TG} = \frac{\ln 2}{13,64} = 0,06$$

Tableau V : nombre de colonies obtenu après culture dans le MGY à 37°C

Temps (heures)	Nombre de colonies N (UFC/ml)	Log N
0	$1,810^{16}$	16,25
1	$1,510^{16}$	16,17
2	$1,710^{16}$	16,23
3	$1,9510^{15}$	15,29
4	$5,510^{14}$	14,74
5	310^{16}	16,47
6	$3,810^{16}$	16,57

[Tapez un texte]

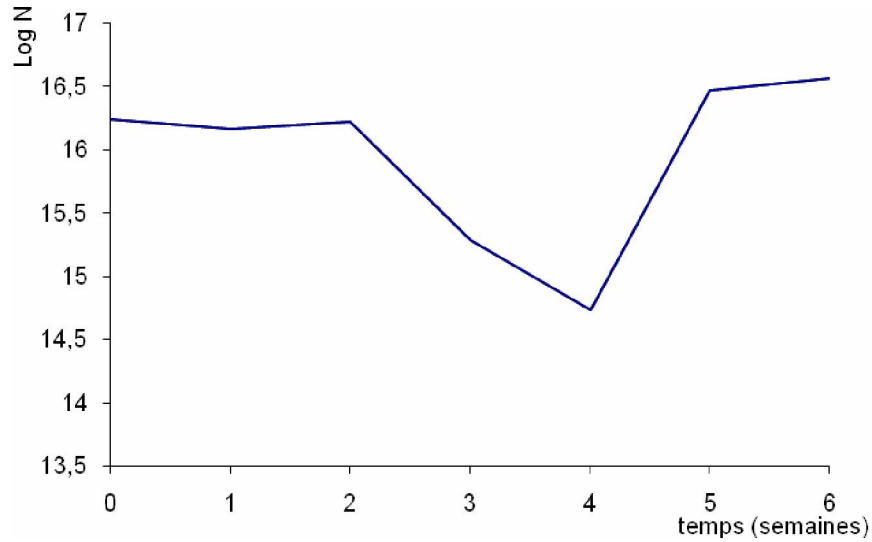


Figure 14 : courbe de croissance de *H. influenzae* observée après culture dans du MGY.

2.1.2 Courbes de survie

L'étude de la survie ou de la conservation des trois bactéries a été faite à températures différentes: -20°C et -80°C ; dans deux milieux de conservation: le Bouillon cœur cerveau additionné de glycérol et le milieu MGY.

2.1.2.1 Conservation à -20°C

Les ensemencements à une semaine d'intervalle des aliquotes conservés à -20°C dans du MGY pendant 6 semaines ont permis d'obtenir les résultats ci-après répertoriés. Après un temps de latence d'environ une semaine observé, la décroissance suit d'abord une tendance exponentielle avant de devenir sinusoidale (fig 15).

[Tapez un texte]

**Tableau VI : nombre de colonies obtenu après conservation à -20° c dans le MGY
(*H.influenzae*)**

Temps (semaines)	Nombre de colonies N (UFC/ml)	Log N
0	$2,58 10^{13}$	13,41
1	$2,03 10^{13}$	13,3
2	$2,2 10^9$	9,35
3	$2,6 10^8$	8,41
4	$1,58 10^9$	9,2
5	$1,34 10^9$	9,13
6	$3,98 10^8$	8,6

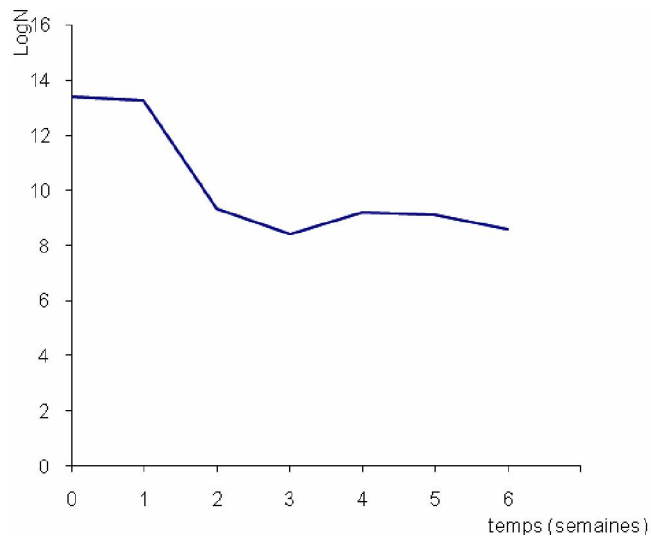


Figure 15 : courbe de survie obtenue après conservation dans du MGY à - 20°c
(*H.influenzae*).

[Tapez un texte]

La conservation à -20°C pendant 6 semaines de *Haemophilus influenzae* a également été réalisée dans du Bouillon cœur cerveau additionné de Glycérol ; le dénombrement bactérien effectué chaque semaine a permis d'obtenir les données suivantes :

Tableau VII : nombre de colonies de *H.influenzae*, obtenu après conservation à -20°C dans le BCC

Temps (semaines)	Nombre de colonies N (UFC/ml)	Log N
0	2,5810 ¹³	13,41
1	10 ¹²	12
2	1,310 ⁸	9,11
3	810 ⁸	8,9
4	410 ⁸	8,6
5	1,5110 ⁸	8,2
6	610 ⁷	7,77

Ces données permettent d'obtenir une courbe qui peut schématiquement être scindée en trois phases :

- première phase : décroissance lente ;
- deuxième phase : décroissance quasi exponentielle ;
- la troisième phase est plus ou moins constante et elle est caractérisée par une décroissance très lente (fig 16).

D'une manière générale, après 6 semaines de conservation à -20°C la décroissance est plus rapide dans le BCC que dans le MGY.

[Tapez un texte]

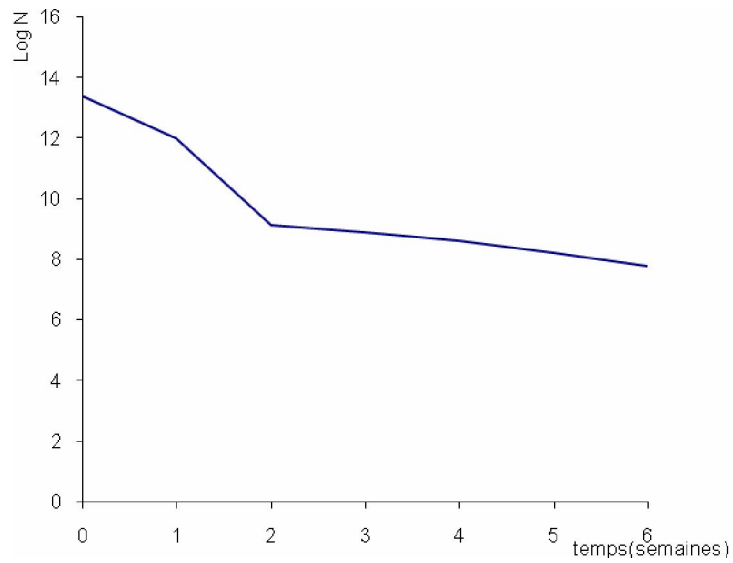


Figure 16 : courbe de survie obtenue après conservation dans du BCC à -20°C (*H.influenzae*).

2.1.2.2 Conservation à -80°C

Les résultats obtenus à -80°C dans les deux milieux de conservation : Bouillon cœur cerveau + Glycérol et MGY étaient identiques.

[Tapez un texte]

Tableau VIII : nombre de colonies de *H.influenzae* obtenu après conservation à -80°C dans le BCC et dans le MGY

Temps (semaines)	Nombre de colonies N (UFC/ml)	Log N
0	2,5810 ¹³	13,41
1	810 ¹¹	11,9
2	510 ¹¹	11,77
3	1,2510 ¹¹	11,1
4	7,9410 ¹⁰	10,9
5	510 ¹⁰	10,7
6	210 ¹⁰	10,3

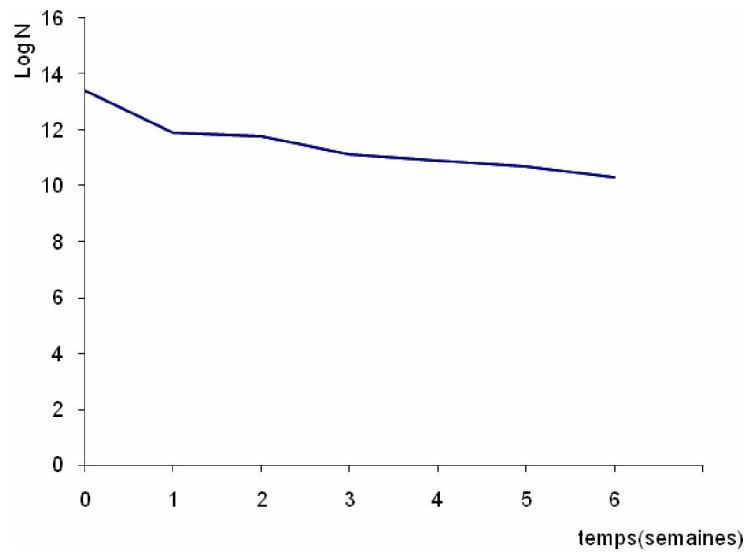


Figure 17 : courbe de survie obtenue après conservation dans du MGY et BCC à - 80°C (*H.influenzae*).

[Tapez un texte]

A -80°C la courbe obtenue est la même dans le MGY et le BCC ; le phénomène observé est une décroissance très lente des bactéries. On en déduit donc que -80°C est la température idéale de conservation pour *H.influenzae* quelque soit le milieu de conservation utilisé.

II.2 *Moraxella catarrhalis*

2.2.1 Courbes de croissance

La croissance de *Moraxella catarrhalis* a été étudiée dans un premier temps en culture dans un bouillon cœur cerveau, à 37°C et sous atmosphère contenant 5% de CO₂. Nous avons suivi la croissance de *Moraxella catarrhalis* pendant 6 heures de temps. Les résultats obtenus, c'est-à-dire le nombre de colonies dénombré toutes les heures a permis de tracer la courbe représentée par la figure18. Le tableau ci-après récapitule les chiffres obtenus.

Tableau IX : nombre de colonies obtenu après culture dans le BCC à 37°C (*M.catarrhalis*)

Temps (heures)	Nombre de colonies N (UFC/ml)	Log N
0	$3 \cdot 10^{15}$	15,47
1	$3 \cdot 10^{15}$	15,47
2	$4,79 \cdot 10^{15}$	15,68
3	$7,71 \cdot 10^{15}$	15,88
4	$1,29 \cdot 10^{16}$	16,08
5	$2 \cdot 10^{16}$	16,3
6	$5,16 \cdot 10^{16}$	16,71

[Tapez un texte]

Le temps de latence observé pour *Moraxella catarrhalis* est d'environ 1 heure; et la phase exponentielle de croissance est caractérisée par les paramètres suivants:

- Temps de génération (TG) = $\frac{t}{3,3 \log\left(\frac{b}{B}\right)} = \frac{120}{3,3 \log\left(\frac{7,7 \cdot 10^{15}}{3 \cdot 10^{15}}\right)} = 88,82$ minutes

- Taux de croissance maximum (μ_{\max}) = $\frac{\ln 2}{TG} = \frac{\ln 2}{88,82} = 0,007$

La courbe obtenue montre qu'au bout de 6 heures de culture la croissance de *Moraxella catarrhalis* ne s'arrête pas (pas de phase stationnaire, ni de phase de déclin) ; on suppose que *Moraxella catarrhalis* peut continuer de se multiplier au-delà de 6 heures.

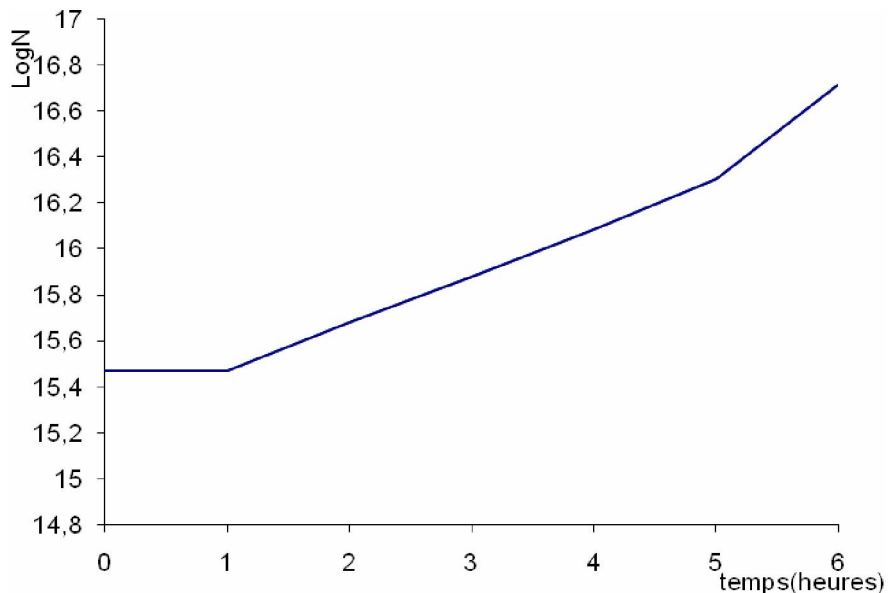


Figure 18: courbe de croissance de *M. catarrhalis* observée après culture dans du BCC.

En milieu MGY la courbe de croissance observée est différente. En effet on note une phase exponentielle courte; et une phase de décroissance rapide précédée d'une phase stationnaire. Notons que l'inoculum initial utilisé pour

[Tapez un texte]

l'étude de la croissance en milieu MGY était plus dense que celui utilisé dans l'étude de la croissance de *Moraxella catarrhalis* en milieu BCC (ce qui pourrait expliquer l'allure irrégulière de la courbe).

On observe une phase exponentielle de croissance brève (par rapport à la précédente) et une phase de décroissance quasi exponentielle (fig 19).

Tableau X : nombre de colonies obtenu après culture dans le MGY à 37°C (*M. catarrhalis*)

Temps (heures)	Nombre de colonies N (UFC/ml)	Log N
0	$1,3 \cdot 10^{16}$	16,11
1	$1,2 \cdot 10^{16}$	16,07
2	$2,5 \cdot 10^{16}$	16,39
3	$4 \cdot 10^{16}$	16,6
4	$4 \cdot 10^{16}$	16,6
5	$3 \cdot 10^{15}$	15,47
6	$4 \cdot 10^{15}$	15,6

La phase exponentielle de croissance est caractérisée par les paramètres suivants :

- Temps de génération (TG) = $\frac{t}{3,3 \log\left(\frac{b}{B}\right)} = \frac{60}{3,3 \log\left(\frac{2,5 \cdot 10^{16}}{1,2 \cdot 10^{16}}\right)} = 57,03$ minutes
- Taux de croissance maximum (μ_{\max}) = $\frac{\ln 2}{TG} = \frac{\ln 2}{57,03} = 0,012$

[Tapez un texte]

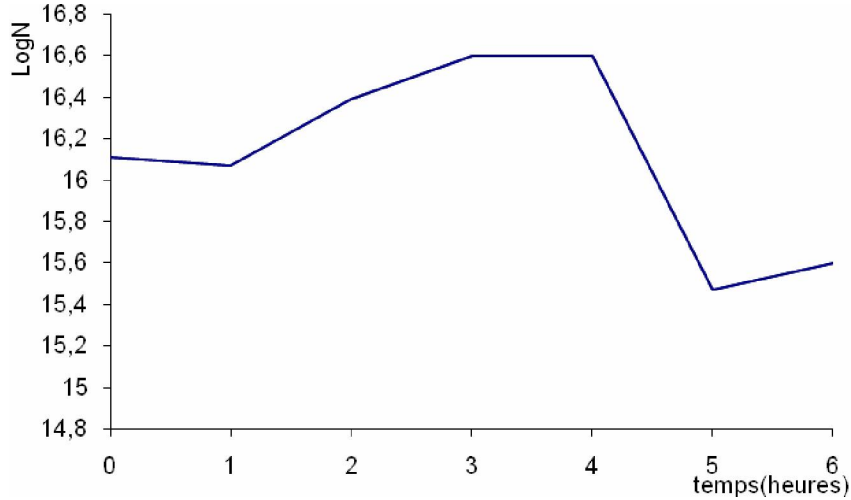


Figure 19: courbe de croissance de *M. catarrhalis* observée après culture dans du MGY.

2.2.2 Courbes de survie

La conservation de *Moraxella catarrhalis* a été faite suivant la même procédure :

Température: -20°C ; -80°C

Milieux de conservation: MGY ; Bouillon cœur cerveau+glycérol

Durée de conservation: 6 semaines

Fréquence des dénombrements: 1/semaines

Les résultats obtenus sont les suivants:

2.2.2.1 Conservation à – 20°C

a) En milieu MGY

Tableau XI : nombre de colonies obtenu après conservation dans le MGY à -20°C (*M. catarrhalis*)

Temps	Nombre de colonies N (UFC/ml)	Log N
-------	-------------------------------	-------

[Tapez un texte]

(semaines)		
0	$2,18 \cdot 10^{14}$	14,33
1	10^{12}	12
2	$6 \cdot 10^{11}$	11,77
3	$8 \cdot 10^{10}$	10,9
4	$4 \cdot 10^{10}$	10,6
5	$9,2 \cdot 10^9$	9,91
6	$6,8 \cdot 10^9$	9,83

La décroissance observée est plus ou moins lente définissant une courbe sinusoidale (fig 20).

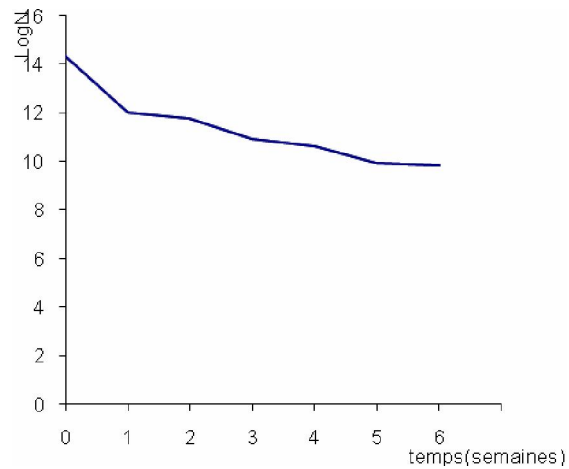


Figure 20 : nombre de colonies obtenues après conservation dans du MGY à - 20°C (*M. catarrhalis*).

[Tapez un texte]

b) En milieu bouillon cœur cerveau + glucose + glycérol

Tableau XII : nombre de colonies obtenu après conservation dans le BCC à -20°C (*M. catarrhalis*)

Temps (heures)	Nombre de colonies N (UFC/ml)	Log N
0	10^{13}	13
1	10^{12}	12
2	$2 \cdot 10^{10}$	10,3
3	10^9	9
4	10^8	8
5	$5,5 \cdot 10^7$	7,74
6	$6 \cdot 10^6$	6,77

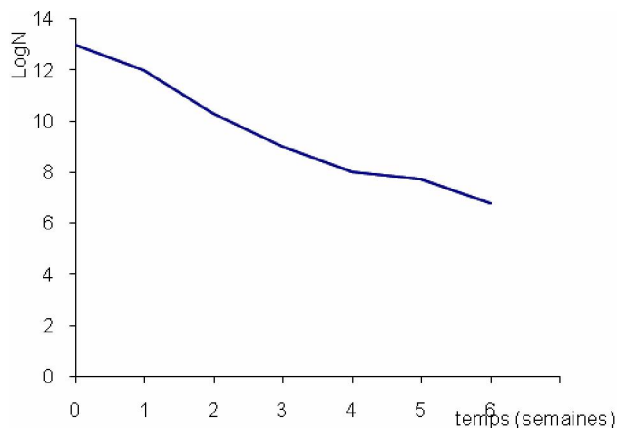


Figure 21 : nombre de colonies obtenues après conservation dans du BCC à - 20°C (*M. catarrhalis*).

[Tapez un texte]

Dans le BCC la décroissance est plus rapide, et l'aspect de la courbe est plus ou moins linéaire.

2.2.2.2 Conservation à - 80°C

La conservation à -80°C dans les deux milieux de conservation donne les résultats similaires.

Tableau XIII : nombre de colonies obtenu après conservation dans le MGY et le BCC à -80°C (*M.catarrhalis*)

Temps (heures)	Nombre de colonies N (UFC/ml)	Log N
0	$2,18 \cdot 10^{14}$	14,33
1	10^{13}	13
2	$5 \cdot 10^{12}$	12,69
3	$3,2 \cdot 10^{12}$	12,5
4	$2,8 \cdot 10^{12}$	12,44
5	$2 \cdot 10^{12}$	12,3
6	$1,5 \cdot 10^{12}$	12,17

[Tapez un texte]

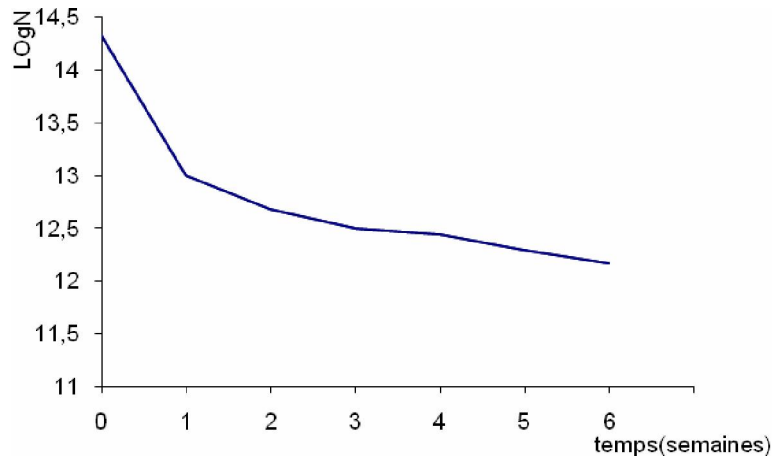


Figure 22: nombre de colonies obtenues après conservation dans du MGY et BCC à - 80°C (*M.catarrhalis*).

La courbe obtenue présente deux phases : une phase de décroissance rapide ou exponentielle et une phase de décroissance lente.

II.3 Streptococcus pneumoniae

2.3.1 Courbe de croissance

L'étude de la croissance de *Streptococcus pneumoniae* a été réalisée dans les mêmes conditions c'est-à-dire culture dans les milieux MGY et Bouillon cœur cerveau ; incubation à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO₂ pendant 6 heures (dénombrement effectué toutes les heures ; mais nous avons obtenus des résultats satisfaisants qu'avec le milieu MGY ; en effet avec le bouillon cœur cerveau nous avons observé une décroissance dès la première heure.

Les résultats obtenus en milieu MGY sont les suivants :

Tableau XIV : nombre de colonies obtenu après culture dans le MGY à 37°C (*S.pneumoniae*)

Temps (heures)	Nombre de colonies N (UFC/ml)	Log N
----------------	-------------------------------	-------

[Tapez un texte]

0	2,0410⁹	9,31
1	1,44 10⁹	9,16
2	1,5410⁹	9,19
3	4,5710⁹	9,66
4	1,3110¹⁰	10,12
5	3,810¹⁰	10,58
6	3,910⁹	9,59

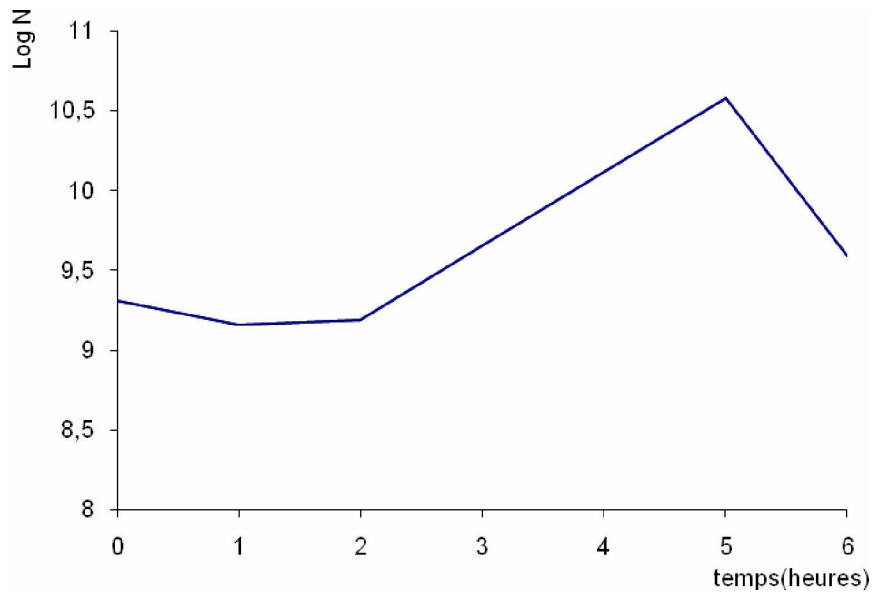


Figure 23 : courbe de croissance de *Streptococcus pneumoniae* en culture dans le milieu MGY.

2.3.2 Courbe de survie

L'étude de la survie de *Streptococcus pneumoniae* a montré un arrêt de la croissance de ce dernier au bout de 30 jours après conservation à -20°C dans le BCC et dans le MGY ; la conservation à -80°C dans le BCC a permis d'obtenir 1 colonie au bout de 30 jours.

Ainsi la seule courbe tracée à visée modélisatrice est la courbe obtenue pour la conservation à -80°C dans le MGY.

Tableau XV : nombre de colonies obtenu après conservation dans le MGY à -80°C (*S.pneumoniae*)

Temps (jours)	Nombre de colonies (UFC/ml)	logN
0	$6,3 \cdot 10^9$	9,8
1	$2,95 \cdot 10^6$	6,47
16	$6,91 \cdot 10^4$	4,84
30	$3,46 \cdot 10^5$	5,54

[Tapez un texte]

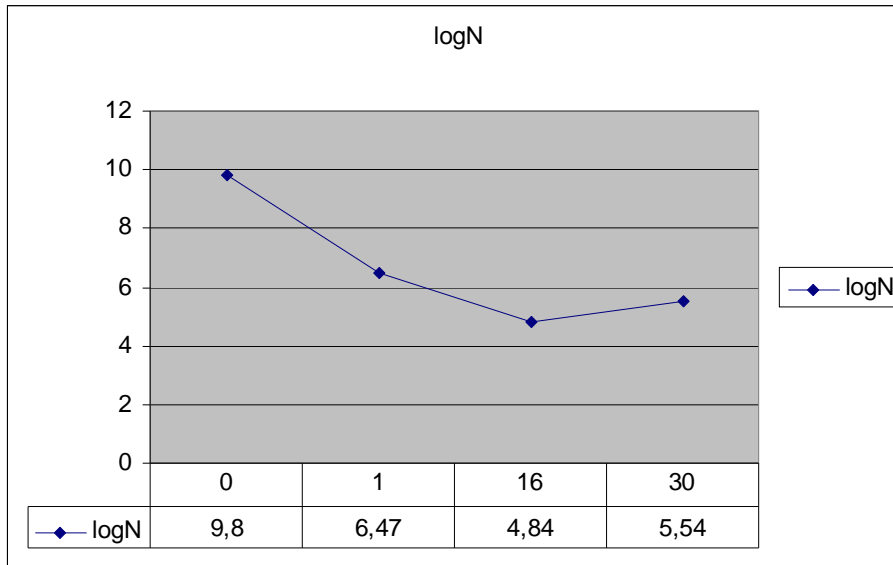


Figure 24: nombre de colonies obtenues après conservation dans du MGY à -80°C (*S.pneumoniae*).

III. MISE EN PLACE DES OUTILS MATHÉMATIQUES

Le but de l'étude de la survie était de prédire la durée de conservation à -20°C ; et -80°C dans différents milieux de conservation de *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* et *Streptococcus pneumoniae*.

En effet à l'aide de modèles mathématiques on peut prédire la durée de conservation d'une bactérie à partir des données expérimentales. Ces mêmes modèles ont été utilisés dans études antérieures (Bréand ; Delignette...) pour prédire la durée de vie de certaines bactéries en réponse à une hausse de température ; dans ce chapitre nous utiliserons ces modèles pour prédire la durée de vie des trois bactéries citées ci-dessus dans le cas d'une baisse de température.

[Tapez un texte]

La prédiction de la durée de conservation des souches étudiées, à -20°C et à -80°C dans les différents milieux de conservation sera possible par l'utilisation du modèle exponentiel avec temps de latence

Le modèle exponentiel propose une approche plus simple, par définition du temps de seuil. Lors de la prédiction du temps de seuil à partir de quelques mesures précoces, l'ajustement de ce modèle aux données nécessite l'estimation de seulement deux paramètres, dès lors que X_0 est fixé à la valeur du premier point de la courbe de survie correspondant à l'inoculum. A partir des valeurs des paramètres du modèle; le temps T_s de dépassement de seuil de densité microbienne peut être estimé facilement par:

$$T_s = lag + \frac{(X_s - X_0) \ln 10}{k}$$

K correspond alors à la pente de la phase linéaire de la courbe de survie ou à la pente de la tangente au point d'inflexion.

X_0 étant l'inoculum initial et X_s la valeur seuil de l'inoculum fixée à 10^2 UFC/ml, il s'agit de déterminer le paramètre K.

Selon le Théorème de Thalès, la pente correspond au coefficient directeur de la tangente passant par un point d'abscisse donné. Nous tracerons donc les tangentes des courbes obtenus afin de déterminer les coefficients directeurs.

III.1 Prédiction de la durée de conservation de **Haemophilus influenzae à -20°C** **3.3.4 Dans le MGY**

[Tapez un texte]

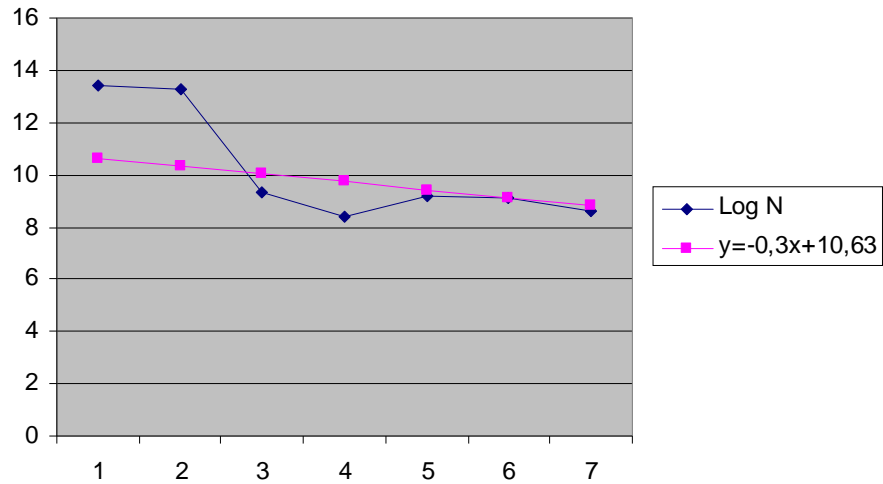


Figure 25: tangente passant par le point X=6 de la courbe de survie de H. influenzae à -20°C (MGY)

$$T_s = 1 + \frac{(\log 10^2 - \log 2,58 \cdot 10^{13}) \ln 10}{-0,3} = 88,58 \text{ semaines}$$

3.3.5 Dans le Bouillon cœur cerveau +glycérol

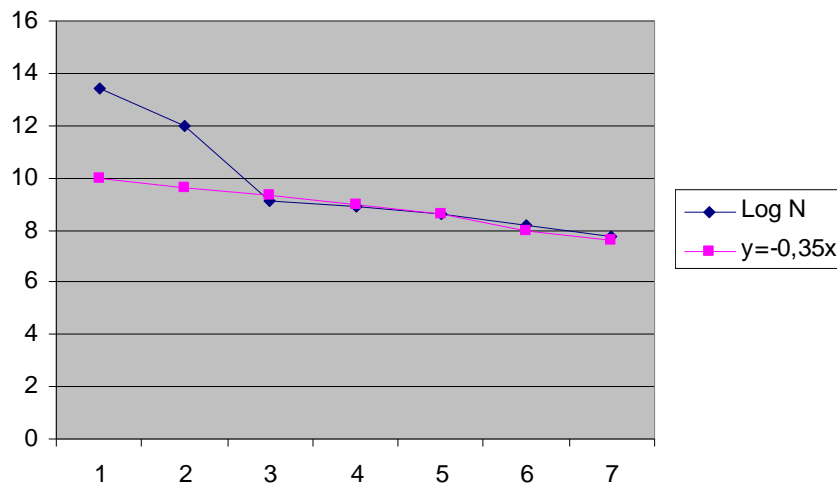


Figure 26: tangente passant par le point X=5 de la courbe de survie de H.influenzae à -20°C (BCC)

[Tapez un texte]

$$T_s = \frac{(\log 10^2 - \log 2,58 \cdot 10^{13}) \ln 10}{-0,35} = 75,07 \text{ semaines}$$

III.2 Prédiction de la durée de conservation de Moraxella catarrhalis à -20°C

3.2.1 Dans le MGY

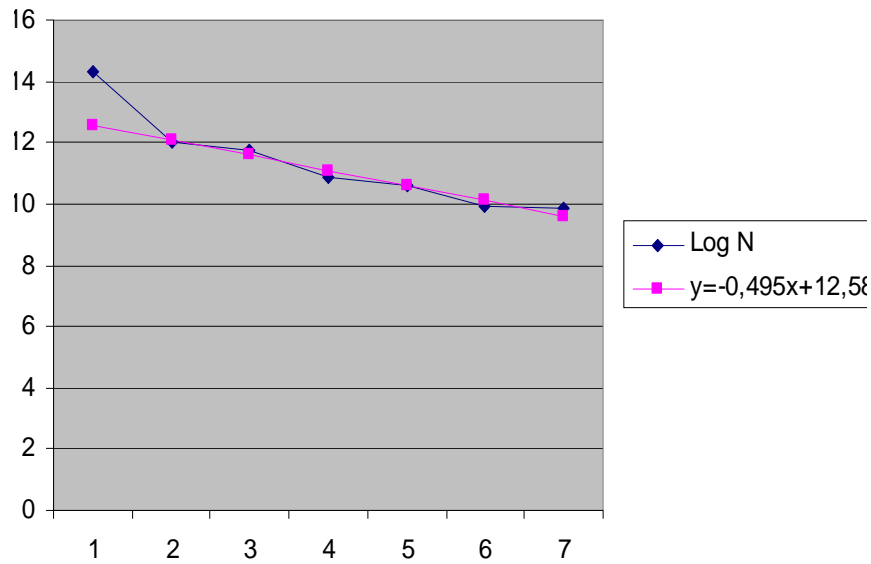


Figure 27: tangente passant par le point X=5 de la courbe de survie de M.catarrhalis à -20° (MGY)

$$T_s = \frac{(\log 10^2 - \log 2,18 \cdot 10^{14}) \ln 10}{-0,495} = 57,39 \text{ semaines}$$

3.2.2 Dans le Bouillon cœur cerveau+glycérol

[Tapez un texte]

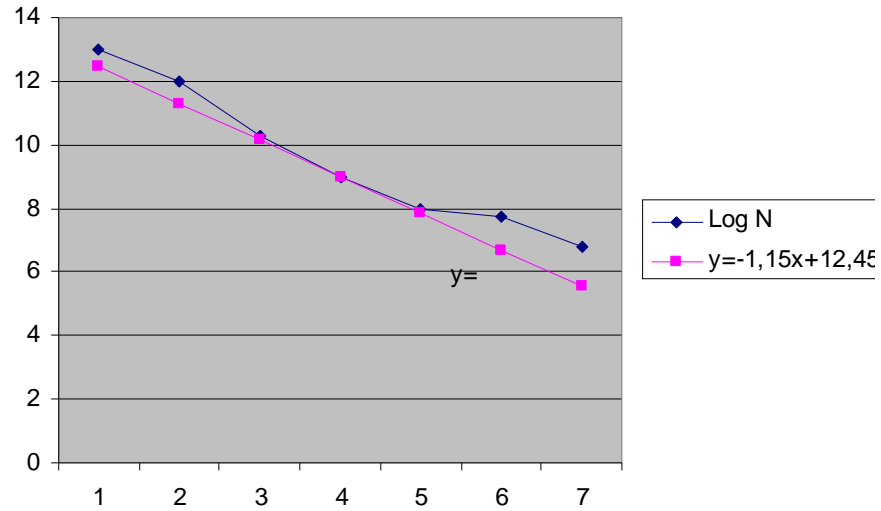


Figure 28: tangente passant par le point X=4 de la courbe de survie de *M. catarrhalis* à -20°C (BCC)

$$T_s = \frac{(\log 10^2 - \log 10^{13}) \ln 10}{-1,15} = 22,02 \text{ semaines}$$

III.3 Prédiction de la durée de conservation des bactéries à -80°C

3.3.1 *Haemophilus influenzae*

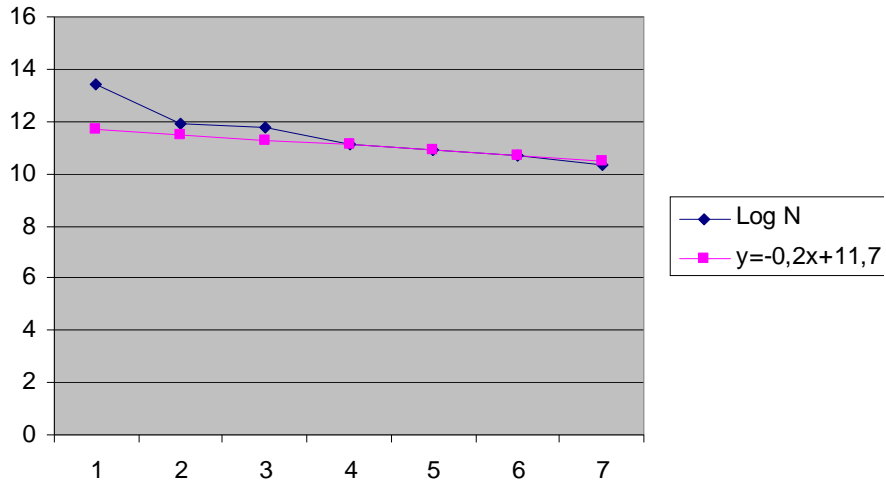


Figure 29 : tangente passant par le point X=3 de la courbe de survie de *H.influenzae* à -80°C

$$T_s = \frac{(\log 10^2 - \log 2,58 \cdot 10^{13}) \ln 10}{-0,2} = 131,38 \text{ semaines}$$

3.3.2 *Moraxella catarrhalis*

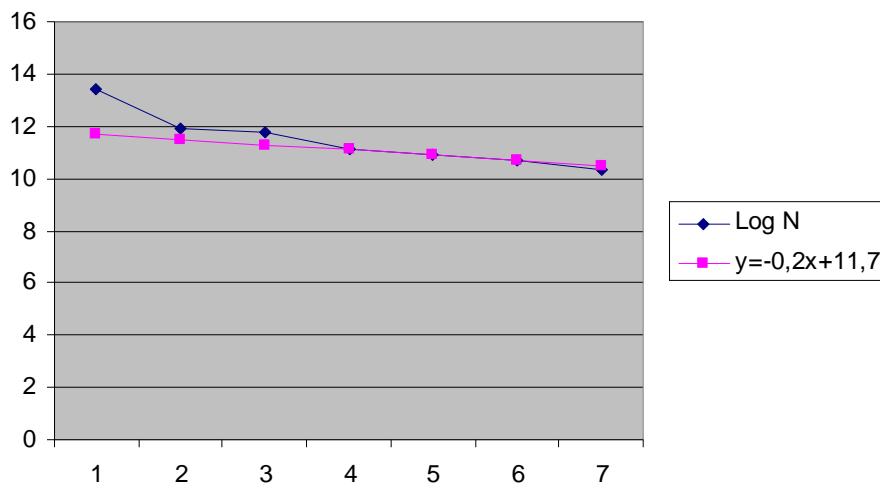


figure30 : tangente passant par le point X=3 de la courbe de survie de *M.catarrhalis* à -80°C

[Tapez un texte]

$$T_s = \frac{(\log 10^2 - \log 2,18 \cdot 10^{14}) \ln 10}{-0,2} = 142,05 \text{ semaines}$$

3.3.3 *Streptococcus pneumoniae*

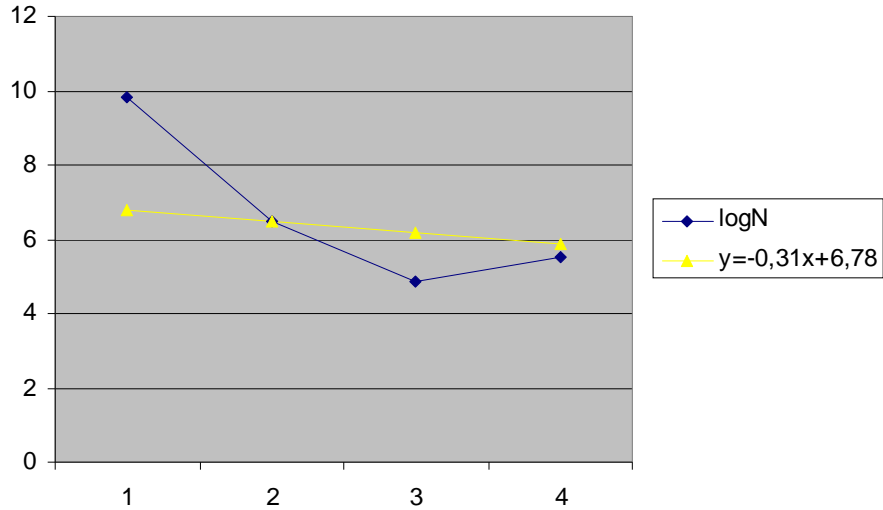


Figure 31: tangente passant par le point X= 1 de la courbe de survie de *S.pneumoniae* à -80°C

$$T_s = \frac{(\log 10^2 - \log 6,31 \cdot 10^9) \ln 10}{-0,31} = 57,93 \text{ semaines}$$

IV. DISCUSSION

IV.1 SOUCHES BACTERIENNES ET IDENTIFICATION

Notre travail ayant porté sur des souches de référence (*Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 ; *Haemophilus influenzae* ATCC 49247) et une souche isolée d'un produit pathologique, identifiée et conservée (*Moraxella catarrhalis* URB/CSB/2006/247) ; besoin était donc de faire une identification sommaire pour s'assurer de la pureté des souches à étudier.

Le délai entre l'identification des souches et l'étude de la croissance devait être court. Et la conservation à -20°C et à -80°C pour la modélisation de la survie de ces bactéries se faisait systématiquement dans un délai de 48 heures après cette étude.

IV.2 ETUDE DE LA CROISSANCE PAR LA METHODE DE DENOMBREMENT SUR BOITES DE PETRI

Cette étape nécessitait une préparation rigoureuse pour sa réalisation. En effet la technique utilisée pour le dénombrement bactérien (dénombrement sur boîte de pétri) impose d'avoir un nombre de colonies compris entre 30-300 (22), cette plage permet d'atteindre un compromis satisfaisant entre erreurs d'échantillonnages pour les faibles nombres et erreurs de comptage pour de forts nombres (en raison de la confluence des colonies). Pour ce faire il était donc nécessaire de réaliser plusieurs dilutions pour déterminer laquelle permettrait un bon dénombrement ; la dilution adoptée était fonction de l'inoculum initial. Le résultat était converti en UFC /ml.

Le cas des dénombrements bactériens pose en général un problème d'hétéroscédasticité. En effet, au cours d'une croissance, la densité de biomasse augmente fortement (elle peut être multipliée par 1000 voir 10.000), il y a donc plus d'étapes de dilutions nécessaires et donc l'erreur du dénombrement

augmente au cours du temps. Ce problème est en général résolu par une transformation logarithmique des données (22).

L'utilisation de deux milieux de culture pour l'étude de la croissance montre que l'allure de la cinétique de croissance dépend du milieu mais aussi de l'inoculum. Le milieu MGY se présente comme étant un milieu adéquat pour l'étude de la croissance de *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae*; par contre le BCC semble être le milieu idéal pour la croissance de *Moraxella catarrhalis* uniquement (après un temps de latence d'environ une heure la bactérie croît lentement, mais après six heures la croissance continue). En effet les courbes de croissance obtenues dans le milieu MGY avec *S.pneumoniae* et *H.influenzae* ont une allure semblable à celles décrites par Buchanan(14). La culture dans le BCC donne des cinétiques de croissance "atypiques"; en particulier pour *S.pneumoniae* (dès la première heure la courbe décroît progressivement, et après six heures de culture on ne dénombre plus de colonies).

IV.3 MODELISATION DE LA SURVIE

Notre étude avait pour but de déterminer la durée de conservation de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis* dans deux milieux de culture différents par une méthode rapide, probablement efficace mais surtout économique (en matériel et en temps). La modélisation de la survie des bactéries à différentes températures consistait à déterminer expérimentalement les premiers points de la courbe (six premiers points), et à partir de ces points à prédire le temps au bout duquel on aura un inoculum à 10^2 UFC /ml.

L'inoculum initial était obtenu approximativement par ensemencement de 1 ml de BCC ou de MGY par la totalité d'une culture de 24 heures en boîte de pétri, et la concentration de l'inoculum initial était déterminé par dénombrement sur boîte de pétri. Les résultats obtenus sont les suivants :

4.3.1 Durée de conservation à – 20°C :

- *Haemophilus influenzae* : 22 mois dans le MGY et 18 mois dans le BCC+ Glycérol
- *Moraxella catarrhalis* : 14 mois dans le MGY et 5 mois dans le BCC+ Glycérol
- *Streptococcus pneumoniae* : 4 semaines dans le MGY et le BCC+ Glycérol

4.3.2 Durée de conservation à – 80°C dans le MGY et dans le BCC+ Gly (obtenue par modélisation)

- *H.influenzae* : 33 mois
- *M.catarrhalis* : 35 mois
- *S.pneumoniae* : 14 mois

Ces résultats montrent que le milieu de conservation adéquat pour les trois germes étudiés est le MGY.

En effet le milieu MGY (Milk, Glycerol, Yeast); permet une conservation plus longue à -20°C pour les 3 bactéries; mais à -80°C la durée de conservation est sensiblement la même, sauf dans le cas de *Streptococcus pneumoniae* où la conservation dans le MGY est nettement meilleure.

Il est nécessaire d'évaluer l'efficacité de la prédiction dans la détermination de la durée de conservation. Cette évaluation repose sur la comparaison des résultats obtenus à l'issue de notre étude avec ceux obtenus dans différentes études expérimentales. Plusieurs études expérimentales ont été menées sur des périodes

plus ou moins longues pour déterminer la durée de conservation des germes étudiés, entre autres études :

- « Comparison of different culture media and storage temperatures for the long-term preservation of *Streptococcus pneumoniae* in tropics » étude réalisée par G.Siberry et col. (Bulletin of the world health organization, 2001) **(54)**

- « Survival of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* frozen in skim milk-tryptont-glucose-glycerol Medium » pour cette étude les travaux ont été menés par T.Kaijalainen et col. (Journal of Clinical Microbiology ; jan.2004, p.412-414) **(35)**

- « Evaluation of a Medium (STGG) for transport and optimal recovery of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal secretions collected during field studies » par K. O'brien et col. (Journal of Clinical Microbiology, Mar.2001, p.1021-1024) **(45)**.

Ces trois études confirment que le milieu MGY ou STGG est le plus adéquat pour la conservation des trois bactéries.

Selon la première étude *S. pneumoniae* peut être conservé à – 70°C pendant 16 mois et à -20°C pendant 16 semaines ; T. Kaijalainen a réalisé une étude qualitative de la conservation de *S.pneumoniae* ; *H.influenzae* et *M.catarrhalis* à -20°C et -80°C dans le milieu STGG pendant 36 mois ; les résultats obtenus sont les suivants :

- - 20°C : *H.influenzae* 5 mois ; *S.pneumoniae* et *M.catarrhalis* 18 mois
- - 80°C : 36 mois pour *S.pneumoniae* et *M.catarrhalis* et 18 mois pour *H.influenzae*

[Tapez un texte]

Notre étude montre qu'on peut conserver *H.influenzae* pendant 25 mois en suivant la procédure que nous avons adoptée. La procédure utilisée diffère de celle adoptée par l'OMS par l'étape d'incubation de 4 heures avant conservation à -20°C et -80°C ; ce qui permet une optimisation de la conservation.

Les résultats montrent que *H.influenzae* peut être conservé pendant 3-5 mois à -20°C dans le STGG(MGY) ; *M.catarrhalis* pendant 18 mois dans les mêmes conditions et *S.pneumoniae* pendant 36 semaines.

A -80°C la conservation est possible pendant au moins 36 semaines pour les 3 germes

Les résultats que nous avons obtenus pour *H. influenzae* et *M.catarrhalis* sont comparables à ceux obtenus dans les études citées ci-dessus voir meilleurs. Par contre avec *Streptococcus pneumoniae* la démarche que nous avons utilisée reste discutable. En effet nous avons obtenu une durée de vie plus grande à -20°C pour *H.influenzae* et ; similaire pour *M.catarrhalis* à -20°C et -80°C et *H.influenzae* à -80°C.

Les résultats médiocres obtenus avec *S.pneumoniae* démontrent que l'incubation pendant 3 heures avant conservation est néfaste pour ce germe ; ceci peut s'expliquer par l'action des autolysines que le pneumocoque secrète à la fin de la phase exponentielle de croissance.

On déduit de la courbe d'étude de la conservation de *S.pneumoniae* dans le STGG ou MGY à -20°C et -70°C que *S.pneumoniae* peut être conservé dans le MGY pendant 16 semaines à -20°C et 64 semaines à -70°C ; alors que dans notre étude la durée de conservation est de 4 semaines à -20°C et de 14 semaines à -80°C. Cette étude rejoint la précédente et que l'étape d'incubation avant la conservation à -20°C

[Tapez un texte]

et -80°C ne permet pas d'optimiser la conservation mais bien au contraire serait plutôt néfaste.

EN RESUME :

D'après les résultats obtenus à -80°C est la température idéale de conservation pour les trois germes étudiés. Mais lorsque dans un laboratoire les conditions ou les moyens matériels ne permettent pas de disposer de congélateurs à -80°C, il est possible de réaliser une conservation à long terme à -20°C en utilisant le milieu MGY. La durée de conservation peut être optimisée lorsque l'inoculum initial est porté en phase exponentielle de croissance, mais ceci ne s'applique certainement pas à toutes les espèces.

D'une manière générale la détermination de la durée de conservation des souches bactériennes peut se faire par modélisation ou prédiction, c'est-à-dire que les longues expérimentations coûteuses en matériel et en temps peuvent être réduites de manière à n'obtenir que les premiers points de la courbe permettant de prédire la durée exacte par l'utilisation de modèles mathématiques.

IV.4 APPORTS ET PERSPECTIVES

4.4.1 Physiologie de la croissance

L'étude de la croissance de *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* et *Haemophilus influenzae* a permis de déterminer le temps au bout duquel ces bactéries atteignent la phase exponentielle de croissance ; il correspond au temps d'incubation nécessaire pour obtenir 1000 fois, voir 10000 fois le l'inoculum initial. La détermination de ce temps d'incubation est donc un apport important pour l'optimisation de *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis* en particulier. Cette étude a également montré que l'incubation ne permet pas d'optimiser la

durée de conservation, mais au contraire la raccourcit. Cet effet pourrait être attribué à l'action des autolysines notamment l'autolysine Lyt A qui est caractéristique du pneumocoque.

En perspective, une étude approfondie de la phase exponentielle de croissance du pneumocoque : détermination du pH, dosage des produits de sécrétion (autolysine, pneumolysine etc...) ou de métabolisme, la caractérisation de ces produits, la détermination de l'expression des gènes ; peut faire l'objet de recherches dans le but de connaître le mécanisme d'action de ces toxines bactériennes.

4.4.2 Modélisation

Lorsqu'un microbiologiste souhaite prévoir l'évolution d'une population bactérienne dans des conditions environnementales données, deux solutions s'offrent à lui :

- il peut réaliser expérimentalement des cinétiques de croissance ou de décroissance (selon les cas) dans les conditions environnementales correspondant aux caractéristiques physico-chimiques du milieu étudié.
- il peut aussi tenter de stimuler la cinétique attendue à partir d'une connaissance acquise dans d'autres situations (autres bactéries), et d'autres conditions environnementales; c'est l'objectif que c'est fixé la microbiologie prédictive.

L'avantage des techniques utilisant cette méthode est évidemment la rapidité de la réponse mais aussi un gain en temps et en matériel.

Etant donné la prise de risque associé à la démarche de prédiction, nous ne saurons prôner suffisamment la prudence. On ne peut faire aveuglément confiance à une quelconque méthode de prédiction lorsque la santé du patient ou l'intérêt scientifique est en jeu. Il est alors important de connaître les capacités prédictives et

[Tapez un texte]

les limites d'utilisation de ces méthodes et de garder un regard critique face au résultat fourni.

[Tapez un texte]

CONCLUSION



CONCLUSION

Les études menées sur les germes respiratoires: *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* dans le cadre de la surveillance des résistances ou dans le cadre de la surveillance des méningites bactériennes nécessitent de longues périodes de conservation des prélèvements collectés ou des souches isolées en vue de réaliser des tests complémentaires tels que le sérotypage; l'hybridation; le séquençage et d'autres tests. Ces tests ne peuvent être réalisés que dans les laboratoires de référence; ainsi les souches doivent être conservées dans de bonnes conditions en fonction des moyens de chaque laboratoire.

Les méthodes de conservation classiques sont la congélation ; la lyophilisation ; la cryodessiccation. Mais dans nos pays en voie de développement le moyen le plus couramment utilisé reste la congélation.

L'étude biométrique de la croissance des bactéries est un préalable pour déterminer le comportement de celles-ci lorsqu'elles sont soumises à des variations des conditions environnementales (variations de la température). Cette étude de la croissance a permis de définir la durée de la phase d'incubation qui permet l'optimisation de la conservation.

Notre travail a porté sur l'étude biométrique de la croissance de trois bactéries :

- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619
- *Haemophilus influenzae* ATCC 49247
- *Moraxella catarrhalis* URB/CSB/2006/247.

Nous avons déterminé pour ces trois bactéries le taux de croissance maximum (μ_{\max}); et le temps de génération dans les différents milieux de croissance utilisés.

[Tapez un texte]

Le travail de modélisation effectué a permis de proposer une nouvelle stratégie pour déterminer de manière quantitative la durée de conservation de *Haemophilus influenzae*; *Moraxella catarrhalis* et *Streptococcus pneumoniae* (avec délai de réponse plus court).

Ainsi *H. influenzae* peut être conservé pendant 22 mois dans le MGY, et 18 mois dans le BCC+Glycérol ; 14 mois dans le MGY et 5 mois dans le BCC+Glycérol pour *M. catarrhalis*;

A -80°C la viabilité du pneumocoque sera de 14 mois dans du MGY ; celle de *H.influenzae* 32 mois autant dans le BCC+ Glycérol que dans le MGY et celle de *M. catarrhalis* 35 mois.

Le milieu MGY est donc le plus adapté pour la conservation des 3 germes.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus dans la littérature et permettent ainsi de valider la méthode utilisée.

La modélisation à visée prévisionnelle se caractérise par un délai de réponse rapide et des moyens expérimentaux limités (temps; matériel...); et présente ainsi plus d'avantages que la méthode classique qui consiste à réaliser des expériences sur de longues périodes et à refaire ces mêmes expériences lorsque les conditions changent. L'utilisation de techniques mathématiques et informatiques en biologie et en médecine est amenée à se développer plus encore ; il est donc indispensable que les scientifiques familiarisés à la manipulation des outils mathématiques et informatiques puissent mettre leurs compétences au service de la médecine et de la biologie.

Par un échange constant avec leurs partenaires, ils doivent s'efforcer de comprendre leurs besoins afin d'être à même de développer ou d'adapter des méthodes permettant d'y répondre.

[Tapez un texte]

Ce travail peut être considéré comme le point de départ de plusieurs études :

- optimisation de la conservation des autres bactéries d'intérêt médical (problèmes de santé publique)
- optimisation des méthodes diagnostic (mini galeries), de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques (rapidité de la réponse pour l'antibiogramme)
- étude des mécanismes d'actions de certaines toxines bactériennes (autolysines, hémolysines).

[Tapez un texte]

BIBLIOGRAPHIE

A decorative graphic element consisting of a thick grey L-shaped bar. The horizontal bar extends from the left edge of the page towards the right, and the vertical bar extends upwards from the right end of the horizontal bar, framing the word 'BIBLIOGRAPHIE'.

1. ADAMS M .R., LITTLE C.L. &EASTER M .C.

Modelling the effect of pH, acidulant and temperature on the growth rate of *yersinia enterocolitica*.

Journal of Applied Bacteriology, 1991. **71** : 65-71.

2. AUGUSTIN J.C.

La microbiologie prévisionnelle, un outil, des limites.

La semaine vétérinaire, 2000**824**, 42.

3. AUGUSTIN J.C., ROSSO, CARLIER V.

A model describing the effect of temperature history on lag time for *listeria monocytogenes*.

International Journal of Food Microbiology, 2000. **57** : 169-181.

4. BAIRD-PARKER A.C. & KILSBY D.C.

Principles of predictive food microbiology.

Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement, 1987. 43S-49S.

5. BARANYI J., McCLURE P.J., SUTHERLAND J.P. & ROBERTS T.A.

Modeling bacterial growth responses.

Journal of Industrial Microbiology, 1993. **12** :190-194.

6. BARANYI J., ROBERTS T.A.

A dynamic approach to predicting bacterial growth in food.

International Journal of Food Microbiology, 1994. **23** : 277-294.

7. BARANYI J., ROBERTS T.A.

Mathematics of predictive food microbiology

International Journal of Food Microbiology, 1995. **26** : 199-218.

8. BLUSTONE C.D.

Otitis media and sinusitis in children, role of *Branhamella catarrhalis*.

1986.31 : 132-141.

9. BRAHMADATHAN KN et al.

Long-term preservation of streptococci.

Indian Journal of Medical Research, 1996.101 :64-65

10. BREAND S.

Etude biométrique de la réponse d'une population bactérienne à une variation défavorable de temperature ou de pH. 1998. 12-41

11.BREAND S., FARDEL G., FLANDROIS J.P., ROSSO L., TOMASSONE

A model describing the relationship between regrowth lag time and mild temperature increase duration.

International Journal of Food Microbiology, 1997. 38 : 157-167.

12.BUCHANAN R.E.

Life phases in the bacterial culture.

Journal of Infectious Diseases, 1919 .15-77

13.CATLIN B.W

*Branhamaceae*fam.nov. ,a proposed family to accomode the genera *branhamella* and *moraxella*.

Int .J.Syst.Bacteriol. 1970. 41 :310-319

14.CATLIN B.W

Branhamella catarrhalis :an organism gaining respect as a pathogen.
*Clinical Microbiology rev.*1990. 3 :293-320

15.CHARLES-BAJARD S.

Modélisation a visée prévisionnelle de la cinétique de croissance d'une population de *listeria monocytogenes*, 1996 :22-23

16.CHARLES-BAJARD S., BOUILLARD –DELATTRE A., SOFIA T. et FLANDROIS J.P.

Capacitance measurement for estimating bacterial population growth parameters at different temperature.

Letters in Applied Microbiology, 1996 :17-30

17.CORMAN A., CARRET G., PAVE A., FLANDROIS J.P., COUX C.

Bacterial growth measurement using an automated system : mathematical modelling and analysis of growth kinetics.

Annales de l'Institut Pasteur/ Microbiologie, 1986. **137B** : 133-143.

18.CORNU M.

Dynamique des populations bactériennes en milieu mixte, 2000 :33-54.

19.DAVIES B.I & F. P. MAESON

Epidemiological and bacteriological findings on *Branhamella catarrhalis* respiratory infections in the Netherlands. 1986.**31** :S28-S33

20.DELIGNETTE –MULLER M.L.

Méthode de prédiction des aptitudes de croissance des populations de micro-organismes, 1995 :67-84.

21.DENAMUR E.,P.AUBRY , G. LAURANS

Pneumonies alvéolaires à *Branhamella catarrhalis* de l'adulte.
Medecine Maladies Infectieuses. **12** :701-707.

22.DUH Y.S., SHAFFNER D.W.

Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag time *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*.

Journal of Food Protection, 1993. 56 : 205-210.

23. FANTINI B.

La microbiologie médicale. In (Grmek M.D., ed). Histoire de la pensée médicale.

Editions du Seuil, Paris. Tome 3 : 116-146.

24.FERON A.

Bactériologie médicale.

Editions C et R, 1984.2 :22-28.

25.FLANDROIS J.P., CHOMARAT M.

Bactériologie médicale pratique. MEDSI/McGRAW-HILL, Paris, 1988.

26.FRENEY J., RENAUD F., HAUSEN W. et BOLLET C.

Précis de bactériologie clinique.

Editions ESKA, 2000 43 : 891-893.

27.GIBSON A. M., BRATCHELL N. & ROBERTS T.A.

Predicting microbial growth : growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature.

International Journal of Food Microbiology, 1988.6 : 155-178.

28.GIBSON L. F.and J.T. KHOURY

Storage and survival of bacteria by ultra-freeze.

Lett. Appl.Microbiol. ,1986.3 :127-129.

29. GILL C.O.

Cold storage temperature fluctuations and predictive microbial growth.

Journal of Food Protection, Supplement ,1996. 43-47.

30.GRAY B.M. and H.C. DILLON.

Natural history of pneumococcal infections.

Pediatric infectious diseases, 1989. 8 : S23-25.

31. HEITZER A., KHOLER H-P.E., REICHEIRT P., HAMER G.

Utility of phenomenological models for describing temperature dependence of bacterial growth.

Applied and Environmental Microbiology, 1991. **57** :2656-2665

32. IOANNIDIS J.P., WORTHINGTON ., GRIFFITHS J.K. and SNYDMAN D.R.

Spectrum and significance of bacteraemia due to *Moraxella catarrhalis*.

Clinical Infectious Diseases, 1995. **21** :390-397.

33. KAIJALAINEN T., RUOKOKOSKI E., UKKONEN P., HERVA E

Survival of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* frozen in skim milk-trypton-glucose-glycerol medium.

Journal of Clinical Microbiology, jan. 2004. 412-414.

34. KILIAN M. & E. L. BIBERSTEIN

Haemophilus influenzae

In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 1, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1917 : 558-569

35. KNAPP J.S & R.J. RICE

Nisseria and *Branhamella*.

In : Manual of Clinical Microbiology 6th edition. American Society for Microbiology, Washington D. C., 1995:324-340

36. MAINIL J.

Bactériologie générale, 2004-2005 : 40-46.

37. MAYAUD C., A. PARROT, J. HOUQCINE, M. DENIS et G. AKOUN

Epidémiologie des germes responsables au cours de pneumopathies communautaires.

Revue Pneumologie Clinique, 1992. **48** :101-110.

38.McMEEKIN T.A. & OLLEY J.

Predictive Microbiology.

Food Technology in Australia, 1988. **8** :331-334.

39.METEZEAU P., MIGLIERINA R., RATINAUD M.H.

La cytométrie de Flux.

Presse de l'Université de Limoges, 1994.Limoges.

40.MONOD J.

Recherches sur la croissance des cultures bactériennes.

Thèse de Docteur ès sciences naturelles, 1941.Paris:13-60

41.MURPHY T.F.

Lung infections.2. *Branhamella catarrhalis* :epidemiology, surface antigenic structure, and immune reponse.

Microbiology rev. **60** : 267-279

42.NOCHIRI ENYINNAYA

An introduction to medical microbiology

Medical microbiology in the tropics,1975. **1** :10-15.

43.O'BRIEN K.L, BRONSDON M.A and col.

Evaluation of a medium(STGG) for transport and optimal recovery of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal secretions collected during field studies.

Journal of Clinical Microbiology, Mar.2001 :1021-1024.

44.OMS. Bureau regional pour l'Afrique.

Reseau de surveillance de la méningite à *Haemophilus influenzae* type b et autres méningites bactériennes en milieu pédiatrique (Hib-MBP).

Manuel de surveillance. Version d'essai sur le terrain, juillet 2001 :5-17

45.PANIKOV N.S.

Microbial growth kinetics. CHAPMAN&HALL, 1995 London.

46.PATTERSON T.F., J.E. PATTERSON, B.L. MASECAR, G.E. BARDEN, W.J. HIERHOLRER& M.J. ZERVOS.

A nosocomial outbreak of *Branhamella catarrhalis* confirmed by restriction endonuclease analysis.

*Journal of Infectious Diseases, 1988***157** :996-1001.

47.PITTMAN M.

Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*.

J. Exp.Med. **53** :471-492

48.RATKOWSKY D. A., ROSS T., McMEEKIN T .A ., & BALL A.

Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures.

*Journal of Bacteriology, 1982***149** : 1-5.

49. ROSSO L.

Modélisation et microbiologie prévisionnelle : élaboration d'un nouvel outil pour l'agro alimentaire.

Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1.

50.RUOFF K.L., KUNZ L.J.

Use of the rapid STREP system for identification of viridans streptococcal species.

*Journal of Clinical Microbiology, 1983***.18** :1138-1140.

51.SANAA M.

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

Epidemiol.et santé anim. 2002 .41 :169-177.

**52.SIBERRY G., BRAHMADATHAN K.N., PANDIAN R., LALITHA K.M.,
STEINHOFF M.C., JACOB JOHN T.**

Comparison of different culture media and storage temperature for the long-term preservation of *Streptococcus pneumoniae* in tropics

Bulletin of the World Health Organisation, 2001. 79 :43-47.

**53.VANEECHOUTE M., G. VERSCHRAEGEN, G. CLAEYS, B. WEISSE and A. M.
VAN DEN ABEELE.**

Respiratory tract carrier rates of *Moraxella catarrhalis* in adults and children and interpretation of the isolation of *Moraxella catarrhalis* from the sputum.

Journal of Clinical Microbiology, 1990. 28 : 2674-2680.

54.VERON M.

Croissance et nutrition bactériennes.

Bactériologie médicale, 1984. 2 :22-28.

**55. ZWIETERING M. H., KOOS J.T., HASENACK B.E., DE WIT J.C& VAN'T RIET
K.**

Modeling of the bacterial growth as the function of temperature.

Applied Environmental Microbiology, 1991. 57 :1094-1101.