

Les cocci à Gram positif sont des bactéries de forme arrondie appartenant à la famille des Micrococcaceae. Les genres *Staphylococcus* et *Streptococcus* regroupent une grande partie des bactéries à Gram positif pathogènes.

Les staphylocoques sont des germes aéro-anaérobies, immobiles, produisant une catalase et se regroupant en amas. Ils sont une composante importante de la flore humaine normale mais incluent des espèces qui peuvent être d'importants pathogènes.

Les streptocoques sont des germes aéro-anaérobies, immobiles; l'absence de catalase et leur mode de groupement en chaînettes permettent de les différencier des staphylocoques. Certaines espèces de streptocoques sont commensales des muqueuses de l'homme, mais elles peuvent, dans certaines circonstances, devenir pathogènes et entraîner des infections graves.

Les cocci à Gram positif occupent donc une place importante en pathologie infectieuse. Leur identification est facilitée depuis quelques années par l'utilisation de galeries biochimiques et métaboliques d'identification telles que les galeries API des laboratoires BioMérieux.

C'est dans cette optique que l'unité de recherche et de biotechnologie microbienne du laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide le Dantec a développé depuis la fin des années 90, des mini galeries d'identification : les Micro-CSB.

Il s'agit de plaques constituées de micro-cupules contenant des substrats déshydratés, ceux-ci permettent la mise en évidence d'activités enzymatiques ou d'assimilation de substrats carbonés en milieu hostile ou approprié.

L'efficacité et la fiabilité des Micro-CSB ont été prouvées et améliorées par des études antérieures telles que celles effectuées par N'DAO K. (1999); SARR T. (2004) et SOW M.F. (2007). Néanmoins elles nécessitent une incubation de 24h alors que dans le contexte actuel où les technologies et la recherche sont de plus en plus affinées, ceci combiné aux échecs thérapeutiques face à l'émergence de résistances, une identification rapide et efficiente est de rigueur.

Notre étude va consister en l'exploration de la micro-méthode CSB dans l'optique d'une réduction du temps d'incubation nécessaire à une bonne identification de ces germes. Pour cela notre travail sera organisé autour de trois points :

- La détermination de l'effet de l'inoculum sur la durée d'incubation des micro-plaques CSB.
- La détermination du temps minimum nécessaire à une bonne identification des bactéries en fonction de l'inoculum grâce aux micro-CSB.
- La validation des méthodes utilisées.

I. GENERALITES SUR LES STAPHYLOCOQUES

I.1. Définition et historique

Les espèces du genre *Staphylococcus* sont des bactéries à Gram positif de forme sphéroïde, d'environ un micromètre de diamètre possédant une catalase [25]. Elles sont dépourvues d'oxydase à part *Staphylococcus sciuri* et *Staphylococcus caseolyticus* [4].

En microscopie optique, les staphylocoques ont la particularité de former des amas cellulaires ayant l'apparence de grappes.

Les staphylocoques sont immobiles, ne forment pas de spores et sont généralement acapsulés ou possèdent la capacité d'élaborer une capsule réduite [25].

La plupart des espèces sont anaérobies facultatives [25].

Les staphylocoques ont été découverts par d'éminents microbiologistes tels que **Koch, Pasteur, Ogston, Rosenbach**.

En **1878**, **Koch** souligne le rôle pathogène des bactéries sous forme de cocci colorés positivement par le réactif de Gram.

Ces cocci seront ensuite isolés et identifiés d'un pus par **Pasteur** en **1880**, puis baptisés par **Ogston** sous le nom de staphylocoques en **1883** [29].

En **1884**, **Rosenbach** obtient des cultures pures de ces cocci et les scinde en deux groupes en fonction de la coloration blanche ou dorée de leurs colonies [41].

I.2. Classification

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des Micrococcaceae qui, dans l'édition du Bergey's Manual de 1986, comprend 3 autres genres : *Micrococcus*, *Planococcus*, et *Stomatococcus*.

La classification actuelle des staphylocoques distingue 35 espèces (44 espèces et sous espèces) [7].

Sur la base des critères pris en compte, il existe plusieurs classifications des espèces du genre *Staphylococcus*.

Ces critères peuvent s'avérer être des caractères phénotypiques, des caractères génomiques, une association de caractères génomiques et de certains caractères phénotypiques. Cependant ces espèces peuvent être classées tout simplement grâce à leur hôte habituel [29].

➤ **Classification selon l'hôte [29]**

Les staphylocoques représentent l'essentiel de la flore résidente de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux. Ils peuvent ainsi être classés en fonction de l'hôte.

➤ **Classification en fonction de l'homologie ADN-ADN
et de certains caractères phénotypiques [25].**

Cette classification est basée à la fois sur la variété d'analyses des caractères phénotypiques et sur les degrés d'homologie ADN-ADN génomique.

L'homologie ADN-ADN est aujourd'hui considérée comme le facteur le plus valable pour classer les espèces de staphylocoques. Certains caractères phénotypiques spécifiquement sélectionnés, peuvent s'avérer utiles parce qu'ils peuvent apporter une haute valeur prédictive dans l'identification des groupes d'homologie en ADN.

Les caractères étudiés font partie des schémas d'identification. Les relations obtenues permettent de regrouper les espèces de staphylocoques en 6 principaux groupes d'espèces qui sont :

- le groupe *S. epidermidis* ;
- le groupe *S. saprophyticus* ;
- le groupe *S. simulans* ;
- le groupe *S. intermedius* ;
- le groupe *S. hyicus* ;
- le groupe *S. sciuri*.

➤ **Autres classifications [41]**

Il est important de noter qu'il existe d'autres classifications telles que :

- la classification de **Baird-Parker** qui ne reconnaît que *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus* comme espèces de staphylocoques bien déterminées avec 4 biotypes pour chaque espèce ;
- la classification de **Kloos et Schleifer** qui ne reconnaît que dix espèces dans le genre staphylocoque avec 15% des espèces de staphylocoques non classés.

I.3. Habitat [28, 38]

Les staphylocoques sont très répandus dans la nature même s'ils sont le plus souvent retrouvés sur la peau et les muqueuses des mammifères et des oiseaux. Ils peuvent être retrouvés au niveau des muqueuses buccales, du sang, des glandes mammaires, intestinales, génito-urinaires et au niveau des voies respiratoires supérieures de leurs hôtes.

Ces germes vivent le plus souvent à l'état commensal chez leurs hôtes mais peuvent devenir pathogènes lorsqu'ils franchissent la barrière cutanée à l'occasion de traumatismes.

Certaines espèces de staphylocoques sont préférentiellement retrouvées chez certains hôtes plus que chez d'autres. L'homme est le principal réservoir de *S. aureus* qui est présent chez 30% des individus normaux, la transmission est interhumaine. Certaines espèces sont plus fréquemment isolées des infections humaines et animales telles que: *S. aureus* et *S. epidermidis*.

I.4. Pouvoir pathogène [4,27]

Les staphylocoques sont les agents de nombreuses infections regroupées sous le nom de staphylococcies. Ces staphylococcies, dont les manifestations cliniques en dehors des septicémies sont très polymorphes, peuvent avoir des localisations multiples, avec une évolution aiguë ou chronique et un pronostic bénin ou grave.

En fonction de leurs localisations, on peut noter des :

- toxi-infections alimentaires ;
- septicémies ;
- infections cutanées ou sous cutanées ;
- infections oto-rhino-laryngologiques et ophtalmologiques ;
- infections ostéo-articulaires ;
- infections uro-génitales ;
- infections pleuro-pulmonaires ;
- etc.

Les infections staphylococciques sont favorisées par un certain nombre de facteurs généraux, en particulier des facteurs de terrain (avitaminoses, troubles nutritionnels, dérèglements hormonaux, état diabétique, etc.).

S. aureus est le germe le plus pathogène du genre *Staphylococcus*, il est responsable de la plupart des infections staphylococciques. Il est important de le différencier des autres staphylocoques à coagulase négative, ceux-ci sont des agents opportunistes pathogènes occasionnellement rencontrés dans les infections humaines (voir **tableau I**).

**Tableau I : Classification des Staphylocoques responsables
d'infections humaines**

	Espèces	Sous-espèces	Groupes
STAPHYLOCOQUES COAGULASE POSITIVE	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>aureus</i> <i>anaerobius</i>	
STAPHYLOCOQUES COAGULASE NEGATIVE	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus capitis</i> <i>Staphylococcus capitis</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus lugdunensis</i> <i>Staphylococcus saccharolyticus</i> <i>Staphylococcus warneri</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Staphylococcus cohnii</i> <i>Staphylococcus cohnii</i>	<i>capitis</i> <i>ureolyticus</i> <i>hominis</i> <i>novobiosepticus</i> <i>cohnii</i> <i>ureolyticus</i>	 Groupe <i>S.epidermidis</i> Groupe <i>S. saprophyticus</i>
STAPHYLOCOQUES COAGULASE POSITIVE	<i>Staphylococcus caprae</i> <i>Staphylococcus hyicus</i> <i>Staphylococcus intermedius</i> <i>Staphylococcus schleiferi</i> <i>Staphylococcus schleiferi</i> <i>Staphylococcus simulans</i>	<i>coagulans</i> <i>schleiferi</i>	

I.5. Caractères bactériologiques

I.5.1. Caractères morphologiques [27,29]

A l'examen microscopique, les staphylocoques se présentent sous forme de coques groupées en petits amas, en diplocoques ou en très courtes chaînettes positivement colorés au Gram.

Le mode de groupement en amas (plus caractéristique après culture sur milieu gélosé) s'explique par le mode de division cellulaire des staphylocoques. Cette division s'effectue en trois plans successifs et perpendiculaires les uns aux autres, et les cellules filles ne se séparent pas complètement de la cellule mère dont elles sont issues.

Sur le plan individuel, ce sont des cocci mesurant entre 0,5 et 1,2 μm , immobiles, non sporulés, généralement non capsulés ou ayant une faible capacité de synthèse de capsule.

I.5.2. Caractères cultureux

Les staphylocoques sont des germes aéro-anaérobies facultatifs [29]. Ils poussent sur la plupart des milieux usuels incluant ceux contenant une concentration élevée en NaCl (environ 7,5%) [8]. Toutes les espèces produisent un pigment insoluble dans l'eau dont la couleur peut varier du blanc porcelaine (*S. epidermidis*) au jaune doré (*S. aureus*) [8].

Certaines souches nécessitent une forte pression en CO_2 pour une croissance optimale ainsi que d'autres métabolites tels que l'hémine ou la ménadione [37]. Cependant, certains facteurs de croissance tels que la vitamine B₁ et l'acide nicotinique sont indispensables pour la multiplication des staphylocoques.

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

Dans un bouillon, leur croissance entraîne un trouble uniforme abondant en 24h avec un dépôt pulvérulent ; il n'y a pas de production de pigment en milieu liquide [27, 41].

Sur gélose les colonies de staphylocoques sont arrondies, mesurant 1 à 2 mm de diamètre, humides, opaques, luisantes et crémeuses, à surface lisse et brillante et aux bords réguliers [27].

En milieu gélosé au sang, on observe fréquemment une zone claire dite d'hémolyse bêta autour des colonies. Cette hémolyse est due au fait que certaines espèces de staphylocoques, en particulier *S. aureus*, produisent des hémolysines [32].

Les staphylocoques poussent sur des milieux contenant des inhibiteurs pour d'autres bactéries : tellurite de potassium (milieu Baird-Parker au tellurite de potassium), cristal violet, concentration de NaCl à 7,5% (milieu Chapman), etc. [27].

A 4°C les staphylocoques conservent leur vitalité pendant trois mois dans le pus et pendant un an sur gélose. Ils sont détruits par une incubation de 60 mn à 58°C.

I.5.3. Caractères biochimiques et métaboliques

En pratique la distinction des différentes espèces de staphylocoques est basée sur la variabilité de leurs caractères biochimiques.

I.5.3.1. Caractères généraux

Les staphylocoques possèdent une catalase à l'exception de *Staphylococcus aureus* sous espèce *anaerobius* que l'on retrouve exclusivement chez les moutons et qui est une souche anaérobie stricte.

Ce sont des germes dépourvus d'oxydase en dehors de *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus sciuri* et *Staphylococcus caseolyticus*.

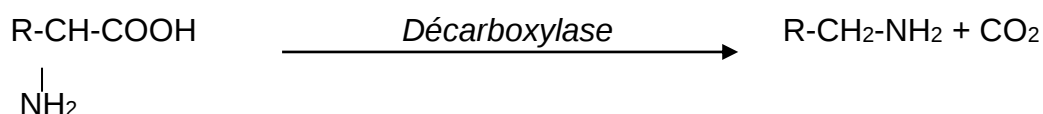
I.5.3.2. Utilisation des hydrates de carbone

Les glucides sont utilisés de trois manières différentes par les staphylocoques : soit après conversion par l'action d'isomérases, soit après hydrolyse en sucres simples soit encore directement s'ils sont fournis sous une forme simple (glucose, fructose etc.) [24].

L'assimilation étudiée surtout par la voie fermentaire mais également par la voie oxydative se traduit presque toujours par l'accumulation de dérivés acides quelle que soit la voie de dégradation [29].

I.5.3.3. Production de décarboxylases [21]

Les décarboxylases sont des enzymes actives à pH acide (entre 3,5 et 5,5) ; elles scindent les acides aminés entraînant ainsi la formation de l'amine correspondante avec libération du dioxyde de carbone selon la réaction suivante :



Les décarboxylases les plus recherchées sont :

- l'ornithine décarboxylase : ODC ;
- l'arginine dihydrolase : ADH ;
- la lysine décarboxylase : LDC.

I.5.3.4. Production d'uréase [21]

Les bactéries hydrolysent toute l'urée mais seules celles ayant une uréase constitutive, c'est à dire dont la synthèse est indépendante de la présence du substrat, vont arriver à alcaliniser le milieu entraînant ainsi le virage de l'indicateur coloré.

L'uréase est également une enzyme inductible et son action aboutit à la formation d'ions ammoniums.

I.5.3.5. Production de bêta-galactosidase [21]

La β -galactosidase est une enzyme bactérienne inductible existant à un niveau de base dans le milieu intracellulaire. Cette enzyme est capable de scinder la molécule de lactose en sucres simples que sont le glucose et le galactose après avoir traversé la paroi cellulaire sous l'action de la β -galactosidase perméase.

Le terme ONPG hydrolase est plus à propos que celui de β -galactosidase dans la mesure où il précise que le substrat utilisé est l'ONPG et non le lactose.

Le test à l'ONPG est une technique relativement simple basée sur l'action directe de l'enzyme sur une molécule chromogène pouvant être l'ortho-nitrophényl- β -D-galactopyranoside, ou le 2-naphtol β -D-galactopyranoside.

I.5.3.6. Production d'acétoïne [29]

L'acétoïne en langage courant, ou hydroxy-3-butanone ou encore dans la nomenclature ancienne acétyl-méthyl-carbinol (AMC) est un produit de dégradation du glucose au cours de la fermentation du 2-3 butylène glycolique en passant par l'acétolactate et le diacétyl. Elle peut également être obtenue par condensation de deux molécules de pyruvate.

Il existe entre autres, la méthode conventionnelle de Voges-Proskauer qui permet la mise en évidence de cette molécule.

I.5.3.7. Réduction des nitrates

Elle fait intervenir une enzyme : la nitrate réductase, celle-ci est responsable de la réduction des nitrates en nitrites.

La nitrate réductase est produite par certaines souches de staphylocoques et constitue un des caractères biochimiques et taxonomiques utilisés pour leur identification [29].

Staphylocoques aureus a un système respiratoire associé à la nitrate réductase, celle-ci utilise le L-lactate comme donneur d'hydrogène. La totalité de l'activité nitrate réductase utilisant le L-lactate a été localisée au niveau de la membrane plasmique où elle est souvent couplée à des déshydrogénases. Cependant, elle peut être rencontrée au niveau du cytoplasme [10].

I.5.4. Caractères antigéniques

Il existe trois groupes d'antigènes somatiques chez *S. aureus* :

- les antigènes pariétaux caractéristiques de l'espèce ;
- les antigènes pariétaux de type ;
- les antigènes de surface.

I.5.4.1. Les antigènes pariétaux

- **Le peptidoglycane [22, 29]**

Le peptidoglycane est constitué d'un enchaînement linéaire de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique.

Il possède une activité adjuvante et mitogène sur les lymphocytes B et pourrait induire les cellules immunosuppressives.

Il est reconnu comme étant responsable d'effets toxiques semblables à ceux observés avec l'endotoxine.

- **La protéine de type [17, 18, 32]**

Il s'agit d'une holoprotéine élaborée par 90% des souches de *S. aureus* d'origine humaine, mais également par toutes les souches coagulase négative possédant une thermonucléase.

Sa structure est subdivisée en deux régions fonctionnellement distinctes dont la région N-terminale qui se fixe sur les IgG au niveau de leur fraction Fc. Cette propriété lui permet d'interférer avec le système immunitaire, ce qui explique son utilisation en thérapeutique pour réduire le taux des complexes immuns circulants.

Elle active le complément, déclenche la réaction inflammatoire et induit l'hypersensibilité retardée et immédiate. Elle est mitogène et cytotoxique.

- **Les acides teichoïques [17, 32, 38]**

Ce sont des polymères linéaires de ribitol ou de glycérol, unis par des liaisons phosphodiesters et substitués.

Les acides glycol teichoïques sont retrouvés chez tous les staphylocoques à l'exception de *S. aureus* et *S. saprophyticus* chez lesquels on retrouve l'acide ribitol teichoïque.

Leur activité biologique est peu connue, mais il semble qu'ils soient impliqués dans l'activation du complément et peut être dans l'adhésion de ces germes aux cellules de la muqueuse.

I.5.4.2. Les antigènes pariétaux de type [17]

Toutes les souches de staphylocoques possèdent des antigènes pariétaux de type ; ce sont ces antigènes qui sont recherchés lors des réactions d'agglutination.

I.5.4.3. Les antigènes de surface ou antigènes capsulaires

[8, 16,17, 18, 32, 38]

Malgré la longue controverse qu'il y a eu concernant leur capacité à produire une capsule : les souches de *S. aureus* peuvent posséder soit une vraie capsule, soit une pseudocapsule ou microcapsule.

La capsule vraie, visible en microscopie optique après coloration négative par l'encre de Chine est retrouvée chez certaines souches.

La pseudocapsule qui est une fine couche polysaccharidique externe dénommée "Slime" n'est pas visible en microscopie optique. Il s'agit d'une substance amorphe entourant la bactérie, lui conférant une propriété d'adhésion aux surfaces extérieures. Elle se distingue de la capsule tant sur le plan morphologique que sur le plan chimique.

Cette capsule lorsqu'elle est présente peut empêcher la phagocytose mais certainement pas avec la même efficacité que chez le pneumocoque ou le méningocoque.

II. GENERALITES SUR LES STREPTOCOQUES ET ENTEROCOQUES

II.1. Définition et historique [26, 40]

Les streptocoques sont des cellules habituellement sphériques ou ovalaires mesurant moins de 2 µm de diamètre.

Ils sont immobiles, dépourvus de catalase et d'oxydase et sont positivement colorés au Gram.

La plupart des souches de streptocoques sont aéro-anaérobies facultatives. Cependant certaines souches requièrent un milieu enrichi en CO₂ pour croître alors que d'autres sont anaérobies strictes.

Au microscope les streptocoques apparaissent en paires ou en chaînettes. Cette disposition résulte d'une division cellulaire en un plan et est plus caractéristique des souches obtenues grâce à une culture en milieu liquide.

Les streptocoques ont des exigences nutritionnelles variables et complexes.

Le nom de *Streptococcus* (streptus : flexible, coccus : grain) fut attribué pour la première fois par **Bilroth** et **Ehrlich (1877)** à des cocci formant des chaînettes et isolés de blessures infectées.

En **1884 Rosenbach** donna le nom de *Streptococcus pyogenes* à des cocci en chaînettes isolés de lésions suppuratives chez l'homme.

Pasteur, Chamberland et **Roux** rendirent compte de septicémies chez des lapins inoculés de salive humaine en **1881**; cette expérience fut la première référence à *Streptococcus pneumoniae* qui fut plus amplement décrit par **Fraenkel** et **Weishselbaum** en **1886**.

En **1887 Nocard** et **Mollereau** découvrirent le streptocoque de la mammite de Nocard qui ensuite fut appelé *Streptococcus agalactiae*.

En **1933 Lancefield** découvrit les groupes sérologiques des streptocoques de A à F.

En **1984 Schleifer** réalisa la séparation des deux genres *Streptococcus* et *Enterococcus*.

II.2. Taxonomie [8, 19, 26, 36, 38]

Trois principaux caractères des streptocoques sont utilisés pour leur classification : la capacité d'hémolyser les érythrocytes, la présence d'antigènes polysidiques spécifiques de groupe dans la paroi cellulaire et l'utilisation des réactions biochimiques spécifiques.

- **Le pouvoir hémolytique:**

L'hémolyse peut être :

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

- **Le groupe antigénique :**

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

- **Propriétés bactériologiques :**

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

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

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

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

II.3. Pouvoir pathogène naturel [26, 40]

Les streptocoques peuvent être responsables d'un grand nombre d'infections humaines; Le groupe A est le plus pathogène mais un bon nombre des autres espèces peut être impliqué dans les maladies humaines, souvent comme infections opportunistes.

▪ Les streptocoques des groupes A, C et G

La présence de ces groupes de streptocoques dans l'organisme humain a une haute signification pathologique. Ils provoquent de multiples suppurations dont chacune peut être à l'origine de différentes complications septiques. Cependant, les streptocoques du groupe A sont les plus fréquemment rencontrés et ces souches sont les seuls agents étiologiques de la scarlatine et surtout des complications non suppuratives : rhumatisme articulaire aigu, glomérulonéphrite aiguë, érythème noueux, chorée.

L'infection la plus fréquente est l'angine rouge compliquée ou non d'abcès péri-amygdaliens, d'otites, de mastoïdes, de méningites, de pneumonies, ou d'endocardites aiguës.

Les principales infections cutanées sont l'impétigo et l'érysipèle.

Les streptocoques des groupes A et G ont aussi été incriminés comme agents de toxi-infections alimentaires.

▪ Les streptocoques du groupe B

Les streptocoques du groupe B sont des germes commensaux des voies respiratoires supérieures, des voies génito-urinaires et de l'intestin. Cependant, des infections très sévères ont été décrites chez l'adulte ainsi que chez le nouveau-né.

Les infections rapportées chez l'adulte sont les suivantes : infections urinaires, génitales, puerpérales, endocardites aiguës, pneumonies, méningites, septicémies, cellulites chez les diabétiques, péritonites chez les cirrhotiques et diverses infections chez les immunodéprimés.

L'importance des streptocoques du groupe B comme agent d'infections néonatales très graves, est à présent établie. Deux syndromes cliniquement distincts ont été bien définis chez ces enfants :

- **l'attaque précoce** qui est une attaque aiguë de type septicémique associée à des complications obstétricales de la mère et apparaissant dans les 48 h après l'accouchement ;
- **l'attaque tardive** de type méningitique sans complications obstétricales et observée chez les nourrissons après leur première semaine de vie ; elle serait liée à une infection nosocomiale.

▪ Les streptocoques du groupe D

Les streptocoques du groupe D sont considérés comme les moins pathogènes parmi ce genre.

Les entérocoques étaient anciennement classés dans ce groupe et l'espèce *S. faecalis* aujourd'hui *Enterococcus faecalis* est la plus fréquemment rencontrée.

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

E. faecalis est également un agent non spécifique de toxi-infections alimentaires dues à la présence dans les aliments ingérés de toxines élaborées avant la consommation.

II.4. Habitat [27, 34, 36, 38]

Les streptocoques sont des germes ubiquitaires retrouvés presque partout : muqueuses, peau, sol, eau, air, etc. Ce sont des germes fragiles qui en fonction de leur habitat peuvent être saprophytes ou commensaux.

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

S. pyogenes est un germe fragile qui ne survit pas longtemps dans le milieu extérieur.

Enterococcus faecalis est un germe habituel de la peau, des muqueuses des voies aériennes supérieures, cependant il est plus souvent rencontré au niveau de la flore intestinale de l'homme et des animaux.

II.5. Caractères bactériologiques

II.5.1. Caractères morphologiques [26, 28, 40]

Les streptocoques sont des coques mesurant moins de 2 µm de diamètre ovoïdes ou sphériques, à Gram positif groupés en chaînettes.

La formation de chaînettes est souvent observée dans les lésions ouvertes et les milieux artificiels alors que dans les lésions actives, étendues et profondes, les streptocoques sont sous forme coccale individuelle ou en diplocoques.

Les chaînettes résultent de la non séparation des paires de cocci après leur division et se présentent comme une succession de diplocoques.

La capsulation est un caractère irrégulier chez les streptocoques, certaines souches de streptocoques peuvent produire une capsule constituée d'acide hyaluronique. Ainsi, les streptocoques des groupes A et C peuvent produire une capsule dans la phase exponentielle de la croissance.

Les streptocoques ne possèdent pas d'endospores.

II.5.2. Caractères cultureux [22, 28,40]

La température de croissance des streptocoques est comprise entre 20 et 42°C avec un optimum entre 35 et 37°C. L'incubation se fait en milieu enrichi en CO₂, à l'étuve pendant 24 h.

Les streptocoques sont dans la plupart des cas aéro-anaérobies facultatifs et supportent l'oxygène malgré l'absence de catalase et de cytochrome ; néanmoins ce sont des germes très fragiles.

La plupart des streptocoques poussent sur les milieux de culture usuels ; sur gélose ils donnent des colonies bleutées, très fines, transparentes et dispersées à la surface en grain de semoule. Cette culture est toutefois difficile car ces germes ont des exigences nutritives complexes.

La croissance en bouillon nutritif est variable selon l'âge de la culture et l'espèce, et n'a pas de valeur diagnostique. Les streptocoques peuvent montrer soit un trouble homogène avec ou sans dépôt (groupes B et D), soit une pousse granulaire avec ou sans sédimentation rapide ainsi qu'un surnageant limpide ou légèrement trouble (groupes A, C et G).

Les milieux enrichis doivent contenir des peptones, des extraits de viande ou de l'infusion de cœur, cervelle et doivent également être enrichis de sang, de sérum et/ou d'ascite.

Dans les milieux glucosés, les streptocoques ne survivent pas car le glucose est fermenté en acide lactique ce qui rend le milieu hostile à la croissance de ces germes. Il est donc préférable d'utiliser un bouillon glucosé tamponné (BGT).

Sur les milieux nutritifs gélosés additionnés de 5% de sang de cheval ou de mouton ou de sérum de cheval ou encore de veau, la taille et l'aspect des colonies de streptocoques varient selon l'espèce et le milieu de base utilisé.

Les colonies des souches des groupes A, C et G sont transparentes, bombées ou en dôme ; leur surface peut être lisse, muqueuse ou rugueuse et à bord régulier, elles ont un diamètre d'environ 0,5 mm.

Le pouvoir hémolytique des streptocoques est mis en évidence en utilisant un milieu de base dépourvu de sucres fermentables, avec un pH entre 7,3 et 7,4. Ces milieux contiennent 5% de sang de cheval ou de mouton et sont coulés en couches minces sur boîte de pétri. Le sang de cheval est préférable puisqu'il permet la mise en évidence de l'hémolyse de *E.feacalis var zymogenes* qui est non hémolytique sur milieu additionné de sang de mouton.

Sur ces milieux, les souches de streptocoques peuvent entraîner différents types d'hémolyses :

- **hémolyse bêta**

Il s'agit d'une hémolyse totale sur une zone de 3 à 4 mm de diamètre autour des colonies de streptocoques.

- **hémolyse alpha**

Elle apparaît sous forme d'une zone d'hémolyse floue et granuleuse de 1 à 2 mm diamètre avec parfois une coloration verdâtre qui entoure la colonie : dans ce cas l'hémolyse est alpha-viridans.

- **hémolyse gamma**

Il n'y a pas d'hémolyse. Elle est observée dans le cas de streptocoques non hémolytiques.

II.5.3. Caractères biochimiques

II.5.3.1. Paroi et constitution antigénique [8, 26]

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

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

➤ Les protéines

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

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

➤ **Le polyoside C**

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

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

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

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

➤ **Le mucopeptide**

Encore appelé peptidoglycane, le mucopeptide est responsable de la rigidité de la paroi streptococcique.

Il est le substrat d'enzymes muralytiques (lysozymes, protéases) qui attaquent la paroi cellulaire et produisent la lyse de la bactérie.

II.5.3.2. Absence de catalase [8, 15]

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

L'absence de catalase constitue un caractère biochimique important ; il permet de faire le diagnostic différentiel entre streptocoques et staphylocoques.

II.5.3.3. Sensibilité à la bacitracine [28, 40]

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

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

Depuis que la sensibilité à la bacitracine n'est plus spécifique des streptocoques du groupe A, des tests complémentaires d'identification sont recommandés.

II.5.3.4. Hydrolyse de l'esculine [22]

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

III. PHYSIOLOGIE ET CROISSANCE BACTERIENNES

Pour se maintenir, croître et se reproduire, les bactéries doivent trouver les conditions physico-chimiques ainsi que les aliments qui leur sont nécessaires [16]. La croissance bactérienne correspond à une augmentation de tous les constituants cellulaires de la bactérie [38]. Cette croissance est dépendante de la composition de l'environnement qui fournit toutes les substances indispensables et les conditions convenables au développement de la bactérie [3].

III.1. Nutrition [3, 16, 27]

Les bactéries ont toutes des besoins communs de base, comme l'eau, des sources d'énergie et de nutriments tels que les sources de carbone, d'azote et des éléments nécessaires aux biosynthèses.

Les éléments les plus importants sont : l'eau, le carbone, l'oxygène, l'azote l'hydrogène, le phosphore et le soufre.

Certaines bactéries exigent de faibles concentrations d'ions tels que le magnésium, le potassium, le sodium, le chlore, le fer et le calcium et des quantités infinitésimales de cuivre, de zinc, de manganèse, de cobalt, de molybdène de vanadium, de bore et d'iode.

- **L'eau**

L'eau représente 80 à 90 % du poids de la bactérie. Les micro-organismes exigent un seuil d'humidité et la réduction de l'eau du milieu en dessous de ce seuil, entraîne un ralentissement de leur croissance.

- **Le carbone**

Le CO₂ de l'air constitue la source de carbone de certaines bactéries, celles-ci sont dites autotrophes pour le carbone. Par ailleurs, une source d'énergie, généralement un sucre, doit leur être fourni.

Le carbone organique est la source habituelle de carbone des bactéries chimio-organotrophes. Ces bactéries sont hétérotrophes et la source usuelle est le substrat énergétique.

- **L'azote**

Le plus souvent c'est l'azote ammoniacal qui est utilisé par les bactéries chimio-organotrophes. Certaines bactéries peuvent utiliser des nitrates, des nitrites ou des acides aminés. Quelques espèces telluriques peuvent fixer l'azote de l'air.

- **Le soufre**

Le soufre, nécessaire à la synthèse de certains acides aminés est fourni par les sulfates mais certaines espèces exigent la cystéine.

- **Le phosphore**

Le phosphore indispensable pour la synthèse des acides nucléiques est fourni par les phosphates.

- **Le fer**

Chez les bactéries pathogènes, le fer est récupéré des protéines de transport du fer de l'organisme eucaryote.

- **Autres éléments minéraux**

Les autres éléments minéraux déjà cités sont apportés sous forme de traces par les substances chimiques qui entrent dans la composition des milieux de culture : ce sont des oligo-éléments qui ne sont nécessaires qu'à de très faibles concentrations.

- **Facteurs de croissance**

Ce sont des composés organiques, nécessaires comme constituants cellulaires ou comme précurseurs de composants cellulaires que la bactérie est incapable de synthétiser à partir des nutriments principaux. Ils doivent donc être introduits comme nutriments.

III.2. Métabolisme bactérien

III.2.1. Métabolisme général [3, 30, 36]

Pour pénétrer dans la cellule, les nutriments doivent franchir la paroi et la membrane plasmique. Certains nutriments comme le glycérol le font par simple diffusion passive (sans apport d'énergie) grâce à un gradient de concentration. La diffusion peut être accélérée par des enzymes membranaires inductibles : les perméases.

D'autres nutriments (sucres, acides aminés) nécessitent un transport actif avec un apport énergétique fourni par l'ATP. Ce type d'absorption se fait contre un gradient de concentration et fait intervenir des systèmes transmembranaires comme les protéines de transport.

Les sucres sont synthétisés lors de la photosynthèse chez les phototrophes. Chez les organotrophes, ils sont retrouvés dans le milieu sous forme de mono ou de polysaccharides ou alors synthétisés à partir de molécules organiques. Le catabolisme des lipides peut également fournir des sucres.

Pour le catabolisme des glucides, la glycolyse et le cycle de Krebs constituent les voies les plus importantes. Ces voies fonctionnent dans les 2 sens et fournissent à la cellule de l'énergie et des matières premières carbonées à partir desquelles beaucoup de composés bactériens sont synthétisés.

Par exemple, le glucose peut être oxydé selon plusieurs voies dont : la voie des pentoses, la glycolyse et la voie d'Entner-Doudoroff.

Les acides aminés peuvent être soit des facteurs de croissance soit synthétisés par la bactérie elle-même. Les squelettes carbonés sont fournis à la suite de la dégradation des glucides par la voie intermédiaire et l'azote aminé est apporté par l'ammoniac, les nitrates et les nitrites.

Beaucoup de bactéries dégradent fortement les protéines grâce à des protéases. Ces réactions sont impliquées dans le processus infectieux de la dégradation des aliments protéiques et des cadavres.

Les acides aminés sont catabolisés par désamination. Les acides organiques obtenus peuvent alors être incorporés dans les voies amphiboliques du métabolisme intermédiaire, notamment dans le cycle de Krebs. De cette façon, les bactéries peuvent utiliser les protéines comme source d'énergie et de carbone.

Les lipides bactériens sont des esters de glycérol et d'acides gras monocarboxyliques à chaîne le plus souvent non ramifiée et à nombre paire. Le nombre de carbone est en moyenne de 18 unités. Ils sont retrouvés surtout dans les membranes et la paroi. Les acides gras bactériens peuvent être saturés ou non, ils sont synthétisés à partir de l'acétyl-CoA par des réductions impliquant le couple $\text{NADPH}, \text{H}^+ / \text{NADP}^+$.

Les lipides sont catabolisés par des lipases bactériennes en glycérol et en acides gras. Le glycérol phosphorylé en glycérol phosphate, puis oxydé en dihydroxyacetone-phosphate est incorporé dans la glycolyse et constitue ainsi une source d'énergie.

Les acides gras sont dégradés par β -oxydation en acétyl-CoA qui est incorporé au cycle de Krebs.

III.2.2. Métabolisme énergétique [3, 30, 36]

La lumière solaire est la source d'énergie des bactéries phototrophes par le biais de la photosynthèse ; cependant, la plupart des bactéries d'intérêt médical sont chimiotrophes.

Les bactéries chimiotrophes consomment l'énergie chimique emmagasinée par les organismes phototrophes. Elles tirent leur énergie de l'oxydation d'un substrat chimique qui est un donneur d'électrons, cette réaction nécessite aussi la présence d'un accepteur d'électrons.

Pour les chimio-lithotrophes le donneur d'électrons est minéral (sel ammonium, nitrite, etc.) et l'accepteur peut être l'oxygène, le nitrate, le soufre, etc.

Pour les chimio-organotrophes le donneur est une substance organique souvent un sucre et l'accepteur est souvent l'oxygène mais peut être un nitrate, un sulfate, etc.

Globalement, l'énergie libérée par l'oxydation d'un substrat comme le glucose est énorme pour la cellule, il existe donc un mécanisme permettant de la récupérer progressivement en petites fractions et d'en tirer un rendement maximum.

Outre l'énergie, les réactions d'oxydation produisent des électrons et des protons H^+ . Un système de co-enzymes d'oxydo-réduction assure le transport des électrons et des protons du substrat oxydé vers l'accepteur d'électron réduit.

Le substrat énergétique est le plus souvent un sucre (glucose). L'accepteur final d'électrons est le plus souvent l' O_2 (respiration aérobie), mais peut aussi être un composé minéral du milieu (respiration anaérobie) ou un métabolite (fermentation).

Les substrats énergétiques les plus utilisés sont des monosaccharides et le plus souvent ils sont convertis en glucose. D'autres nutriments peuvent être utilisés comme sources d'énergie mais ils le sont soit, après leur transformation en sucres, soit parce que l'un de leurs catabolites peut s'intégrer dans le catabolisme des glucides.

Les voies de dégradation des glucides aboutissent au pyruvate qui est dégradé par deux voies : la respiration et la fermentation.

- **La respiration**

Dans le cycle de Krebs, le pyruvate, *via* l'acétyl CoA, est transformé en CO_2 avec réduction des co-enzymes transporteurs de protons et d'électrons ($NADH_2$, $NADPH_2$, $FADH_2$).

Ces co-enzymes sont réoxydés dans la chaîne respiratoire des cytochromes avec production d'ATP.

Les électrons et protons H^+ sont transportés vers l'accepteur final et selon la nature de cet accepteur on distingue :

- la respiration aérobie où l'accepteur est l'oxygène ;
- la respiration anaérobie où l'accepteur est un composé inorganique différent de O_2 , il peut s'agir de nitrates, sulfates, etc.

- **Les fermentations**

Les fermentations constituent un ensemble de voies métaboliques dont l'origine est le pyruvate. Elles aboutissent à des produits organiques variés (alcools, acides, etc.) qui sont des produits de la réduction du pyruvate. Cette réaction s'accompagne de l'oxydation des co-enzymes transporteurs de protons et d'électrons.

L'énergie fournie par les fermentations est très inférieure à celle fournie par la respiration.

Les fermentations lactiques et alcooliques sont deux exemples classiques.

III.3. Croissance bactérienne

III.3.1. Définition [3]

La croissance bactérienne se définit comme l'accroissement ordonné et coordonné de tous les constituants du micro-organisme unicellulaire, jusqu'à une dimension limite, qui normalement conduit à la division cellulaire par scission binaire. Il en résulte une augmentation du nombre d'individus et une augmentation de la masse cellulaire.

III.3.2. La courbe de la croissance bactérienne [3, 16, 36]

La croissance est définie par deux constantes : le temps de génération et le taux de croissance.

Le temps de génération (g) est l'intervalle de temps entre deux divisions successives ou celui nécessaire au dédoublement de la population.

Le taux de croissance (μ) est le nombre de divisions par unité de temps, il est l'inverse du temps de génération.

Lorsque le milieu de culture convient à la bactérie étudiée, les conditions de pH et de température correctes, le volume du milieu relativement élevé et le milieu régulièrement agité, la croissance bactérienne peut être prédite par une loi exponentielle. **(cf. figure 1).**

La vitesse de la croissance au temps t est définie par une équation dans laquelle dm est la variation de la masse bactérienne pendant un temps dt et μ est le taux de croissance.

$$\mu = \frac{dm}{dt}$$

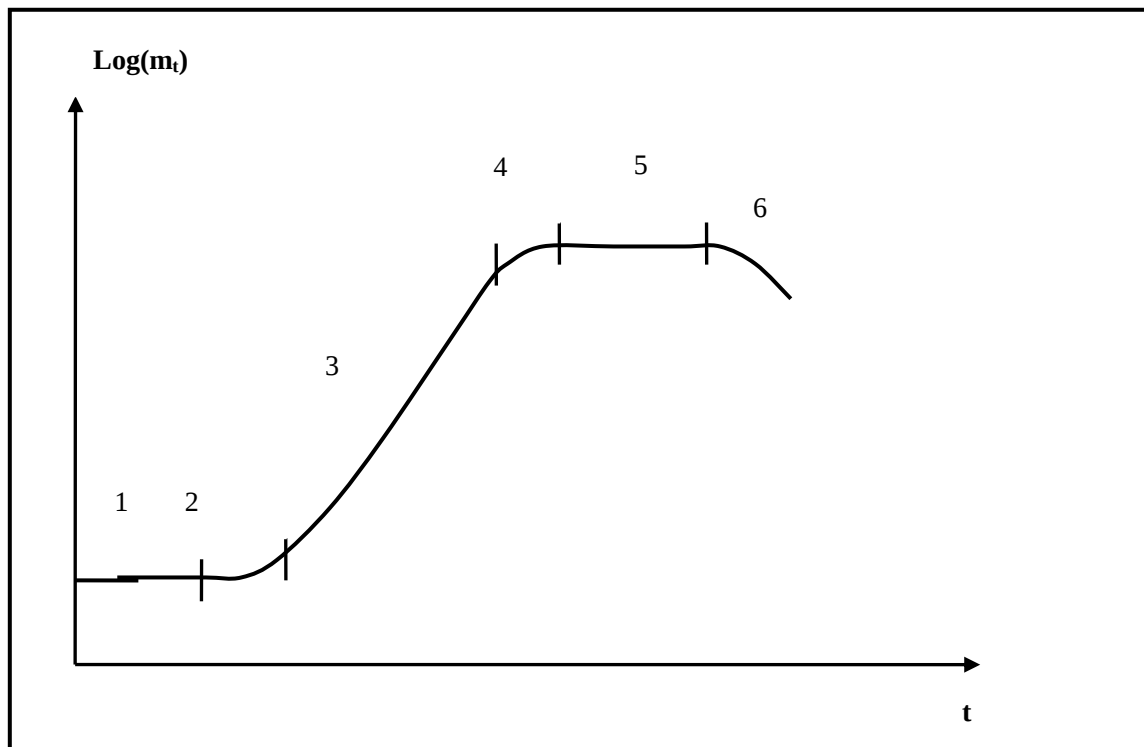


Figure 1 : Courbe expérimentale de la croissance en milieu liquide [16]

1 = Latence

2 = Accélération

3 = Phase exponentielle

4 = Décélération

5 = Phase stationnaire

6 = Déclin

La courbe de croissance en milieu liquide se caractérise par 6 phases qui sont caractérisées par des valeurs différentes de μ .

La phase de latence (1) où $\mu = 0$, correspond à la phase d'adaptation de la souche au milieu. Elle est d'autant plus longue que la souche est moins adaptée et que l'inoculum initial est faible.

Pendant **la phase d'accélération (2)** μ augmente régulièrement.

La phase exponentielle (3), où μ est constant et au maximum, correspond à une valeur maximale de vitesse de croissance. Pendant cette phase chaque cellule se divise à peu près à la même vitesse et les cellules ont une taille moyenne constante.

Sur la courbe expérimentale, cette phase est une droite en coordonnées semi-logarithmiques. Il est alors facile d'évaluer graphiquement la valeur de μ par la pente de cette droite. Tous les paramètres de la phase exponentielle sont caractéristiques de la souche mais dépendent du milieu et des conditions de culture.

Pendant **la phase de décélération (4)** μ diminue régulièrement. Cette phase correspond au début d'épuisement du milieu. Les nutriments commencent à manquer et les déchets deviennent toxiques.

La phase stationnaire (5) où μ redevient nul, correspond au maximum de la masse bactérienne qu'il est possible d'obtenir dans ces conditions expérimentales. Cette phase survient dès qu'un nutriment devient limitant.

La phase de déclin (6) où μ devient négatif correspond à une lyse de la culture.

III.3.3. Facteurs intervenant dans la croissance bactérienne [3, 30, 36]

Le milieu de croissance doit présenter les paramètres adaptés aux caractéristiques des bactéries à étudier.

- **Le pH**

Il intervient dans l'activité métabolique et la perméabilité membranaire. Les bactéries maintiennent un pH interne relativement constant, la tolérance aux variations du pH est très variable suivant les bactéries.

- **La pression osmotique**

Grâce à leur paroi rigide, les bactéries sont relativement tolérantes aux variations de la pression osmotique ; cependant, des concentrations élevées de sucres ou de NaCl inhibent leur croissance. Néanmoins certaines bactéries dites halophiles, adaptées au milieu marin, ne cultivent pas en l'absence d'une concentration minimale de NaCl.

- **La température**

La plupart des bactéries rencontrées en pathologie ont une température optimale de croissance voisine de 37°C, mais pour certaines, cette température est de l'ordre de 30°C.

La majorité des bactéries ne se multiplient pas à basse température, mais certaines comme *Listeria* peuvent continuer à se multiplier à des températures proches de 0°C.

Les bactéries non sporulées, que l'on rencontre en pathologie, meurent à des températures dépassant 60°C.

- **L'oxygène**

Selon leur relation avec l'oxygène les bactéries se divisent en plusieurs catégories ; les aérobies strictes ne se développent pas en l'absence d'oxygène alors que les anaérobies strictes ne se développent pas en présence d'oxygène, les aéro-anaérobies facultatives quant à elles croissent aussi bien en présence, qu'en l'absence d'oxygène. Ce dernier groupe est le plus fréquemment rencontré en pathologie infectieuse.

- **Les facteurs de croissance**

Un facteur de croissance est un métabolite essentiel que la bactérie ne sait pas synthétiser, il est donc obligatoirement fourni par l'extérieur.

Une espèce bactérienne dépendante d'un facteur de croissance est dite auxotrophe vis-à-vis de ce composé, dans le cas contraire elle en est prototrophe. Les facteurs de croissance sont des acides aminés, des bases, des co-enzymes, etc. Ils sont nécessaires à des concentrations très faibles et sont très spécifiques.

III.3.4. Méthodes d'analyse de la croissance bactérienne

La croissance bactérienne peut être étudiée en milieu solide ou en milieu liquide.

Lorsqu'une bactérie est déposée sur un milieu solide, sa multiplication donne naissance à une colonie microbienne qui, en général est visible en 24h en raison de l'accumulation des cellules en un point.

Dans les milieux liquides, la bonne dispersion des bactéries permet une meilleure croissance et entraîne l'apparition d'un trouble au bout d'une période. L'analyse de la multiplication bactérienne est donc plus aisée en milieu liquide. Ce sont les conditions idéales d'étude de la croissance car rien n'entrave la multiplication bactérienne, au moins pendant un temps. Les déchets sont dilués et ne sont donc pas inhibiteurs, les nutriments sont renouvelés rapidement dans l'environnement de la cellule.

Les techniques de mesure de la croissance sont basées sur l'évaluation du nombre des bactéries ou de leur masse par unité de volume ou de poids de milieu.

III.3.4.1. Dénombrement direct des cellules bactériennes [3, 36]

Ces méthodes ne permettent pas de différencier les cellules viables des cellules non viables.

Il existe plusieurs méthodes parmi lesquelles :

- **l'évaluation directe au microscope** : Les bactéries sont dénombrées soit à l'état frais à l'aide d'une cellule adaptée de type petroff-hausser, soit fixées après coloration par exemple à la coloration fluorescente ;
- **la cytométrie de flux** : Les bactéries colorées ou révélées par des anticorps monoclonaux ou des sondes nucléiques spécifiques, marqués au fluorochrome par exemple émettent des signaux fluorescents qui seront marqués automatiquement par un cytomètre de flux.

III.3.4.2. Mesure de la croissance par évaluation de la masse bactérienne

La méthode la plus simple et la plus utilisée consiste à mesurer la turbidité du milieu à 520 nm. Cette méthode doit être calibrée par une autre méthode telle que la mesure de l'azote totale [3].

Si la taille des cellules reste constante, il y a une proportionnalité entre la densité optique à 520 nm et la masse bactérienne m , K étant la constante de proportionnalité [3]. Cette densité optique est évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre [16].

$$DO = K.m$$

Cette méthode évalue les cellules viables et non viables [16].

III.3.4.3. Dénombrement des bactéries après culture

Seules les bactéries viables vont croître et pourront être visualisées.

III.3.4.3.1. Dénombrement sur boîte de pétri [3, 16, 36]

Il s'agit d'une méthode de référence, consistant à inoculer des volumes fixes de la suspension bactérienne pure ou diluée à un ou plusieurs milieux gélosés. Cette inoculation peut se faire à la surface de la gélose ou par incorporation dans la gélose.

Après incubation à température convenable, chaque cellule bactérienne se divise et génère une colonie visible à l'œil appelé U.F.C (**unité formant colonie**). Le nombre d'U.F.C permet d'évaluer la concentration de la suspension initiale.

Les amas de cellules doivent être bien dispersés pour éviter une sous-évaluation de la concentration de la suspension initiale. Pour obtenir de meilleurs résultats, les échantillons doivent contenir entre 25 et 250 colonies.

III.3.4.3.2. Autres méthodes de dénombrement en milieu gélosé

- Systèmes d'ensemencement en spirale [3]

Un ensemenceur semi-automatique dépose un faible volume calibré de l'échantillon liquide à analyser à la surface d'une gélose placée sur un plateau tournant en décrivant une spirale d'Archimède. La lecture se fait grâce à des abaques.

- Ensemencement après filtration [3, 36]

Un volume déterminé est filtré sur une membrane filtrante en cellulose par exemple dont le diamètre des pores permet de retenir les bactéries. Cette membrane est ensuite déposée à la surface d'un milieu gélosé et en laissant passer les nutriments elle permet le développement des bactéries. Le nombre de colonies comptées permet de déterminer le nombre de micro-organismes de l'échantillon filtré.

III.3.5. Conditions optimales de culture des staphylocoques et des streptocoques

III.3.5.1. Conditions optimales de croissance des staphylocoques

Les staphylocoques sont aéro-anaérobies facultatifs [29]. Ils poussent dans la plupart des milieux usuels incluant ceux ayant une concentration élevée en NaCl (7,5 %) [8].

Certaines souches nécessitent une forte pression en CO₂ pour une croissance optimale ainsi que d'autres métabolites telles que l'hémine ou la médadione [37].

Les facteurs de croissance tels que l'hémine et l'acide nicotinique sont indispensables à la multiplication des staphylocoques.

La température de croissance optimale est de 37°C et le pH optimal est de 7,5 [37].

Ils se développent dans des milieux où l'activité de l'eau A_w est de 0,86 [41].

III.3.5.2. Conditions optimales de croissance des streptocoques [22, 28, 40]

Les streptocoques sont des germes aéro-anaérobies facultatifs. Leur température de croissance optimale est comprise entre 35 et 37°C et le pH optimal est de 7.

La plupart des streptocoques sont capables de pousser sur les milieux de culture usuels, leur incubation se fait en milieu enrichi en CO₂.

Les milieux enrichis doivent contenir des peptones, des extraits de viande, de l'infusion de cœur-cervelle ; ces milieux doivent être additionnés de sang, de sérum ou d'ascite.

Les milieux glucosés doivent être tamponnés pour éviter leur acidification due à la production d'acide lactique par ces streptocoques.

IV. Validation par étude de la linéarité [14, 45]

Lors de notre étude, nous avons procédé à la validation de la méthode en terme de linéarité.

Elle a été effectuée grâce à la détermination de la droite régression.

Etablie dans le cadre d'une analyse de régression, la droite du même nom est simplement la représentation graphique de l'équation de régression. Elle est définie par deux paramètres a et b, que l'on détermine en appliquant la méthode dite des moindres carrés. Il s'agit en effet de trouver les valeurs de ces deux paramètres qui minimisent la somme du carré des écarts entre les différents points du nuage et la droite elle-même.

Pour la construire, il suffit de calculer à l'aide de l'équation, deux valeurs de y correspondant à deux valeurs quelconques de x.

La droite de régression fournit une idée schématique mais souvent très utile de la relation entre les deux variables. En particulier, elle permet d'apprécier facilement comment évolue l'une des variables en fonction de l'autre.

La détermination de la droite de régression se fait grâce aux formules suivantes :

$$y = a x_i + b$$

$$b = \frac{N \sum xy - (\sum x) (\sum y)}{N \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$a = \frac{\sum y}{N} - b \frac{\sum x}{N}$$

$$r = \frac{N \sum xy - (\sum x) (\sum y)}{\sqrt{N \sum x^2 - (\sum x)^2} \sqrt{N \sum y^2 - (\sum y)^2}}$$

r = coefficient de corrélation ; **x_i** = données observées ;
a = pente de la droite ; **b** = ordonnée à l'origine ;
N = nombre de paires (x ; y) ; **n** = concentration de l'inoculum ;
C = concordance des caractères étudiés.

I. METHODOLOGIE

I.1. Matériel

I.1.1. Cadre d'étude

Ce travail a été effectué au niveau de l'unité de recherche et de biotechnologie microbienne du laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec et au niveau du laboratoire de bactériologie-virologie fondamentale et appliquée de l'U.C.A.D.II.

I.1.2. Souches bactériennes

Notre étude a porté sur 4 espèces de bactéries appartenant aux genres *Streptococcus*, *Staphylococcus* et *Enterococcus*.

Nous avons utilisé des souches de référence et des souches de contrôle.

Les souches de référence étaient :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ;
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Les souches de contrôle étaient :

- *Staphylococcus epidermidis* ;
- *Streptococcus pyogenes* ou streptocoque du groupe A.

I.1.3. Matériel pour l'identification

- Bec bensen
- Etuve
- Four à micro-ondes
- Dessiccateur sous vide
- Micropipettes

- Microscope optique
- Micro-plaques
- Dessiccateur sous vide à air renouvelé
- Embouts stériles
- Becher rempli d'eau de javel
- Plateau
- Papier buvard
- Anse de platine ou pipette pasteur
- Lame porte-objet
- Lamelles

I.1.4. Matériel pour la préparation de l'inoculum

- Autoclave
- Etuve
- Boîtes de pétri en matière plastique
- Tubes à vis stériles
- Micropipettes
- Bain marie
- Appareil pour le comptage des colonies muni d'un système d'éclairage à fond noir
- Spectrophotomètre
- Densitomètre
- Etaleurs

I.1.5. Matériel pour la conservation des souches

- Tubes nunc
- Tubes stériles à vis
- Cryotubes à billes
- Portoirs
- Anse de platine

I.2. Milieux pour l'isolement, l'enrichissement et la conservation des souches

- Gélose Chapman
- Gélose au sang ordinaire
- Gélose Müller Hinton
- Bouillon glucosé tamponné

I.3. Réactifs pour l'identification des souches

- Eau oxygénée (recherche de la catalase)
- Plasma de lapin (recherche de la coagulase)
- Kit de latex Strepto
- Alpha-naphtol
- Alpha-naphtylamine
- Gélose à la DNase
- Acide sulfanilique
- NaOH

I.4. Contrôle de qualité des tests effectués

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

I.4.1. Contrôle de qualité des milieux d'isolement et d'enrichissement

Le contrôle de qualité a consisté en un contrôle de stérilité et un contrôle d'efficacité.

I.4.1.1. Contrôle de stérilité

Le contrôle de stérilité des milieux liquides a été effectué en incubant un millilitre de chaque milieu préparé à l'étuve à 37° C. Les milieux étaient considérés comme stériles en l'absence de trouble ou de virage de l'indicateur coloré au bout de 24 à 48h.

Le contrôle des milieux solides a été effectué en incubant les boîtes à l'étuve à 37°C. Ces milieux étaient considérés comme stériles en l'absence de virage de l'indicateur de pH et de colonies sur le milieu au bout de 24 à 48h d'incubation.

I.4.1.2. Contrôle d'efficacité

Après le contrôle de stérilité, il fallait procéder au contrôle d'efficacité des milieux.

Nous avons utilisé des souches de référence ou des souches dont le profil était bien connu. L'efficacité du milieu était appréciée en considérant sa capacité à donner les résultats attendus.

I.4.2. Contrôle de qualité des galeries d'identification déshydratées

I.4.2.1. Contrôle de stérilité

Il a été réalisé par incubation des plaques pendant 24 à 48h et après révélation de certains tests. Le lot de plaques était considéré comme stérile en l'absence de tout virage de l'indicateur coloré et de réactions positives pour les tests révélés.

I.4.2.2. Contrôle d'efficacité

Les galeries stériles étaient soumises à un contrôle d'efficacité. Il a été réalisé avec des souches de référence ou de contrôle dont le profil biochimique est stable et bien connu.

Technique

Deux plaques étaient prévues pour chaque galerie : un contrôle positif et un contrôle négatif.

Une suspension bactérienne était préparée à partir d'une culture de 24h sur milieu solide.

La turbidité de la suspension bactérienne était ajustée à :

- 1 sur l'échelle de Macfarland pour les staphylocoques ;
- 4 sur l'échelle de Macfarland pour les streptocoques.

Pour chaque galerie nous déposons 100 µl de suspension bactérienne dans les puits correspondants.

Pour les cupules contenant les sucres, la suspension bactérienne était mélangée avec le MEVAG Strepto/staph puis 100 µl de ce mélange étaient ensuiteensemencés dans les cupules.

Les cupules de LDC, ODC, ADH, URE et de tous les sucres étaient fermées avec une goutte d'huile de paraffine.

Les plaques étaient ensuite déposées sur un plateau recouvert de papier buvard imbibé d'eau puis incubées à 37° C à l'étuve pendant 18 à 24 heures.

La lecture était effectuée grâce aux tableaux ci-après :

Plan des plaques pour le contrôle des réactifs des staphylocoques :

Tableau II : Plaque des contrôles positifs pour les staphylocoques

URE <i>S. aureus</i>	ADH <i>S. aureus</i>	ODC <i>Proteus mirabilis</i>	VP <i>S. aureus</i>	ONPG <i>S. xylosus</i>
NIT <i>S. aureus</i>	GLU <i>S. aureus</i>	TRE <i>S. xylosus</i>	MAN <i>S. aureus</i>	XYL <i>S. xylosus</i>
SAC <i>S. aureus</i>	GLY <i>S. aureus</i>	MNE <i>S. xylosus</i>	LAC <i>S. aureus</i>	RAF <i>Klebsiella pneumoniae</i>

Tableau III : Plaque des contrôles négatifs pour les staphylocoques

URE <i>S. cohnii</i>	ADH <i>S. xylosus</i>	ODC <i>S. aureus</i>	VP <i>S. cohnii</i>	ONPG <i>S. aureus</i>
NIT <i>S. cohnii</i>	GLU <i>Micrococcus sp</i>	TRE <i>S. capitis</i>	MAN <i>S. haemolyticus</i>	XYL <i>S. aureus</i>
SAC <i>S. cohnii</i>	GLY <i>Micrococcus sp</i>	MNE <i>S. haemolyticus</i>	LAC <i>S. cohnii</i>	RAF <i>S. aureus</i>

Plan des plaques pour le contrôle des réactifs des streptocoques :**Tableau IV : Plaque des contrôles positifs pour les streptocoques**

VP <i>Enterococcus faecalis</i>	ESC <i>Enterococcus faecalis</i>	ADH <i>Streptococcus pyogenes</i>	BHS <i>Enterococcus faecalis</i>	ARA <i>Enterococcus avium</i>
MAN <i>Enterococcus faecalis</i>	SOR <i>Enterococcus faecalis</i>	TRE <i>Enterococcus faecalis</i>	RAF <i>Klebsiella pneumoniae</i>	SOS <i>Enterococcus faecalis</i>
INU <i>Streptococcus pneumoniae</i>	LAC <i>Streptococcus pneumoniae</i>	RIB <i>Enterococcus faecalis</i>	AMD <i>Enterococcus faecalis</i>	GLY <i>Enterococcus faecalis</i>

Tableau V : Plaque des contrôles négatifs pour les streptocoques

VP <i>Streptococcus pneumoniae</i>	ESC <i>Streptococcus agalactiae</i>	ADH <i>Enterococcus avium</i>	BHS <i>Streptococcus pyogenes</i>	ARA <i>Streptococcus pyogenes</i>
MAN <i>Micrococcus sp</i>	SOR <i>Streptococcus pyogenes</i>	TRE <i>Micrococcus sp</i>	RAF <i>Streptococcus pyogenes</i>	SOS <i>Enterococcus avium</i>
INU <i>Enterococcus faecalis</i>	LAC <i>Enterococcus faecalis</i>	RIB <i>Streptococcus pyogenes</i>	AMD <i>Enterococcus avium</i>	GLY <i>Enterococcus avium</i>

I.4.3. Contrôle des appareils

L'étuve était toujours maintenue à 37 ° C.

Le densitomètre était étalonné avec de l'eau distillée avant toute mesure.

I.4.4. Contrôle des paramètres dynamiques

La température de travail a été maintenue à 37° C aussi bien pour l'incubation de l'inoculum, des milieux ensemencés que pour les galeries Micro-CSB déjà ensemencées.

Le pH de chaque milieu était vérifié pour correspondre aux normes attendues pour le milieu en question. Pour chaque lot de milieux, le contrôle du pH était effectué après sa préparation à l'aide d'un pHmètre.

I.5. Méthodes

I.5.1. Identification

Nous avons travaillé avec des souches de référence et de contrôle, mais nous avons procédé de nouveau à leur identification pour avoir la certitude des espèces étudiées et vérifier la stabilité de leurs caractères biochimiques.

I.5.1.1. *S. aureus* et *S. epidermidis*

Isolement

En vue d'obtenir des colonies isolées, les souches conservées à -20°C ont été enrichies dans du bouillon glucosé tamponné, puis ensemencées dans une gélose Chapman. Les milieux ainsi ensemencés étaient ensuite incubés à l'étuve à 37°C pendant 24 h.

Examen macroscopique

Après 24h d'incubation nous avons procédé à l'examen macroscopique des colonies sur les milieux préalablement ensemencés.

Dans le cas de *S. aureus*, nous avons obtenu sur Chapman des colonies lisses, bombées et plus ou moins pigmentées en jaune or.

Pour *S. epidermidis*, nous avons obtenu sur Chapman des colonies opaques, lisses, jaunes ou blanches.

L'ensemencement sur gélose Chapman a aussi permis de noter la fermentation ou non du mannitol contenu dans le milieu par la bactérie. Lorsque la bactérie fermente le mannitol, nous avons un virage de l'indicateur coloré du rouge au jaune ; dans le cas contraire la coloration du milieu reste inchangée.

S. aureus fermentait le mannitol contrairement à *S. epidermidis*.

Examen microscopique

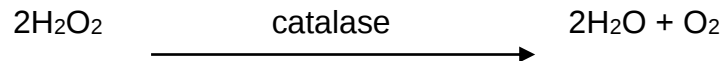
A partir d'une colonie, un frottis était confectionné. Après fixation, coloration au Gram et séchage, les lames étaient observées au microscope à l'objectif à immersion (objectif 100). L'observation permettait de voir des cocci à Gram positif de 0.8 à 1 micromètre de diamètre regroupés en amas ou en grappes de raisins. Les souches de *Staphylococcus epidermidis* apparaissaient quelques fois en diplocoques à Gram positif.

Les staphylocoques apparaissent au microscope optique : immobiles, acapsulés et non sporulés.

Test à la catalase

➤ Principe

Certaines déshydrogénases de la chaîne respiratoire produisent de l'eau oxygénée toxique pour la bactérie. La catalase agit en hydrolysant le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène selon la réaction suivante :



➤ Technique et lecture

Un frottis était confectionné à partir d'une colonie isolée sur un milieu sans globules rouges. Sur le frottis étaient ensuite déposées quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène à 3% puis la libération immédiate d'oxygène était recherchée.

Un résultat positif était détecté par l'apparition de bulles sur le frottis après addition de l'eau oxygénée ; alors qu'une absence de bulles dans les mêmes conditions traduisait un résultat négatif.

S. aureus et *S. epidermidis* ont montré une réaction positive à la catalase.

Test à la DNase

▪ Principe

Certaines bactéries sont capables de dégrader l'ADN inclus dans le milieu de culture.

▪ Technique

Les colonies suspectes étaient ensemencées sous forme d'une strie dans la gélose à l'ADN. Les milieux étaient ensuite incubés à l'étuve à 37°C pendant 24h. Après culture, le milieu était inondé d'acide chlorhydrique normal.

- **Lecture**

La réaction positive était indiquée par l'apparition d'une zone claire autour de la strie.

L'absence d'une zone claire traduisait une réaction négative.

- **Résultats**

S. aureus était DNase positive alors que *S. epidermidis* a développé une réaction négative à la DNase.

- **Test à la coagulase**

- **Principe**

La coagulase est une enzyme chromosomique et ce test met en évidence la coagulase libérée dans le milieu.

- **Technique**

Le test consistait à mettre dans un tube à essai 0,5 ml de la suspension bactérienne à étudier et 0,5 ml de plasma de lapin, l'incubation se faisait pendant 3 à 24h à l'étuve à 37°C.

- **Lecture**

Une réaction positive se traduisait par une coagulation du plasma de lapin le plus souvent au bout de 3h.

Lorsque la réaction était négative, l'aspect du mélange restait inchangé.

- **Résultats**

Staphylococcus aureus était coagulase positive contrairement à *Staphylococcus epidermidis*.

I.5.1.2. Identification de *Streptococcus pyogenes* et *Enterococcus faecalis*

Les souches préalablement conservées à la température de -20°C étaient régénérées dans du BGT. Elles étaient ensuite ensemencées dans une gélose au sang puis incubées à 37°C en milieu enrichi en CO₂ pendant 24h.

Examen macroscopique

Les streptocoques du groupe A apparaissaient sous forme de petites colonies d'environ 0,5 mm de diamètre entourées d'une zone d'hémolyse bêta.

Pour les souches de *E. faecalis* nous avons observé de petites colonies d'environ 1 à 2 mm de diamètre sans hémolyse.

Examen microscopique

Il était effectué en confectionnant un frottis qui avait été ensuite séché, fixé, coloré au Gram et observé au microscope à l'objectif 100 en présence d'une goutte d'huile à immersion. L'observation au microscope montrait des cocci à Gram positif regroupés en chaînettes plus ou moins longues, immobiles, non sporulés et non encapsulés.

Le test à la catalase (cf. Identification des souches des staphylocoques)

S. pyogenes et *E. faecalis* ont développé une réaction négative à la catalase.

Le test de groupage antigénique

- **Principe**

Il s'agit d'une réaction immunologique anticorps-antigènes basée sur une réaction d'agglutination sur particules de latex. Les réactifs sont des anticorps antistreptococciques des groupes A, B, C, D, F, G et l'antigène est apporté par la suspension bactérienne.

- **Technique**

Le liquide d'extraction antigénique contenu dans le kit était remis en suspension dans de l'eau physiologique ; puis, 0,4 ml de cette suspension étaient prélevés. Deux à six colonies de streptocoques étaient ensuite mises en suspension dans le liquide d'extraction et le tout était agité et incubé à l'étuve à 37°C pendant 10 min.

Au bout des 10 min le tube était récupéré.

La réaction était réalisée sur une carte de six cercles, sur chaque cercle étaient déposées une goutte de la suspension bactérienne et une goutte de la suspension d'anticorps mentionnée. Les deux gouttes étaient ensuite mélangées.

Les anticorps antistreptococciques étaient inclus dans les suspensions contenues dans le kit et représentaient les groupes A, B, C, D, F, G.

- **Lecture**

Une réaction positive était détectée par une agglutination alors qu'une réaction négative est décelée par une absence d'agglutination.

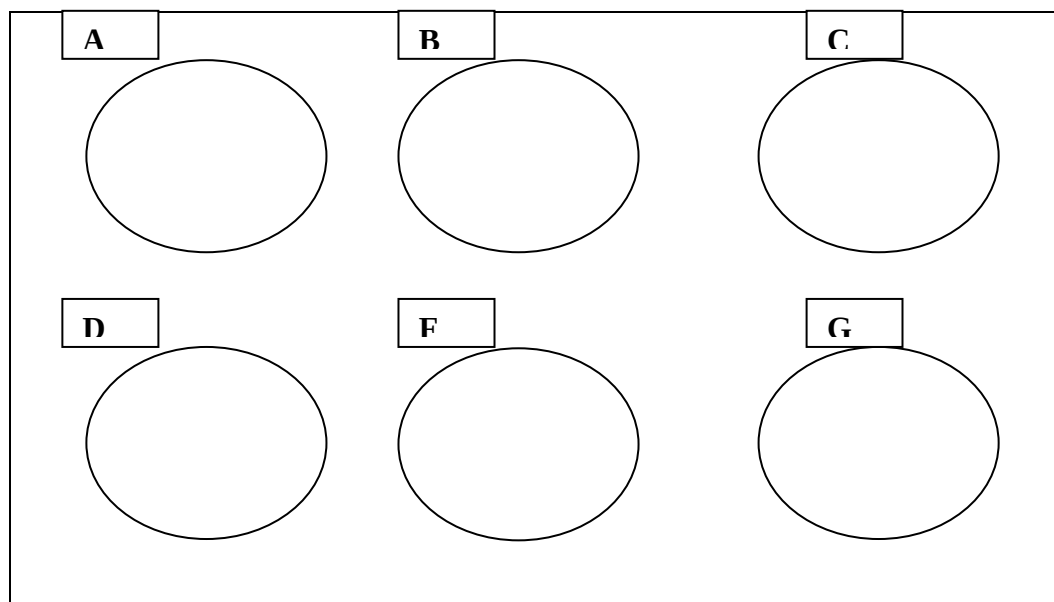


Figure 2 : Carte utilisée pour la réaction d'agglutination sur particules de latex des streptocoques

I.5.2. Etude de l'effet de l'inoculum et du temps d'incubation des galeries sur l'identification des bactéries

Notre travail s'est déroulé en deux temps :

- en premier lieu, nous avons préparé des inocula dont nous avons déterminé la teneur en bactéries viables par la méthode de dénombrement bactérien sur boîte de pétri ;
- en deuxième lieu, nous avons ensemencé des galeries d'identification Micro-CSB Strepto ou Staph avec ces mêmes inocula, l'observation de ces galeries à intervalle de temps régulier a permis de déterminer le temps minimum nécessaire à une identification de ces souches bactériennes.

I.5.2.1. Préparation de l'inoculum et détermination de sa teneur en bactéries viables

I.5.2.1.1. Staphylocoques

A partir d'une à deux colonies isolées sur gélose Chapman, était préparée une suspension bactérienne dans un bouillon glucosé tamponné (10 ml). Cette suspension était ensuite incubée pendant 3h à 37°C.

Toutes les 30 min, il était prélevé 1,4ml de la suspension à partir du point initial t_0 .

Nous avons donc 7 points à étudier : t_0 , $t_1 = 30\text{min}$, $t_2 = 1\text{h}$, $t_3 = 1\text{h } 30\text{min}$, $t_4 = 2\text{h}$, $t_5 = 2\text{h } 30\text{min}$ et $t_6 = 3\text{h}$.

Dénombrement des bactéries sur boîte de pétri

➤ Principe

La technique de mesure de la croissance d'une population bactérienne par dénombrement sur boîte de pétri a été réalisée en ensemençant à des intervalles de temps réguliers des boîtes de pétri par une dilution appropriée d'un échantillon de la suspension bactérienne. La dilution était calculée pour obtenir entre 25 et 250 colonies sur chaque boîte, ces deux bornes étant considérées comme donnant le moins d'erreurs sur le dénombrement final. Cette étape a été suivie d'une culture de 24 à 48h à 37°C au terme de laquelle les colonies étaient dénombrées.

Les intervalles de temps entre les prélèvements (toutes les 30 minutes) ont été choisis pour avoir un maximum de points dans la phase exponentielle de la croissance.

➤ Technique

Nous avons utilisé la technique de l'ensemencement par étalement qui se faisait comme suit :

A chaque espace de temps, 100 µl de suspension étaient prélevés et dilués à une concentration convenable dans 900 µl d'eau physiologique. Les derniers 100 µl étaient directement déposés sur la gélose MH puis dispersés à l'aide d'un étaleur stérile. Une fois la gélose sèche, les boîtes étaient placées à l'étuve pendant 24 heures à 37°C.

➤ Résultats

Les résultats sont exprimés en U.F.C/ml (unité formant colonie par millilitre).

I.5.2.1.2. *S. pyogenes* et *E. faecalis*

A partir d'une à deux colonies isolées sur une gélose au sang ordinaire, nous préparons une suspension bactérienne avec 10ml de bouillon glucosé tamponné. La suspension était incubée pendant 5h à 37°C. Il était prélevé 1,4 ml de la suspension bactérienne à chaque heure. Dans ce cas précis nous avons étudié 6 points à partir du point t_0 .

L'ensemencement s'est fait par étalement sur une gélose au sang.

Les résultats sont exprimés en U.F.C/ml.

I.5.2.2. Ensemencement de galeries Micro-CSB et détermination du temps minimum d'identification

Les inocula obtenus aux différents intervalles de temps étaient ensuite ensemencés dans des galeries Micro-CSB Staph et Strepto. Nous ensemencions donc au total 5 galeries pour les staphylocoques et 4 galeries pour les streptocoques.

L'ensemencement des micro-plaques a été effectué comme suit :

➤ Pour les staphylocoques

❖ Principe

Les galeries CSB Staph sont constituées de 15 tests biochimiques qui mettent en évidence soit des activités enzymatiques, soit l'assimilation de substrats carbonés en milieu approprié ou hostile.

❖ Technique

Elle consistait à :

- distribuer 100 µl d'inoculum bactérien par microcupule de URE à NIT ;
- mélanger 100 µl de la suspension bactérienne à 1 ml de MEVAG ;
- ensemercer les cupules de GLU à RAF avec 100µl de MEVAG ainsi inoculé ;
- recouvrir les puits URE, ADH, ODC et tous les sucres de deux gouttes de paraffine afin de maintenir l'anaérobiose nécessaire aux réactions ;
- incuber à 37°C un plateau recouvert de papier buvard imbibé d'eau ;
- lire toutes les 4h.

❖ Lecture et interprétation

La lecture reposait sur le changement de la coloration initiale des différents milieux. Pour la plupart des milieux, la lecture a été effectuée directement ; pour d'autres elle a nécessité l'addition de réactifs.

La lecture des caractères a été effectuée grâce à une fiche de lecture (**cf. le tableau ci-après**).

Tableau VI : Lecture des staphylocoques

Tests	Substrats	Réactions et enzymes	Réactifs à ajouter	Résultats positifs	Résultats négatifs
URE	Urée	Uréase		Rose framboise	Orange
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase		Rouge	Jaune
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase		Rose-rouge	Jaune
VP	Glucose + Pyruvate	Production d'acétoïne	1 goutte de KOH 1 goutte de α -naphthol	Rose-rouge	Incolore
ONPG	ONPG	β -galactosidase		Rouge	Incolore
NIT	Nitrate de potassium	Nitrate réductase	1 goutte d'acide sulfanilique 1 goutte α -naphtylamine	Rouge	Incolore
GLU	Glucose	Fermentation		Jaune	Rouge
TRE	Tréhalose				
MAN	Mannitol				
XYL	Xylose				
SAC	Saccharose				
GLY	Glycérol				
MNE	Mannose				
LAC	Lactose				
RAF	Raffinose				

L'identification a été rendue possible grâce à l'utilisation d'un tableau d'identification (**Tableau VII**).

Tableau VII : Tableau d'identification des espèces de staphylocoques étudiées

TESTS ESPECES	URE	ADH	ODC	VP	ONPG	NIT	GLU	TRE	MAN	XYL	SAC	GLY	MNE	LAC	RAF
<i>S. aureus</i>	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>S. epidermidis</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-

Caractère négatif : 0-25 % des souches ;

Caractère positif > 70% des souches.

➤ **Pour les streptocoques.**

❖ **Principe**

Il s'agit d'une micro-méthode d'identification. Elle a été réalisée en ensemençant des plaques présentant des cupules. Ces dernières, renferment des substrats déshydratés destinés soit à la mise en évidence d'activités enzymatiques ou d'assimilation de substrats carbonés en milieu approprié ou hostile.

❖ **Mode opératoire**

- Distribuer 100 µl d'inoculum bactérien par cupule, de ADH à VP.
- Mélanger 100 µl de la suspension bactérienne dans 1 ml de MEVAG Staph/Strepto.
- Ensemencer les cupules de ARA à GLY avec le MEVAG ainsi inoculé (100 µl par cupule).
- Fermer les cupules ADH et tous les sucres avec deux gouttes d'huile de paraffine.
- Incuber à 37°C sur un plateau recouvert de papier buvard imbibé d'eau.
- Lire.

- La lecture et l'identification ont été effectuées grâce aux tableaux suivants :

Tableau VIII : Lecture des streptocoques

Tests	Substrats	Réactions et enzymes	Réactifs à ajouter	Résultats positifs	Résultats négatifs
VP	Glucose + Pyruvate	Production d'acétoïne	1 goutte de KOH + 1 goutte de α -naphtol	Rose-rouge	Incolore
ESC	Esculine	β -glucosidase		Noir	Incolore
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase		Rouge	Jaune
BHS	Glucose	Croissance en milieu hypersalé		Jaune	Violet
ARA	Arabinose	Fermentation		Jaune	Rouge
MAN	Mannitol				
SOR	Sorbitol				
TRE	Tréhalose				
RAF	Raffinose				
SOS	Sorbose				
INU	Inuline				
LAC	Lactose				
RIB	Ribose				
AMD	Amidon				
GLY	Glycérol				

**Tableau IX : Identification de *Streptococcus pyogenes* et de
*Enterococcus faecalis***

TESTS ESPECES	VP	ESC	ADH	BHS	ARA	MAN	SOR	TRE	RAF	SOS	INU	LAC	RIB	AMD	GLY
<i>S.pyogenes</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	d	-
<i>E.faecalis</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-

Caractère négatif : 0-25 % des souches ;

Caractère variable (V) : 26-70 % des souches ;

Caractère positif > 70 % des souches.

Après leur ensemencement, les galeries sont observées toutes les 4 heures. Les cupules montrant des réactions positives sont notées jusqu'à ce que nous obtenions assez de réactions positives permettant une identification des souches étudiées.

II. RESULTATS ET COMMENTAIRES

Les résultats de l'étude de l'effet de l'inoculum et du temps d'incubation des micro-plaques CSB sur l'identification des souches bactériennes étudiées ont été reportés et exploités dans ce chapitre.

II.1. *Staphylococcus aureus*

II.1.1. Résultats du dénombrement

Tableau X : Dénombrement de *Staphylococcus aureus*

Temps (min)	Concentration de l'inoculum (UFC/ml)
$T_0 = 0$	$4,8.10^4$
$T_1 = 30$	$4,8.10^4$
$T_2 = 60$	$5,7.10^5$
$T_3 = 90$	$2,2.10^6$
$T_4 = 120$	$2,3.10^7$
$T_5 = 150$	$8,8.10^8$
$T_6 = 180$	$1,11.10^{10}$

La teneur de l'inoculum en U.F.C/ml est restée constante les **30** premières minutes ; cependant, à partir de ce point jusqu'au point **T₆** qui correspondait à une incubation de l'inoculum pendant **3h**, la concentration de celui-ci n'a cessé de croître.

II.1.2. Détermination des paramètres [31]

L'analyse des résultats obtenus nécessitait la détermination des conditions d'interprétation. Elles étaient les suivantes :

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

II.1.3. Résultats des micro-plaques CSB

Ils ont été obtenus après incubation des micro-plaques déjà inoculées, il convient de rappeler que les inocula qui correspondaient respectivement à **0** et **30** min d'incubation de la suspension bactérienne n'ont pas étéensemencés car les concentrations de la suspension ont été jugées trop faibles.

Les résultats obtenus ont été reportés dans les tableaux ci-après.

- **Résultats des micro-galeries Staph en fonction de l' inoculum de *S. aureus* et du temps d'incubation**

Tableau XI : Résultats des Micro-CSB Staph en fonction de l'inoculum de *S. aureus* et du temps d'incubation

Inocula (U.F.C/ml)	T ₂ 5,7.10 ⁵				T ₃ 2,2.10 ⁶				T ₄ 2,3.10 ⁷				Résultats attendus
Incubation en heures Tests biochimiques	4	8	12	24	4	8	12	24	4	8	12	24	
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NIT	d	d	d	+	d	d	d	+	d	d	d	+	+
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
VP	d	d	d	+	d	d	d	+	d	d	d	+	+
GLU	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
GLY	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
LAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MAN	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
MNE	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
RAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
TRE	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Concordance des caractères (%)	27	27	54	86	27	60	74	87	27	67	74	87	100

Tableau XI : Résultats des Micro-CSB Staph en fonction de l'inoculum de *S. aureus* et du temps d'incubation (suite)

Inocula (U.F.C/ml)	T ₅				T ₆				Résultats attendus
	8,8.10 ⁸				1,11.10 ¹⁰				
Incubation en heures	4	8	12	24	4	8	12	24	
Tests biochimiques									
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NIT	d	d	d	+	d	d	d	+	+
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	+	+	+	-	-	+	+	+
VP	d	d	d	+	d	d	d	+	+
GLU	-	+	+	+	-	+	+	+	+
GLY	-	+	+	+	-	+	+	+	+
LAC	-	-	+	+	-	+	+	+	+
MAN	-	+	+	+	-	+	+	+	+
MNE	-	+	+	+	-	+	+	+	+
RAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	-	+	+	+	-	+	+	+	+
TRE	-	+	+	+	-	+	+	+	+
XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Concordance des caractères (%)	27	74	80	94	27	74	80	94	100

Légende : (+) = caractère positif

(-) = caractère négatif

(d) = caractère indéterminé

Les résultats des tests de la réduction des nitrates (**NIT**) et de la production d'acétoïne (**VP**) n'ont pu être déterminés qu'au bout de 24h, car leur révélation nécessitait l'addition de réactifs.

Les pourcentages de concordance des caractères biochimiques en fonction du temps d'incubation des micro-plaques CSB pour chaque inoculum, ont été illustrés sur les figures suivantes.

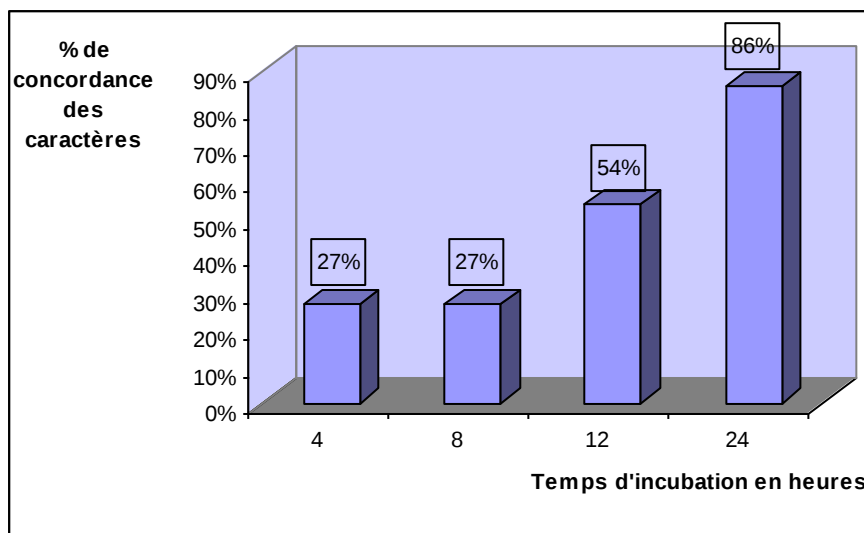


Figure 3 : La concordance des caractères étudiés avec un inoculum de *S. aureus* de $5,7.10^5$ U.F.C/ml en fonction du temps d'incubation de la micro-plaque CSB

Selon les critères d'interprétation, l'identification de la souche n'a été acceptable qu'au bout de 24h d'incubation de la micro-plaque. Il est toutefois important de noter l'augmentation de cette concordance parallèlement à l'allongement du temps d'incubation.

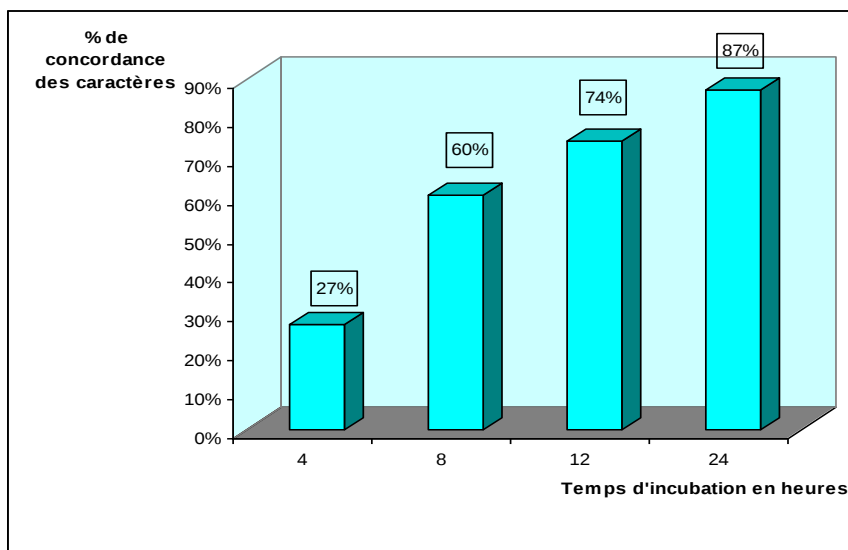


Figure 4 : La concordance des caractères étudiés avec un inoculum de *S. aureus* de $2,2.10^6$ U.F.C/ml en fonction du temps d'incubation de la micro-plaque CSB

L'identification a été acceptable au bout de 24h d'incubation mais s'est avérée inacceptable avant ce délai.

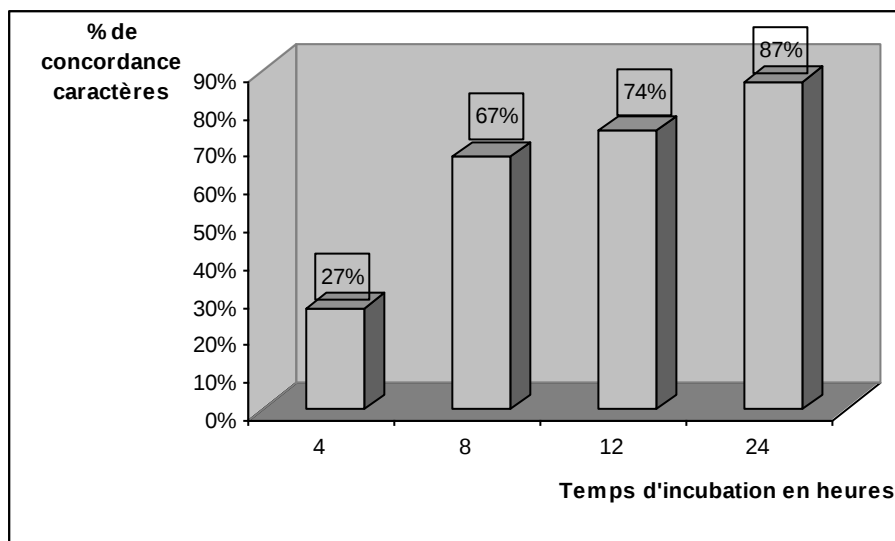


Figure 5 : La concordance des caractères étudiés avec un inoculum de *S. aureus* de $2,3.10^7$ U.F.C/ml en fonction du temps d'incubation de la micro-plaque CSB

Avec un inoculum de $2,3.10^7$ U.F.C/ml, la souche de *S. aureus* n'a pu être identifiée de façon acceptable, selon les critères définis précédemment, qu'au bout de 24h.

Nous avons également observé une augmentation parallèle de la concordance des résultats et de la taille de l'inoculum.

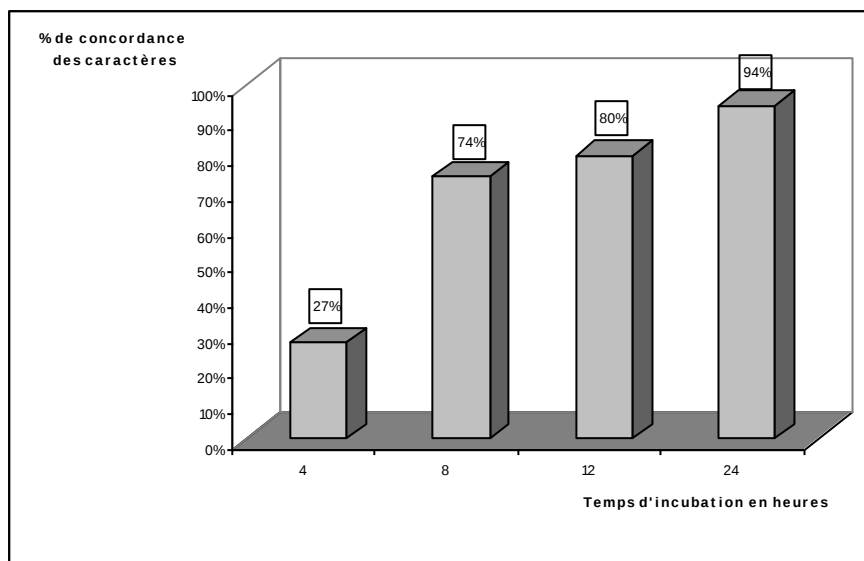


Figure 6 : La concordance des caractères étudiés avec un inoculum de *S. aureus* de $8,8.10^8$ U.F.C/ml en fonction du temps d'incubation de la micro-plaque CSB

La micro-plaque a été inoculée avec une suspension bactérienne dont la concentration était de $8,8.10^8$ U.F.C/ml. L'identification s'est avérée acceptable, dès la douzième heure d'incubation de la micro-plaque, avec **80%** de caractères concordants par rapport au profil de référence.

L'incubation de la micro-plaque pendant **24h** a permis une bonne identification de *S. aureus* selon les critères d'interprétation précités.

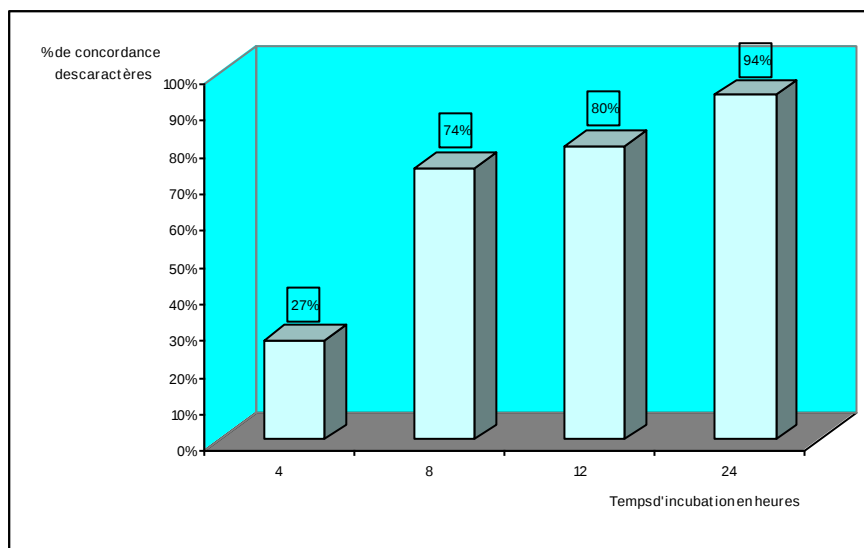


Figure 7 : La concordance des caractères étudiés avec un inoculum de *S. aureus* de $1,11.10^{10}$ U.F.C/ml en fonction du temps d'incubation de la micro-plaque CSB

L'identification de la souche a été possible dès la **douzième heure** grâce à un inoculum **$1,11.10^{10}$ U.F.C/ml** avec un pourcentage de caractères conformes de **80%**.

Les résultats obtenus étaient superposables à ceux obtenus avec un inoculum de **$8,8.10^8$ U.F.C/ml**.

• **Résultats obtenus avec les micro-plaques CSB à la douzième heure d'incubation de la micro-plaque en fonction de l'inoculum de *S. aureus***

Les meilleures concordances avant les 24h ont été obtenues à 12h d'incubation des micro-plaques CSB ; c'est la raison pour laquelle, nous avons jugé intéressant de procéder à une étude comparative de l'ensemble des résultats obtenus à la douzième heure en fonction des différents inocula.

Tableau XII : Etude comparative des résultats obtenus à la douzième heure d'incubation de la plaque en fonction de l'inoculum de *S. aureus*

Inocula (U.F.C/ml)	I ₂ 5,7.10 ⁵	I ₃ 2,2.10 ⁶	I ₄ 2,3.10 ⁷	I ₅ 8,8.10 ⁸	I ₆ 1,11.10 ¹⁰	Résultats attendus
Caractères Biochimiques						
ADH	-	-	-	-	-	+
ONPG	-	-	-	-	-	-
NIT	d	d	d	d	d	+
ODC	-	-	-	-	-	-
URE	-	+	+	+	+	+
VP	d	d	d	d	d	+
GLU	+	+	+	+	+	+
GLY	+	+	+	+	+	+
LAC	-	-	-	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+
MNE	-	+	+	+	+	+
RAF	-	-	-	-	-	-
SAC	+	+	+	+	+	+
TRE	-	+	+	+	+	+
XYL	-	-	-	-	-	-
Concordance des caractères (%)	54	74	74	80	80	100

Légende : (+) = caractère positif

(-) = caractère négatif

(d) = caractère indéterminé

L'évolution des pourcentages de concordance des caractères biochimiques à la douzième heure en fonction de l'inoculum est exprimée par la **figure VIII**.

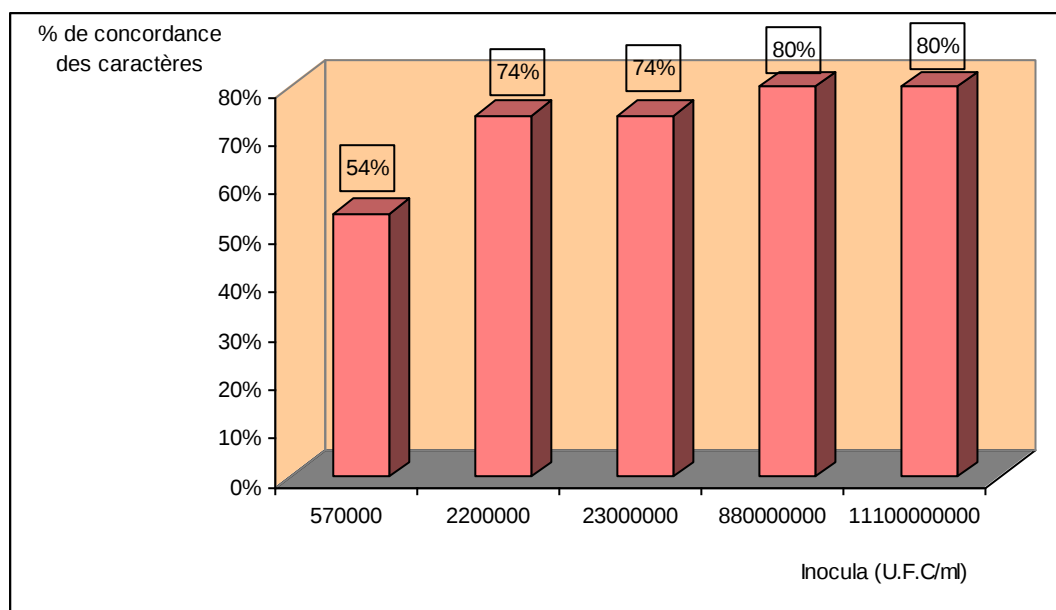


Figure 8 : Identification de *S. aureus* au bout de 12h d'incubation des plaques en fonction des différents inocula de *S. aureus*

Le pourcentage de résultats favorables et la taille de l'inoculum variaient dans le même sens.

Le maximum de concordance des caractères biochimiques étudiés a été obtenu grâce à des inocula de **$8,8.10^8$** et **$11,1.10^{10}$ U.F.C/ml** où les pourcentages étaient de **80%**.

Avec ces inocula, **12** tests ont fourni des résultats favorables sur un total de **15** caractères biochimiques et métaboliques explorés. Les trois caractères restants concernaient les **2** tests nécessitant l'addition de réactifs de révélation, à savoir le test de la réduction des nitrates (**NIT**) et de Voges-Proskauer (**VP**) ; le troisième caractère discordant concernait la production de l'arginine dihydrolase (**ADH**). En effet ce dernier est resté négatif tout au long de l'analyse et ceci même au bout de **24h** d'incubation.

Nous en avons déduit que mis à part les tests révélés, aux inocula correspondants à $8,8.10^8$ et $11,1.10^{10}$ U.F.C/ml, les résultats obtenus au bout de **12h** restaient inchangés à **24h**.

II.2. *Staphylococcus epidermidis*

II.2.1. Résultats du dénombrement

Tableau XIII : Dénombrement de *Staphylococcus epidermidis*

Temps (min)	Concentration de l'inoculum (UFC/ml)
$T_0 = 0$	$2,97.10^4$
$T_1 = 30$	3.10^4
$T_2 = 60$	4.10^4
$T_3 = 90$	$8,5. 10^4$
$T_4 = 120$	$2,7. 10^6$
$T_5 = 150$	$7,3.10^6$
$T_6 = 180$	$4,1.10^7$

Il paraît important de souligner que la croissance de *S. epidermidis* a été relativement faible, la taille de l'inoculum était de l'ordre de 10^4 jusqu'à la 90^{ème} minute d'incubation de la suspension bactérienne, moment à partir duquel l'inoculum a commencé à croître de façon significative.

II.2.2. Détermination des paramètres.

L'analyse des résultats obtenus a nécessité la détermination des critères d'interprétation, ceux-ci ont été les mêmes que pour *S. aureus* (cf. II.1.2).

II.2.3. Résultats des micro-plaques CSB

Les résultats obtenus ont été reportés dans les tableaux ci-dessous :

- **Résultats des micro-galeries Staph en fonction de l' inoculum de *S. epidermidis* et du temps d'incubation**

Tableau XIV : Résultats des Micro-CSB Staph en fonction de l'inoculum de *S. epidermidis* et du temps d'incubation

Inocula (U.F.C/ml)	T ₂ 4.10 ⁴				T ₃ 8,5. 10 ⁴				T ₄ 2,7. 10 ⁶				Résultats attendus
Incubation en heures Tests biochimiques	4	8	12	24	4	8	12	24	4	8	12	24	
ADH	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
NIT	d	d	d	-	d	d	d	-	d	d	d	+	+
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
VP	d	d	d	+	d	d	d	+	d	d	d	+	+
GLU	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
GLY	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
LAC	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
MAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MNE	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
RAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
TRE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Concordance des caractères (%)	47	60	67	74	47	67	74	74	47	74	80	87	100

Tableau XIV : Résultats des Micro-CSB Staph en fonction de l'inoculum de *S. epidermidis* et du temps d'incubation (suite)

Inocula (U.F.C/ml)	T ₅				T ₆				Résultats attendus
	7,3.10 ⁶				4,1.10 ⁷				
Incubation en heures	4	8	12	24	4	8	12	24	
Tests biochimiques									
ADH	-	-	-	+	-	-	-	+	-
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	+
NIT	d	d	d	+	d	d	d	+	+
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	+	+	+	-	+	+	+	+
VP	d	d	d	+	d	d	d	+	+
GLU	-	+	+	+	-	+	+	+	+
GLY	-	+	+	+	-	+	+	+	+
LAC	-	-	+	+	-	-	+	+	+
MAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MNE	-	-	-	+	-	+	+	+	-
RAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	-	+	+	+	-	+	+	+	+
TRE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Concordance des caractères (%)	47	74	80	80	47	67	74	80	100

Légende : (+) = caractère positif

(-) = caractère négatif

(d) = caractère indéterminé

Les résultats des tests de réduction des nitrates (**NIT**) et de Voges-Proskauer (**VP**) n'ont pu être obtenus qu'au bout de 24h car la détermination de leur positivité nécessitait l'addition de réactifs de révélation.

Les pourcentages de caractères concordants en fonction du temps d'incubation des micro-plaques CSB ont été reportés sur les figures suivantes.

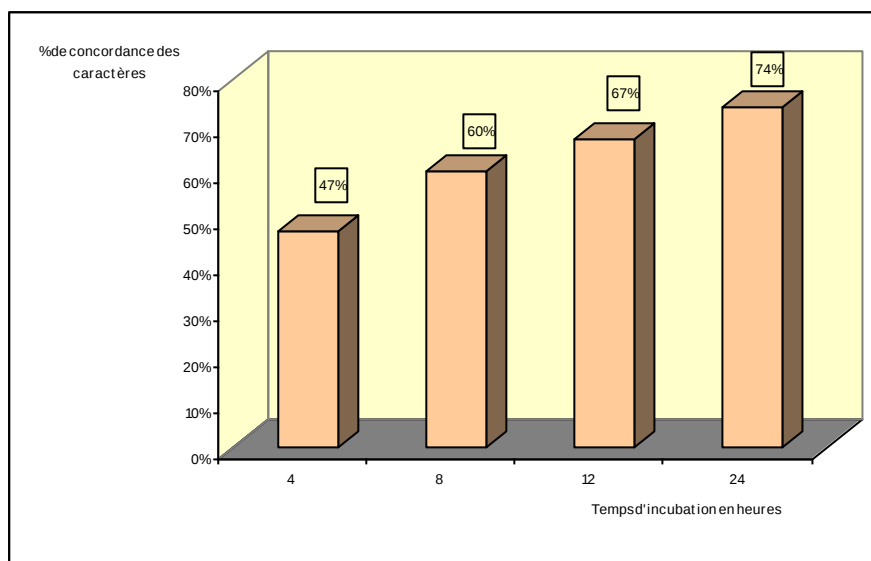


Figure 9 : La concordance des caractères étudiés avec un inoculum de *S. epidermidis* de 4.10^4 U.F.C/ml en fonction du temps d'incubation de la micro-plaque CSB

Avec un inoculum de 4.10^4 U.F.C/ml, la concordance des caractères étudiés croissait avec le temps d'incubation de la micro-plaque CSB ; toutefois, la souche bactérienne n'a pu être identifiée.

Il faut remarquer que le test de la fermentation du mannose (**MNE**) et celui de la détection de l'arginine dihydrolase (**ADH**) ont été positifs à **24h** d'incubation or, dans le profil de référence ces tests étaient négatifs.

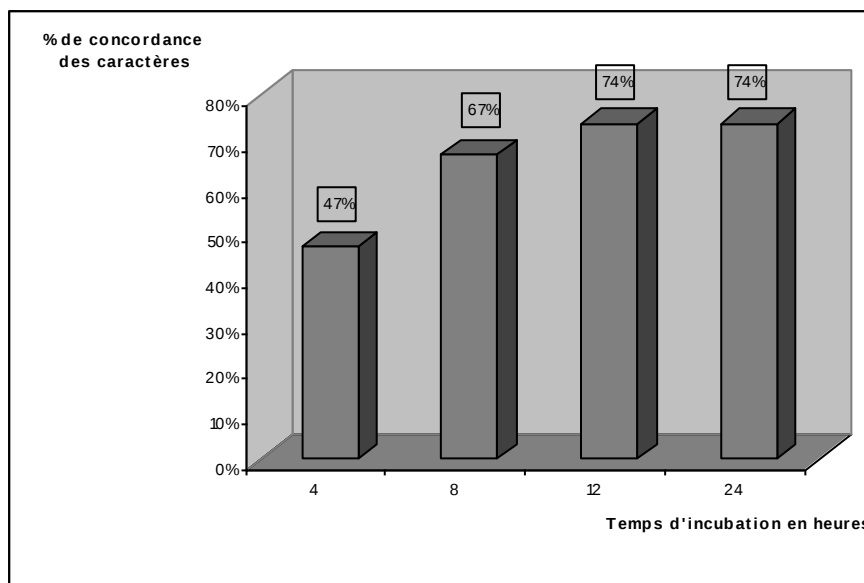


Figure 10 : La concordance des caractères étudiés avec un inoculum de *S. epidermidis* de $8,5 \cdot 10^4$ U.F.C/ml en fonction du temps d'incubation de la micro-plaque CSB

Les résultats de la **figure 10** ont été obtenus avec un inoculum de $8,5 \cdot 10^4$ U.F.C/ml dont l'incubation a duré 1h30mn. L'identification de la souche bactérienne était toujours impossible.

Il y a eu une augmentation des caractères concordants à la douzième heure d'incubation de la micro-plaque par rapport à l'inoculum de $4 \cdot 10^4$ U.F.C/ml.

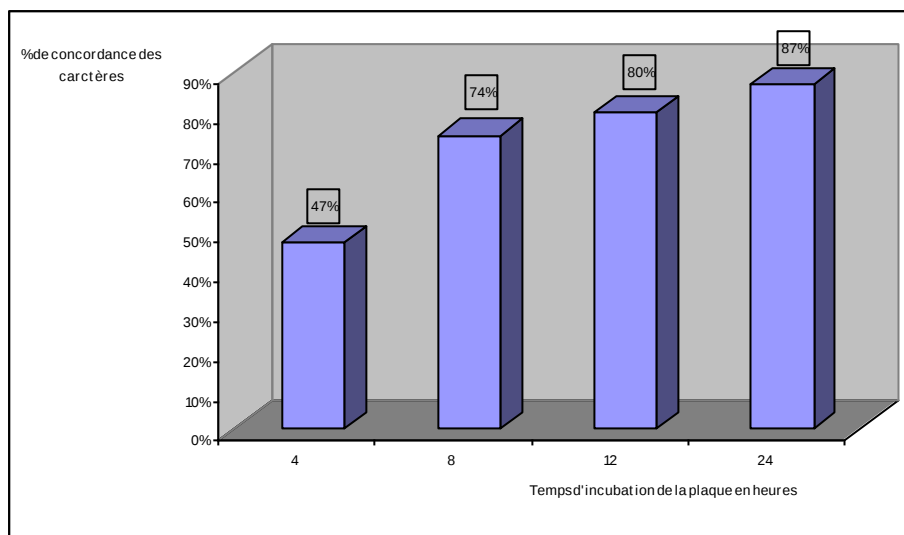


Figure 11 : La concordance des caractères étudiés avec un inoculum de *S. epidermidis* de $2,7 \cdot 10^6$ U.F.C/ml en fonction du temps d'incubation de la micro-plaque CSB

Avec un inoculum dont la concentration était de $2,7 \cdot 10^6$ U.F.C/ml, l'identification de *S. epidermidis* a été possible dès 12h d'incubation de la micro-plaque. Cette identification était, selon les critères d'interprétation, acceptable avec un pourcentage de 80% à 12h et de 86,7% à 24h.

L'ADH qui était resté positif jusque là est devenu négatif, alors que le test de la réduction des nitrates (NIT) était devenu positif. Il est apparu une nette amélioration des résultats par rapport à ceux obtenus précédemment.

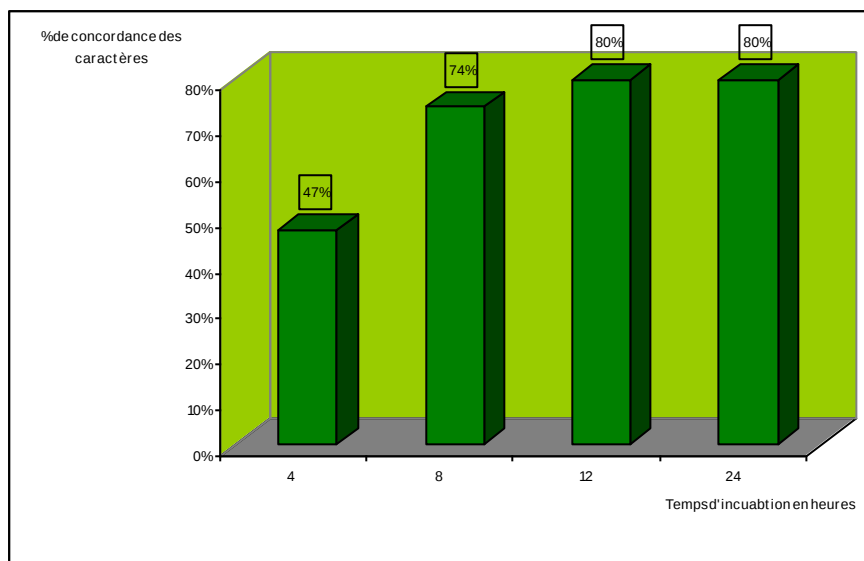


Figure 12 : La concordance des caractères étudiés avec un inoculum de *S. epidermidis* de $7,3.10^6$ U.F.C/ml en fonction du temps d'incubation de la micro-plaque CSB

Ces résultats ont été obtenus avec un inoculum incubé pendant **2h 30min** dont la concentration était de **$7,3.10^6$ U.F.C/ml**.

L'identification a été possible au bout de **12h** d'incubation de la micro-plaque CSB.

Le test à l'**ADH** était redevenu positif rendant les pourcentages des caractères concordants moins satisfaisants qu'avec l'inoculum de **$2,7. 10^6$ U.F.C/ml**.

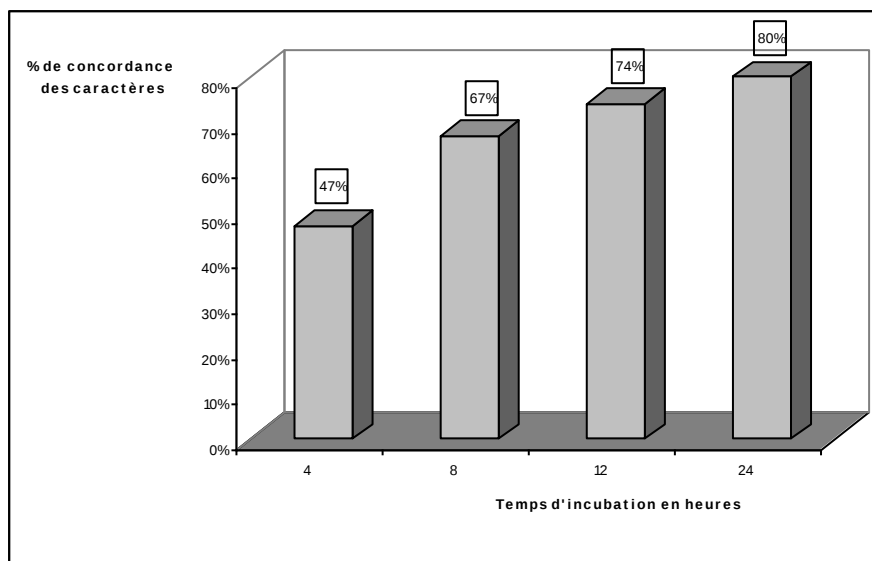


Figure 13 : La concordance des caractères étudiés avec un inoculum de *S. epidermidis* de $4,1.10^7$ U.F.C/ml en fonction du temps d'incubation de la micro-plaque CSB

Les résultats ci-dessus ont été obtenus avec un inoculum incubé pendant **3h** et dont la concentration était de **$4,1.10^7$ U.F.C/ml**.

L'identification n'a été possible qu'au bout de **24 h** d'incubation de la micro-plaque et ceci de façon acceptable. La concordance des caractères au bout de **8h** d'incubation a présenté une régression par rapport aux résultats obtenus avec des inocula de **$2,7. 10^6$ et $7,3.10^6$ U.F.C/ml**.

L'**ADH** est resté positif et le test à l'**ONPG** négatif.

- **Résultats obtenus à la douzième heure d'incubation des micro-plaques en fonction de l'inoculum de *S. epidermidis***

Après observation des résultats obtenus, il nous a semblé intéressant de mettre en exergue l'évolution de la concordance des caractères à la douzième heure d'incubation des micro-plaques.

Tableau XV: Etude comparative des résultats obtenus à la douzième heure d'incubation de la plaque en fonction de l'inoculum de *S. epidermidis*

Inocula (U.F.C/ml) Tests Biochimiques	I ₂ 4.10 ⁴	I ₃ 8,5. 10 ⁴	I ₄ 2,7. 10 ⁶	I ₅ 7,3.10 ⁶	I ₆ 4,1.10 ⁷	Résultats attendus
ADH	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-	+
NIT	d	d	d	d	d	+
ODC	-	-	-	-	-	-
URE	+	+	+	+	+	+
VP	d	d	d	d	d	+
GLU	+	+	+	+	+	+
GLY	+	+	+	+	+	+
LAC	-	-	+	+	+	+
MAN	-	-	-	-	-	-
MNE	-	-	-	-	+	-
RAF	-	-	-	-	-	-
SAC	+	+	+	+	+	+
TRE	-	-	-	-	-	-
XYL	-	-	-	-	-	-
Concordance des caractères (%)	67%	74%	80%	80%	74%	100%

Légende : (+) = caractère positif

(-) = caractère négatif

(d) = caractère indéterminé

L'évolution du pourcentage de concordance des caractères à la douzième heure en fonction de l'inoculum a été schématisée sur la **figure 14**.

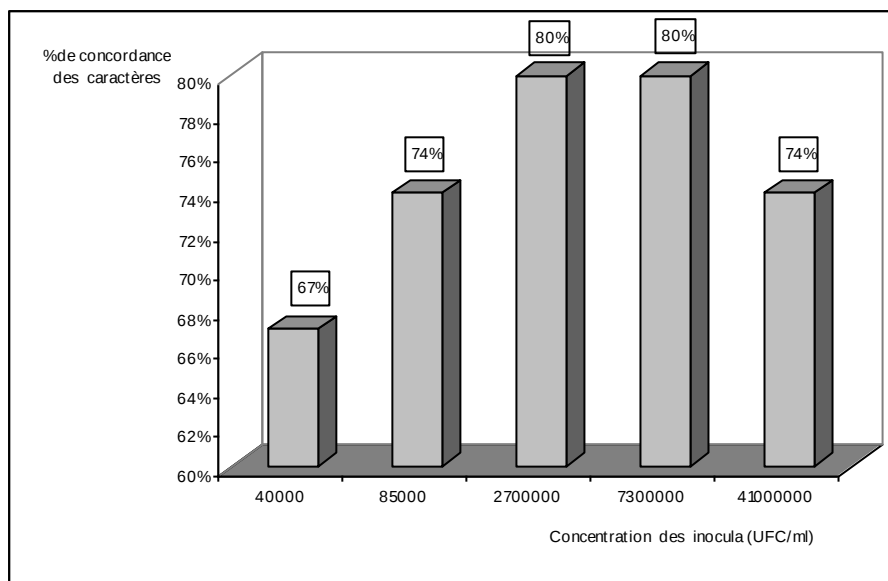


Figure 14 : Concordance des caractères biochimiques à la douzième heure d'incubation des micro-plaques CSB en fonction de l'inoculum de *S. epidermidis*

Le pourcentage de caractères concordants a crû avec la taille de l'inoculum jusqu'à une valeur de **$2,7 \cdot 10^6$ U.F.C/ml**, il a été stable entre **$2,7 \cdot 10^6$** et **$7,3 \cdot 10^6$ U.F.C/ml** avec un pourcentage de **80%**, pour ensuite revenir à une valeur de **74%** à la concentration de **$4,1 \cdot 10^7$ U.F.C/ml** de l'inoculum.

Le test de la fermentation du mannose, devenu positif avec un inoculum de **$4,1 \cdot 10^7$ U.F.C/ml**, a été responsable de la diminution de la concordance des caractères.

II.3. *Streptococcus pyogenes* ou streptocoque du groupe A

II.3.1. Résultats du dénombrement

Tableau XVI : Dénombrement de *Streptococcus pyogenes*

Temps (min)	Concentration de l'inoculum (U.F.C/ml)
$T_0 = 0$	$3,5.10^4$
$T_1 = 60$	4.10^4
$T_2 = 120$	$7,2.10^5$
$T_3 = 180$	$8,9.10^6$
$T_4 = 240$	$2,06.10^7$
$T_5 = 300$	$1,55.10^8$

II.3.2. Détermination des paramètres

L'analyse des résultats obtenus a nécessité la détermination des critères d'interprétation, ceux-ci ont été les mêmes que pour *S. aureus* (cf. II.1.2).

II.3.3. Résultats des micro-plaques CSB

Les résultats ci-dessous ont été obtenus après incubation de micro-plaques CSB Streptoensemencées, les inocula correspondant à 1h (T_0) et 2h (T_1) d'incubation de la suspension bactérienne n'ont pas été ensemencés aux micro-plaques puisque la concentration de l'inoculum était encore trop faible.

Les résultats obtenus ont été reportés dans les tableaux ci-après :

- **Résultats des micro-galeries Strepto en fonction de l' inoculum de *S. pyogenes* et du temps d'incubation**

Tableau XVII : Résultats des Micro-CSB Strepto en fonction de l'inoculum de *S. pyogenes* et du temps d'incubation

Inocula (U.FC/ml)		T ₂ 7,2.10 ⁵				T ₃ 8,9.10 ⁶				Résultats attendus
Incubation en heures	Tests biochimiques	4	8	12	24	4	8	12	24	
	ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	BHS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ESC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VP	d	d	d	-	d	d	d	-	-
	AMD	-	-	-	-	-	-	-	-	V
	ARA	+	+	+	+	-	-	+	+	-
	GLY	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	INU	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LAC	-	-	+	+	-	-	+	+	+
	MAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RIB	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	SOR	-	-	+	+	-	-	+	+	-
	SOS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TRE	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Concordance des caractères (%)		58	65	65	72	72	72	72	80	100

Tableau XVII : Résultats des Micro-CSB Strepto en fonction de l'inoculum de *S. pyogenes* et du temps d'incubation (suite)

Inocula (U.F.C/ml)	T ₄ 2,06.10 ⁷				T ₅ 1,55.10 ⁸				Résultats attendus
Incubation en heures	4	8	12	24	4	8	12	24	
Tests biochimiques									
ADH	-	+	+	+	-	-	-	-	+
BHS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	d	d	d	-	d	d	d	-	-
AMD	-	-	-	-	-	-	-	-	V
ARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLY	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INU	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAC	-	+	+	+	-	+	+	+	+
MAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RIB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	+	+	+	+	+	+	+	-
SOS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TRE	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Concordance des caractères (%)	72	86	86	93	65	80	80	86	100

Légende : (+) = caractère positif

(-) = caractère négatif

(d) = caractère indéterminé

(V) = caractère variable

Remarque : La fermentation de l'amidon (**AMD**) est un caractère variable chez *S. pyogenes*, sa présence ou son absence ne sont donc pas caractéristiques de l'espèce. Lors de notre étude son résultat n'a pas été pris en compte dans la détermination de la concordance des caractères avec le profil type utilisé.

Les résultats des micro-plaques CSB Strepto ont été représentés sur les figures ci-après.

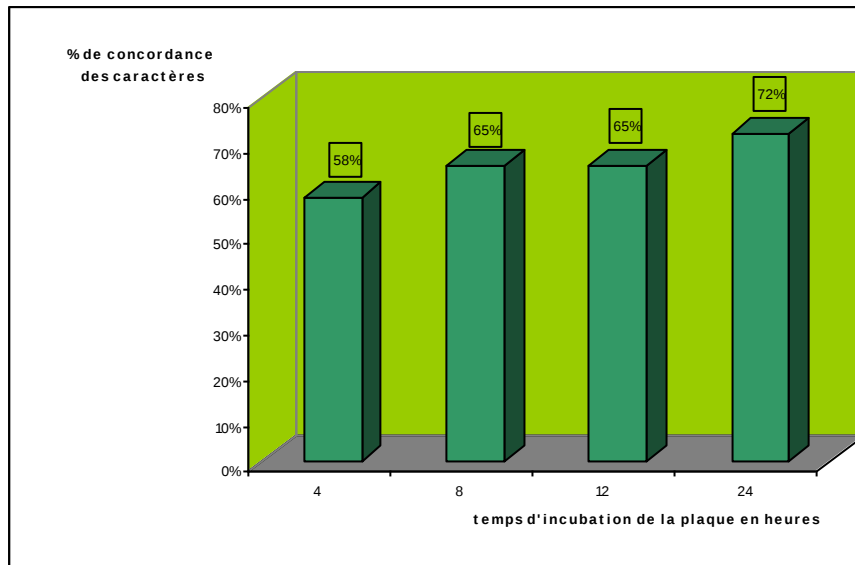


Figure 15 : La concordance des caractères étudiés avec un inoculum de *S. pyogenes* de $7,2.10^5$ U.F.C/ml en fonction du temps d'incubation de la micro-plaque CSB

Avec un inoculum de $7,2.10^5$ U.F.C/ml, l'identification de *S. pyogenes* a été impossible même au bout de 24h d'incubation de la plaque.

Les tests de la fermentation du sorbitol (**SOR**) et de l'arabinose (**ARA**) étaient positifs ; cependant, dans le profil de référence ces tests étaient négatifs.

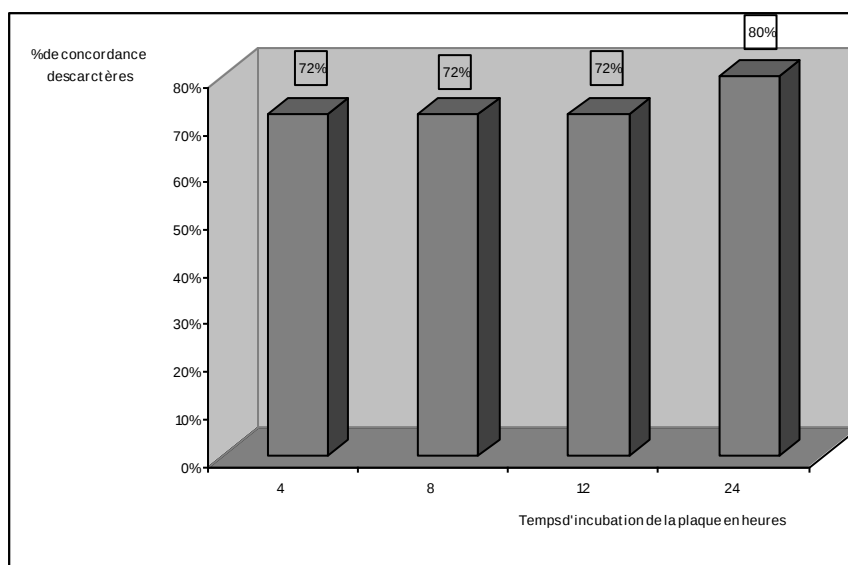


Figure 16 : La concordance des caractères étudiés avec un inoculum de *S. pyogenes* de $8,9.10^6$ U.F.C/ml en fonction du temps d'incubation de la micro-plaque CSB

Un inoculum de $8,9.10^6$ U.F.C/ml a permis une identification acceptable de *S. pyogenes* au bout de 24h.

De la 4^{ème} à la 12^{ème} heure d'incubation de la micro-plaque CSB le pourcentage de concordance des caractères est resté constant.

Le test de détection de l'arginine dihydrolase (**ADH**) est resté négatif contrairement aux tests de l'arabinose (**ARA**) et du sorbitol (**SOR**) qui étaient positifs.

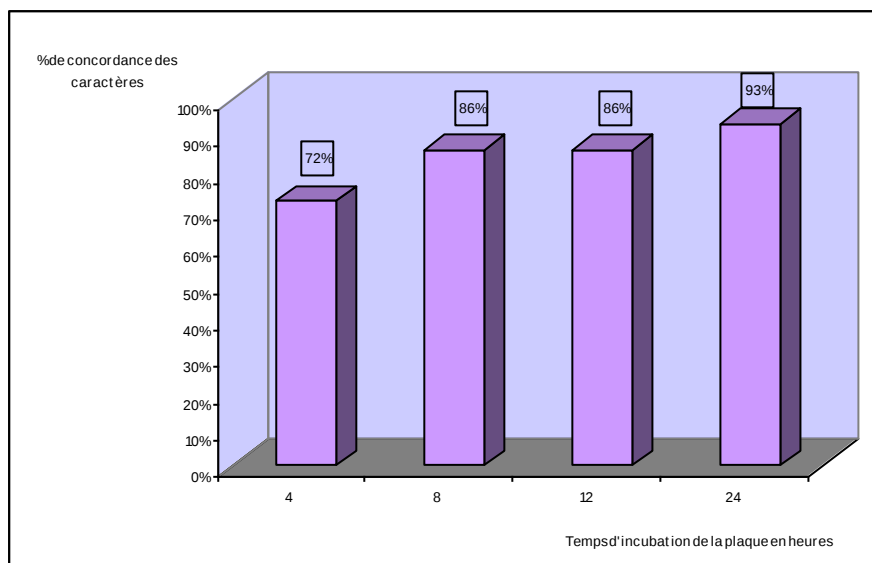


Figure 17 : La concordance des caractères étudiés avec un inoculum de *S. pyogenes* de $2,06.10^7$ U.F.C/ml en fonction du temps d'incubation de la micro-plaque CSB

L'identification a été acceptable dès la 8^{ème} heure d'incubation de la micro-plaque avec un inoculum de $2,06.10^7$ U.F.C/ml ; au bout de 24h d'incubation, l'identification a été bonne avec un pourcentage de conformité de 93%.

Le test de détection de l'ADH a été positif dès la 8^{ème} heure d'incubation de la micro-plaque de même que les tests de fermentation du lactose (LAC) et du tréhalose (TRE).

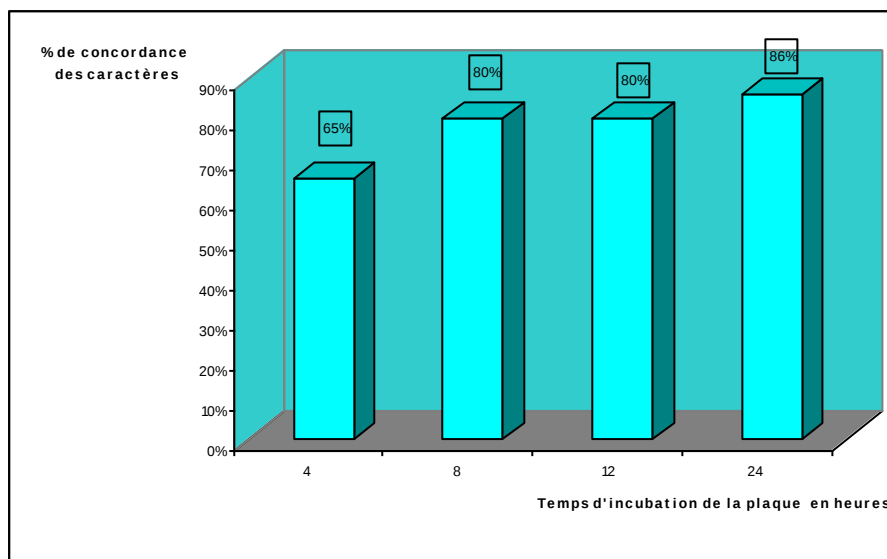


Figure 18 : La concordance des caractères étudiés avec un inoculum de *S. pyogenes* $1,55.10^8$ U.F.C/ml en fonction du temps d'incubation de la micro-plaque CSB

Avec un inoculum de $1,55.10^8$ U.F.C/ml, l'identification a été acceptable à la 8^{ème} heure ; il est toutefois important de remarquer que la concordance à tous les temps a été moins satisfaisante que celle obtenue avec un inoculum de $2,06.10^7$ U.F.C/ml.

Le test à l'**ADH** est redevenu négatif.

• **Résultats obtenus avec les microplaques CSB à la douzième heure d'incubation de la micro-plaque en fonction de l'inoculum de *S. pyogenes***

Il nous a semblé judicieux de comparer les résultats obtenus à la douzième heure afin de mettre en évidence leur évolution.

Tableau XVIII : Etude comparative des résultats obtenus à la douzième heure d'incubation de la plaque en fonction de l'inoculum de *S. pyogenes*

Inocula (U.F.C/ml)	I ₂ 7,2.10 ⁵	I ₃ 8,9.10 ⁶	I ₄ 2,06.10 ⁷	I ₅ 1,55.10 ⁸	Résultats attendus
Tests biochimiques					
ADH	-	-	+	-	+
BHS	-	-	-	-	-
ESC	-	-	-	-	-
VP	d	d	d	d	-
AMD	-	-	-	-	V
ARA	+	+	-	-	-
GLY	-	-	-	-	-
INU	-	-	-	-	-
LAC	+	+	+	+	+
MAN	-	-	-	-	-
RAF	-	-	-	-	-
RIB	-	-	-	-	-
SOR	+	+	+	+	-
SOS	-	-	-	-	-
TRE	-	+	+	+	+
Concordance des caractères (%)	65	72	86	80	100

Légende : (+) = caractère positif

(-) = caractère négatif

(d) = caractère indéterminé

(V) = caractère variable

La **figure 19** démontre l'évolution de la concordance des caractères à la douzième heure d'incubation de la micro-plaque en fonction des différents inocula.

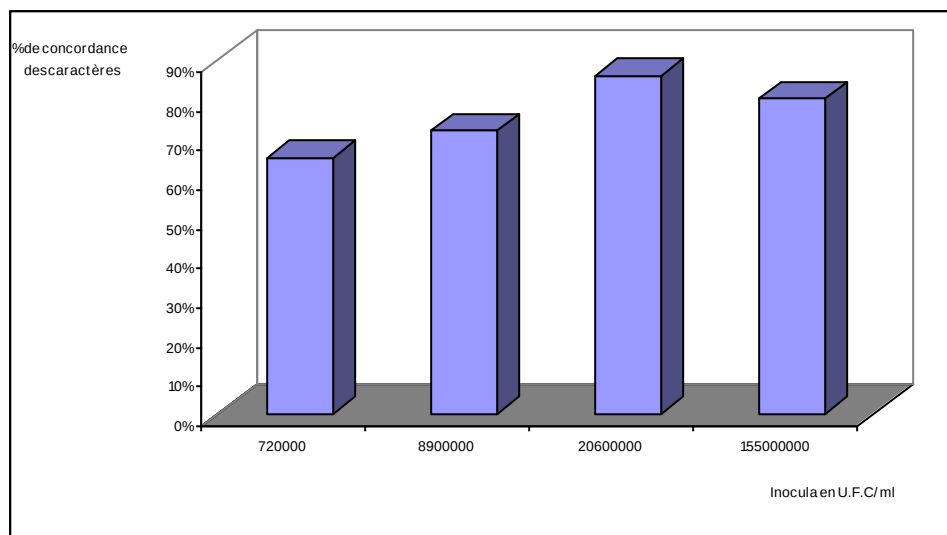


Figure 19 : Concordance des caractères biochimiques à la douzième heure d'incubation des micro-plaques CSB en fonction de l'inoculum de *S. pyogenes*

Le pourcentage de caractères conformes a été maximal avec un inoculum de **$2,06.10^7$ U.F.C/ml** obtenu au bout de **4h** d'incubation de la suspension bactérienne.

Des inocula plus faibles n'ont pas donné de résultats satisfaisants avec des pourcentages de **72** et de **65%**.

Avec un inoculum de **$1,55.10^8$ U.F.C/ml** obtenu au bout de **5h** d'incubation de la suspension bactérienne, l'identification est été acceptable avec un pourcentage de caractères conformes de **80%**. Il convient toutefois de noter la diminution de ce pourcentage par rapport à celui obtenu avec un inoculum de **$2,06.10^7$ U.F.C/ml**.

II.4. *Enterococcus faecalis*

II.4.1. Résultats du dénombrement

Tableau XIX: Dénombrement de *E. faecalis*

Temps d'incubation (min)	Concentration de l'inoculum (UFC/ml)
$T_0 = 0$	$2,8.10^5$
$T_1 = 60$	$3,4.10^5$
$T_2 = 120$	$2,0.10^6$
$T_3 = 180$	$2,6.10^7$
$T_4 = 240$	3.10^8
$T_5 = 300$	$7,5.10^9$

II.4.2. Détermination des paramètres

L'analyse des résultats obtenus a été effectuée grâce à des critères d'interprétation qui ont été les mêmes que ceux utilisés pour *S. aureus* (cf. II.1.2).

II.4.3. Résultats des micro-plaques CSB Strepto inoculés avec une suspension de *E. faecalis*

Les résultats obtenus ont été présentés dans les tableaux ci-après :

- Résultats des micro-galeries Strepto en fonction de l' inoculum de *E. faecalis* et du temps d'incubation

Tableau XX : Résultats des Micro-CSB Strepto en fonction de l'inoculum de *E. faecalis* et du temps d'incubation

Inocula (UFC/ml)	T ₂				T ₃				Résultats attendus
	2,0.10 ⁶				2,6.10 ⁷				
Incubation en heures	4	8	12	24	4	8	12	24	
Tests biochimiques									
ADH	-	-	+	+	-	-	+	+	+
BHS	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ESC	-	+	+	+	-	+	+	+	+
VP	d	d	d	+	d	d	d	+	+
AMD	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLY	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INU	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAC	-	-	-	-	-	+	+	+	+
MAN	-	-	+	+	-	-	+	+	+
RAF	-	-	+	+	-	-	+	+	+
RIB	-	-	-	-	-	-	+	+	+
SOR	-	+	+	+	-	+	+	+	+
SOS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TRE	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Concordance des caractères (%)	27	47	67	74	27	54	80	87	100

Tableau XX : Résultats des Micro-CSB Strepto en fonction de l'inoculum de *E. faecalis* et du temps d'incubation (suite)

Inocula (UFC/ml)	T ₄				T ₅				Résultats attendus
	3.10 ⁸				7,5.10 ⁹				
Incubation en heures	4	8	12	24	4	8	12	24	
Tests biochimiques									
ADH	-	-	+	+	-	-	+	+	+
BHS	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ESC	-	+	+	+	-	+	+	+	+
VP	d	d	d	+	d	d	d	+	+
AMD	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ARA	-	-	-	-	-	-	-	+	-
GLY	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INU	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAC	-	+	+	+	-	+	+	+	+
MAN	-	+	+	+	-	+	+	+	+
RAF	-	-	+	+	-	+	+	+	+
RIB	-	-	+	+	-	+	+	+	+
SOR	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SOS	-	-	-	-	-	+	+	+	-
TRE	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Concordance des caractères (%)	40	60	80	87	40	67	74	74	100

Légende : (+) = caractère positif,

(-) = caractère négatif,

(d) = caractère indéterminé.

Les concordances des caractères en fonction du temps d'incubation sont représentées sur les figures ci-après.

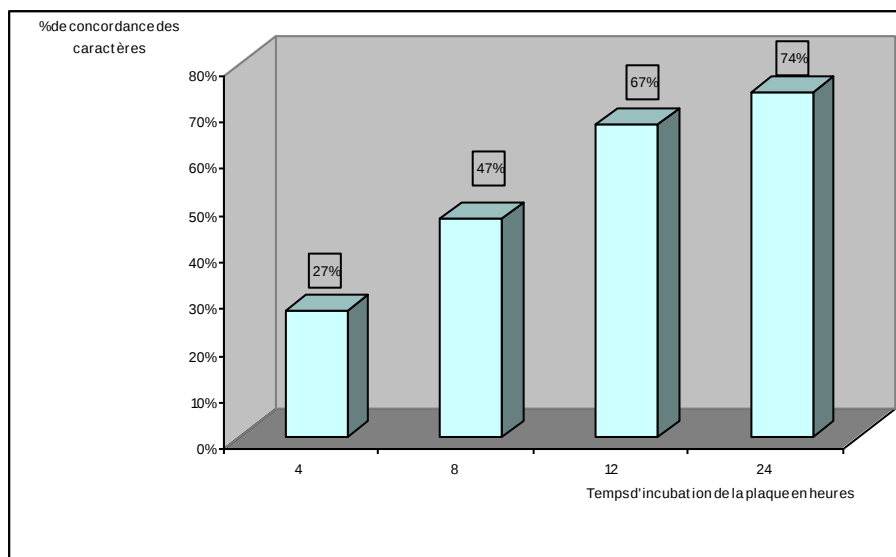


Figure 20 : La concordance des caractères étudiés avec un inoculum de *E. faecalis* de $2,0.10^6$ U.F.C/ml en fonction du temps d'incubation de la micro-plaque CSB

L'identification de *E. faecalis* n'a pas été possible avec un inoculum de $2,0.10^6$ U.F.C/ml.

La réaction à l'esculine est apparue très tôt, à **8h** d'incubation de la micro-plaque ainsi que les tests de fermentation du **sorbitol** et du **tréhalose**.

La corrélation entre le temps d'incubation de la plaque et le pourcentage de caractères conformes a été très perceptible.

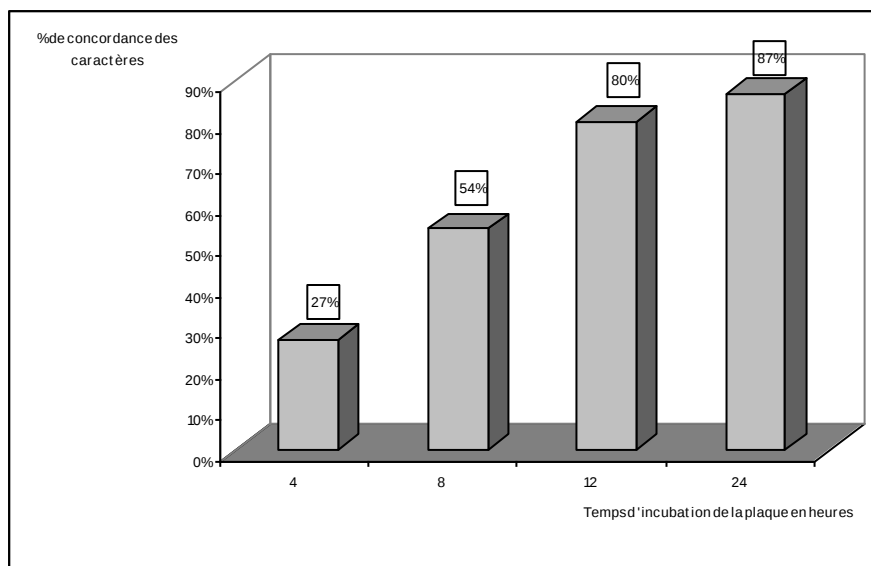


Figure 21 : La concordance des caractères étudiés avec un inoculum de *E. faecalis* de $2,6.10^7$ U.F.C/ml en fonction du temps d'incubation de la micro-plaque CSB

L'inoculum de $2,6.10^7$ U.F.C/ml a permis une identification précoce de la souche de *E. faecalis*; en effet, dès la 12^{ème} heure, le pourcentage de caractères favorables a été de 80%, ce résultat est, selon les critères d'identification retenus, acceptable. A ce stade déjà, la plupart des sucres avaient donné un résultat positif.

Au bout de 24h d'incubation l'identification a été possible avec 87% de caractères conformes.

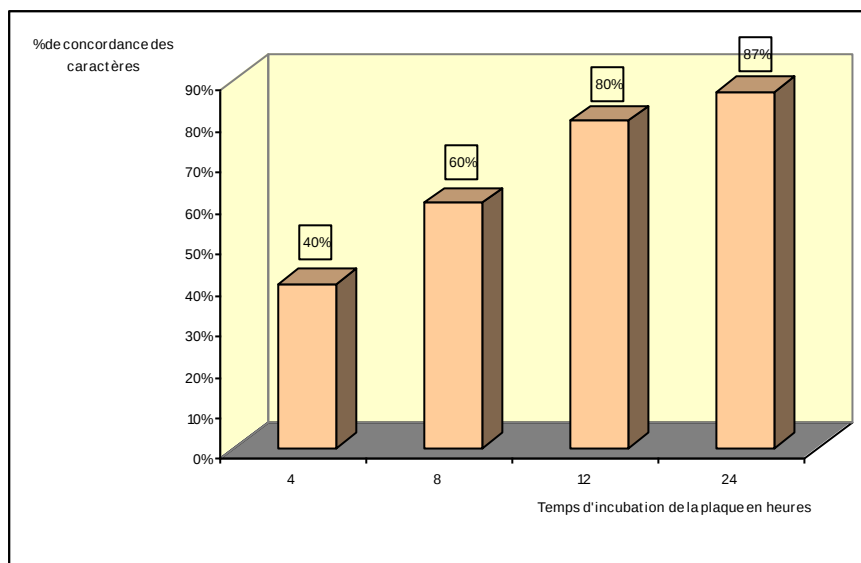


Figure 22 : La concordance des caractères étudiés avec un inoculum de *E. faecalis* de 3.10^8 U.F.C/ml en fonction du temps d'incubation de la micro-plaque CSB

L'identification a été acceptable dès la **douzième heure** d'incubation. Les réactions de fermentation du sorbitol (**SOR**) et du tréhalose (**TRE**) ont été positives dès la **4^{ème}** heure d'incubation de la micro-plaque.

Les résultats obtenus, avec un inoculum de **3.10^8 U.F.C/ml**, ont été similaires à ceux obtenus avec l'inoculum de **$2,6.10^7$ U.F.C/ml** à la **12^{ème}** et **24^{ème}** heures et ceci malgré l'augmentation de la taille de l'inoculum.

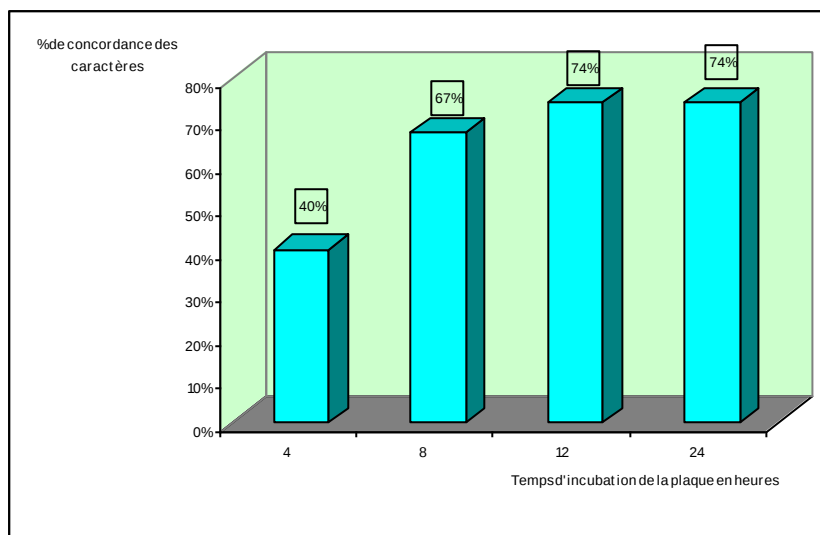


Figure 23 : La concordance des caractères étudiés avec un inoculum de *E. faecalis* de $7,5.10^9$ U.F.C/ml en fonction du temps d'incubation de la micro-plaque CSB

L'identification de *E. faecalis* a été, selon les critères d'interprétation, impossible avec un inoculum de $7,5.10^9$ U.F.C/ml.

Les réactions de fermentation du sorbose (**SOS**) et de l'arabinose (**ARA**) étaient devenues positives or dans le profil de référence, ces réactions étaient négatives.

Un inoculum de $7,5.10^9$ U.F.C/ml a permis une identification moins bonne que celle obtenue avec des inoculaensemencés au bout de **3h** et **4h** d'incubation de la suspension bactérienne.

Les tests de la croissance en bouillon hypersalé (**BHS**) ainsi que celui de la fermentation de l'amidon (**AMD**) sont restés négatifs tout au long de l'étude.

• **Résultats obtenus avec les micro-plaques CSB à la douzième heure d'incubation en fonction de l'inoculum de *E. faecalis***

La comparaison des résultats obtenus à la douzième heure d'incubation des micro-plaques nous a permis de mettre en évidence l'évolution des caractères favorables en fonction des différents inocula.

Tableau XXI: Etude comparative des résultats obtenus à la douzième heure d'incubation de la plaque en fonction de l'inoculum de *E. faecalis*

Inocula (U.F.C/ml) Tests biochimiques	I ₂ 2,0.10 ⁶	I ₃ 2,6.10 ⁷	I ₄ 3.10 ⁸	I ₅ 7,5.10 ⁹	Résultats attendus
ADH	+	+	+	+	+
BHS	-	-	-	-	+
ESC	+	+	+	+	+
VP	d	d	d	d	+
AMD	-	-	-	-	+
ARA	-	-	-	-	-
GLY	-	-	-	-	-
INU	-	-	-	-	-
LAC	-	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+
RAF	+	+	+	+	+
RIB	-	+	+	+	+
SOR	+	+	+	+	+
SOS	-	-	-	+	-
TRE	+	+	+	+	+
Concordance des caractères (%)	67	80	80	74	100

Légende : (+) = caractère positif,

(-) = caractère négatif,

(d) = caractère indéterminé.

La **figure XXIV** met en exergue l'évolution des caractères concordants en fonction de l'inoculum.

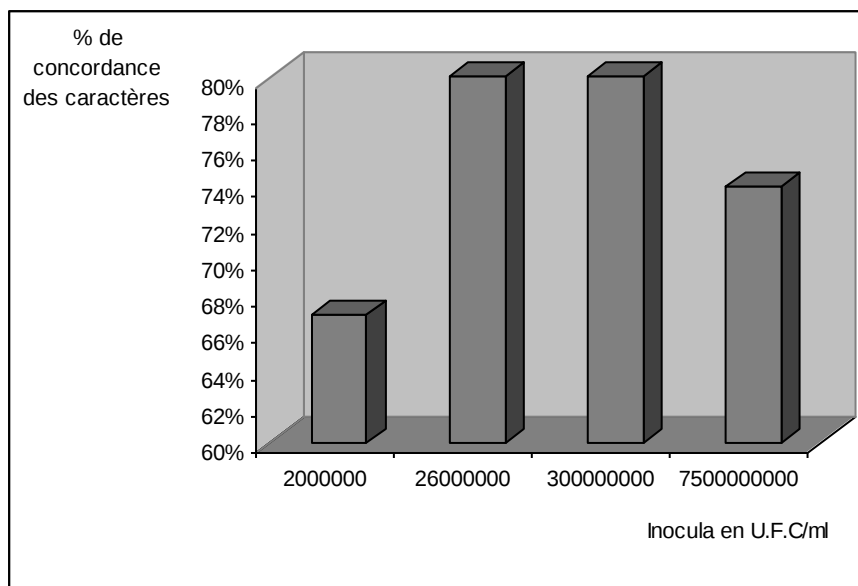


Figure 24 : Concordance des caractères à la douzième heure d'incubation des micro-plaques CSB en fonction de l'inoculum de *E. faecalis*.

A la douzième heure d'incubation des micro-plaques CSB, les concordances les plus élevées ont été obtenues à I_3 et I_4 avec des inocula de $2,6 \cdot 10^7$ et $3 \cdot 10^8$ U.F.C/ml.

Avec ces inocula, **12** des caractères explorés ont donné des résultats satisfaisants. Parmi les trois autres caractères, deux, à savoir les tests de croissance en **BHS** et de fermentation de l'amidon sont restés négatifs pendant toute la durée de l'analyse. Le troisième test concernait la réaction de Voges-Proskauer (**VP**) dont la positivité ne pouvait être déterminée qu'au bout de **24h** ; en effet, il nécessitait l'addition de réactifs de révélation.

III. Validation par étude de la linéarité

Lors de notre étude, les meilleurs résultats ont été obtenus après 12 et 24h d'incubation des micro-plaques CSB. Les résultats obtenus au bout de 24h avec ces mini-galeries d'identification ayant déjà été largement explorés par des études antérieures, nous nous sommes concentrés lors de la validation sur les résultats obtenus au bout de 12h.

III.1. Paramètres de détermination de la droite de régression

La droite de régression est utilisée pour estimer la valeur d'une variable dépendante sachant une valeur (réelle ou potentielle) de la variable indépendante.

Pour faire la prédiction, il s'agit simplement de substituer la valeur donnée à x dans l'équation de régression et de calculer la valeur de y .

Expression des résultats et traçage de la droite de concordance :

$$y = a x_i + b \quad ; \quad x = \log [n] \quad ; \quad y_0 = C$$

$$b = \frac{N \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{N \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$a = \frac{\sum y}{N} - b \frac{\sum x}{N}$$

$$r = \frac{N \sum xy - (\sum x) (\sum y)}{\sqrt{N \sum x^2 - (\sum x)^2} \sqrt{N \sum y^2 - (\sum y)^2}}$$

r = coefficient de corrélation ; **x_i** = données observées ;
a = pente de la droite ; **b** = ordonnée à l'origine ;
N = nombre de paires (x ; y) ; **n** = concentration de l'inoculum ;
C = concordance des caractères étudiés.

.

Critères d'interprétation

r = 0,2 à 0,4 : Corrélation faible ou quasi absence de corrélation ;
r = 0,4 à 0,6 : Corrélation moyenne ;
r = 0,6 à 0,8 : Bonne corrélation ;
r = 0,8 : Corrélation élevée ;
r = 1 ou -1 : Corrélation parfaite.

III.2. *Staphylococcus aureus*

Tableau XXII: Résultats de *S. aureus* à la douzième heure d'incubation des micro-plaques CSB Staph.

Concentrations inocula (U.F.C/ml)	$5,7.10^5$	$2,2.10^6$	$2,3.10^7$	$8,8.10^8$	$1,11.10^{10}$
Concordance des caractères (%)	54	74	74	80	80
$x = \log [n]$	5,75	6,34	7,36	8,94	10,04
$y_0 = C$	0,54	0,74	0,74	0,8	0,8
a	0,0472				
b	0,3609				
$y = ax+b$	0,63	0,66	0,7	0,78	0,84
r	0,78				

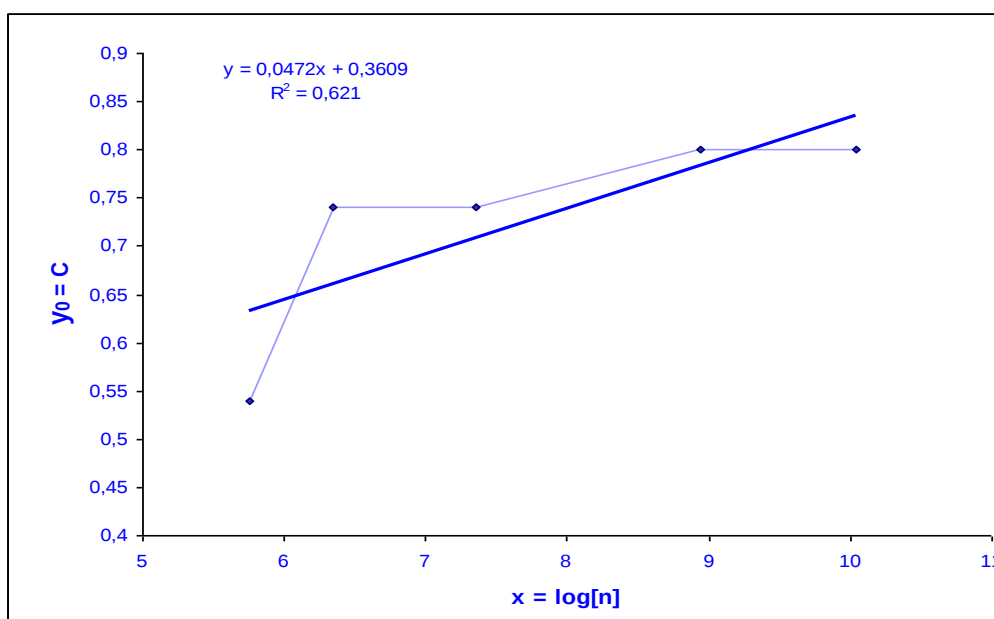


Figure 25: Droite de régression de *S. aureus* à la douzième heure

Il existe une bonne corrélation entre la taille de l'inoculum et la concordance des caractères de *S. aureus*. La valeur de **a** obtenue à partir de la pente de la droite est presque nulle. L'équation de la droite déterminée grâce à la méthode des moindres carrés est sous la forme **$y = 0,0472x + 0,03609$** et le pourcentage de surface commune est donné par **R^2** , il est égal à **0,621**.

III.3. *Staphylococcus epidermidis*

Tableau XXIII : Résultats de *S. epidermidis* à la douzième heure d'incubation des micro-plaques CSB Staph

Concentrations inocula (U.F.C/ml)	4.10^4	$8,5.10^4$	$2,7.10^6$	$7,3.10^6$	$4,1.10^7$
Concordance des caractères (%)	67	74	80	80	74
$x = \log [n]$	4,6	4,92	6,43	6,86	7,61
$y_0 = C$	0,67	0,74	0,8	0,8	0,74
a	0,0259				
$y = ax+b$	0,71	0,72	0,75	0,77	0,78
b	0,5924				
r	0,618				

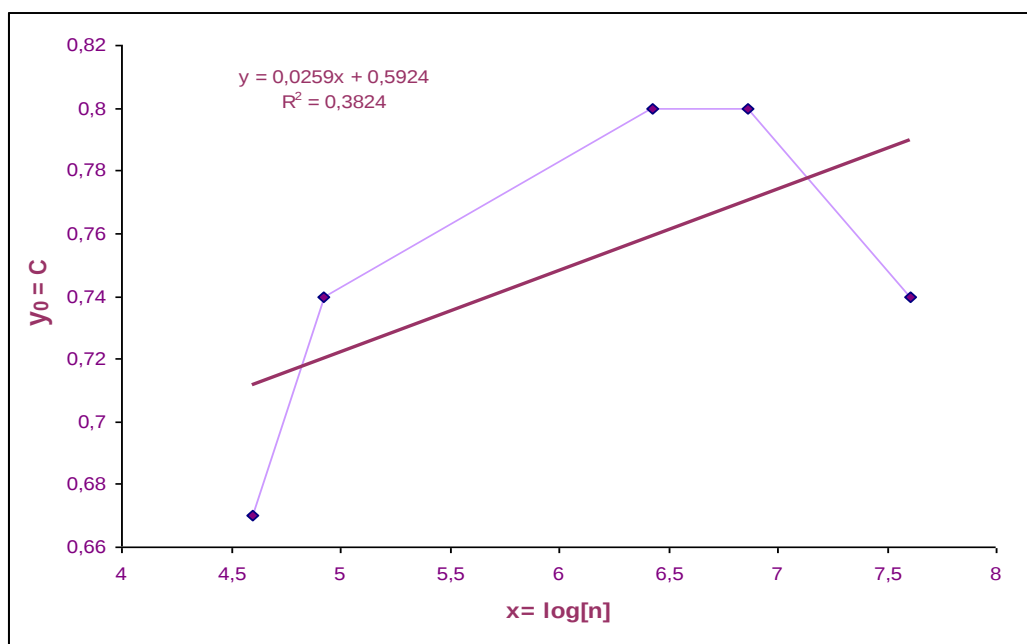


Figure 26 : Droite de régression de *S. epidermidis* à la douzième heure

La corrélation entre la concordance des caractères et la taille de l'inoculum est bonne, ces deux variables sont reliées par l'équation de droite $y = 0,0259x + 0,5924$ et le coefficient de corrélation r est de **0,618**.

III.4. *Streptococcus pyogenes*

Tableau XXIV: Résultats de *S. pyogenes* à la douzième heure d'incubation de la micro-plaque CSB Strepto

Concentrations inocula (U.F.C/ml)	$7,2.10^5$	$8,9.10^6$	$2,06.10^7$	$1,55.10^8$
Concordance des caractères (%)	65	72	86	80
$x = \log [n]$	5,85	6,95	7,31	8,19
$y_0 = C$	0,65	0,72	0,86	0,8
a	0,0738			
b	0,2351			
$y = ax+b$	0,66	0,74	0,77	0,83
r	0,78			

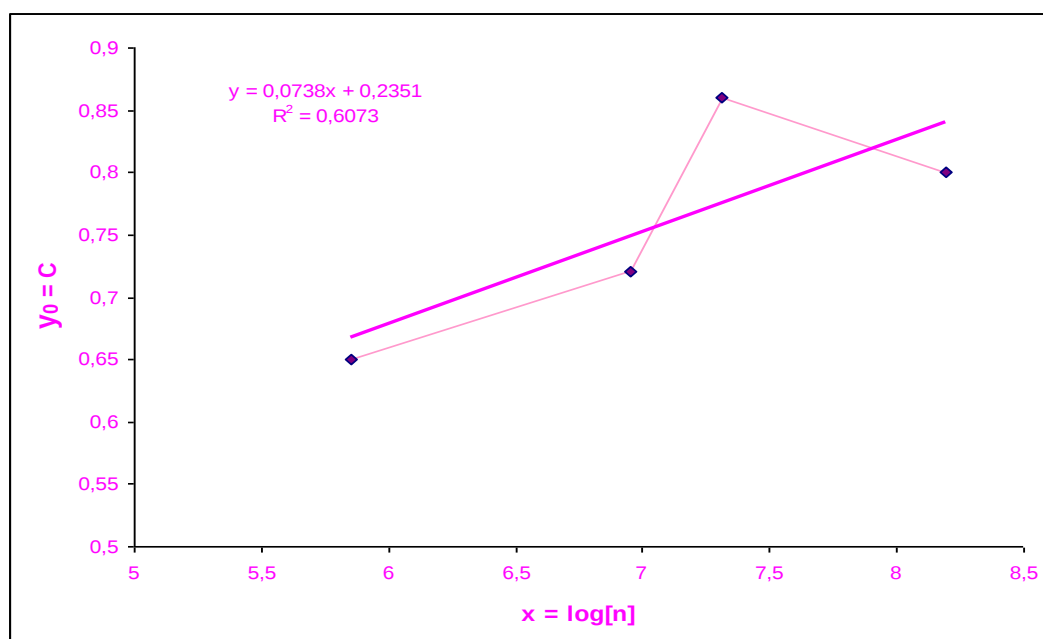


Figure 27 : Droite de régression de *S. pyogenes* à la douzième heure

La droite de régression montre une bonne corrélation entre la concordance des caractères de *S. pyogenes* à la douzième heure et la taille de l'inoculum avec un coefficient de corrélation r dont la valeur est de **0,78**.

III.5. *Enterococcus faecalis*

Tableau XXV : Résultats de *E. faecalis* à la douzième heure d'incubation de la micro-plaque CSB Strepto

Concentrations inocula (U.F.C/ml)	$2,0 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^8$	$7,5 \cdot 10^9$
Concordance des caractères (%)	67	80	80	74
$x = \log [n]$	6,3	7,41	8,47	9,87
$y_0 = C$	0,67	0,8	0,8	0,74
a	0,016			
b	0,6244			
$y = ax+b$	0,72	0,74	0,75	0,78
r	0,39			

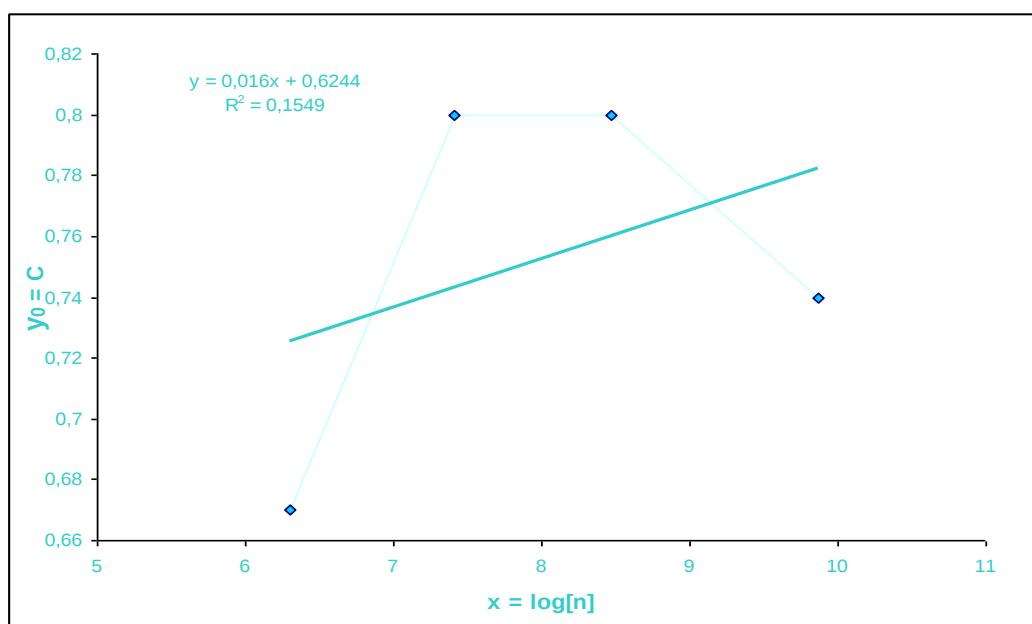


Figure 28 : Droite de régression de *E. faecalis* à la douzième heure

Pour *E. faecalis* le coefficient de corrélation de la droite de régression est faible, ceci s'explique par le fait qu'à une certaine concentration élevée de l'inoculum, la concordance des caractères a régressé.

IV. DISCUSSION

L'ensemble des espèces étudiées a pu être identifié en moins de 24h d'incubation ; ceci implique qu'il est possible de réduire le temps d'incubation des micro-plaques CSB en choisissant un inoculum adapté.

IV.1. Les souches bactériennes

Cette étude a porté sur 4 espèces bactériennes, le choix des espèces a été guidé par l'importance de ces germes en pathologie infectieuse. En effet, chacune des espèces choisies constitue soit le chef de file d'un groupe de germes ou alors un des plus pathogène de son groupe.

Nous avons utilisé des souches de référence et des souches de contrôle ; bien que les germes aient déjà été identifiés avant leur conservation, nous avons de nouveau procédé à leur identification. Cette étape a notamment permis d'éviter d'éventuelles erreurs dans la suite de notre étude.

Le délai entre le prélèvement des inocula et leur ensemencement devait être le plus court possible pour mieux refléter l'état métabolique des germes étudiés et éviter une probable augmentation de la taille des inocula.

IV.2. Etude de la croissance par la méthode de dénombrement sur

boîte de pétri

La méthode de dénombrement sur boîte de pétri est la méthode de numération bactérienne la plus classique ; elle allie en effet, une simplicité de mise en œuvre et une bonne précision [9]. La principale difficulté avec cette méthode a été de trouver la dilution convenable du bouillon qui permette d'obtenir des colonies bien isolées après ensemencement sur gélose et incubation.

La méthode de la mesure de la densité optique par turbidimétrie aurait pu nous permettre de suivre l'évolution de la croissance bactérienne ; cependant, elle présente l'inconvénient de ne pas différencier les cellules viables de celles non viables [36].

IV.3. Recherche de l'effet de l'inoculum et du temps d'incubation sur l'identification

Panikov (1995) déplorait que « l'étude des cinétiques se limite souvent à un enregistrement passif de la croissance alors qu'au contraire, elle devrait 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...» [11].

Notre étude s'inscrit dans cette logique ; elle a ainsi permis de mettre en exergue l'effet que peut avoir une augmentation de la taille de l'inoculum sur l'identification. Sachant que l'identification des espèces bactériennes grâce à la micro-méthode CSB est basée sur leurs caractères biochimiques et métaboliques, cette étude a par extension permis de déterminer la "perceptibilité" des caractères biochimiques et métaboliques des germes étudiés en fonction des inocula.

Cependant, nous nous sommes interrogés sur la part imputable aux variations des caractères intrinsèques des bactéries dans cette évolution de la conformité des caractères. Cette question est d'autant plus pertinente qu'à une certaine valeur très élevée de l'inoculum, nous avons eu à observer une variation dans le sens d'une baisse du nombre de tests positifs. Certains de ces tests avaient donné des résultats positifs avec des inocula plus faibles. C'est le cas de *E. faecalis* avec un inoculum de $7,5.10^9$ U.F.C/ml. Une explication à ceci serait qu'à un stade de la croissance (en phase stationnaire, décroissance et de mortalité) en milieu non renouvelé, il y a épuisement d'un facteur limitant auquel s'ajoute une accumulation de déchets toxiques [16,3]. En outre, les micro-organismes sont influencés de façon permanente par les facteurs environnementaux auxquels ils sont soumis. Par conséquent, nous pensons que l'instabilité des caractères des bactéries à certains inocula pourrait être le résultat d'une adaptation des souches étudiées à un environnement déficient. Ainsi, Permont J. (1993) a mis en exergue les fluctuations des caractères enzymatiques des bactéries en fonction de l'environnement auquel elles sont soumises et les répercussions sur leur identification [33].

IV.3.1. Staphylocoques

Il a été noté des différences dans la cinétique de croissance des espèces de staphylocoques, cela atteste que, bien qu'appartenant au même genre, ces germes ont des caractéristiques intrinsèques différentes.

Sur les 15 caractères explorés, deux étaient nécessaires au diagnostic du genre : le glucose et le glycérol ; et les autres au diagnostic d'espèce : tréhalose, mannitol, xylose, saccharose, mannose, lactose, raffinose, urée, ornithine-décarboxylase, ONPG, et le Voges Proskauer. Toutefois, deux caractères ne sont pas directement impliqués dans l'identification, ce sont l'arginine-dihydrolase et le nitrate.

Ce constat rejoint le choix de Kloos et Schleifer qui n'avaient pas introduit l'ADH au schéma simplifié d'identification des espèces de staphylocoques ; ainsi l'exploration de ce test n'avait pas été jugée nécessaire [1].

Le test de la réduction des nitrates n'est pas nécessaire à l'identification des souches de staphylocoques, il peut toutefois constituer une information supplémentaire sachant que 83% des souches de *S. aureus* réduisent les nitrates pour seulement 23% des souches de *S. epidermidis* [2].

Après 150 et 180 min d'incubation de la suspension bactérienne correspondant aux inocula de $8,8.10^8$ et $1,11.10^{10}$ U.F.C/ml pour *S. aureus* et $2,7. 10^6$ et $7,3.10^6$ U.F.C/ml pour *S. epidermidis*, l'identification des souches a été acceptable à la douzième heure d'incubation des micro-plaques CSB. Sur les 15 tests biochimiques et métaboliques explorés, 12 avaient donné les résultats attendus soit un pourcentage de 80% par rapport au profil de référence.

Pour *S. aureus*, les 3 caractères discordants concernaient les tests devant être révélés par l'addition de réactifs (le test de Voges Proskauer et le test de la réduction des nitrates) ainsi que le test à l'ADH.

Une galerie API Staph (laboratoires BioMérieux) inoculée avec la même souche avait donné un résultat négatif pour le test à l'ADH. De plus, comme nous l'avons précédemment évoqué, le test à l'ADH ne constitue pas un caractère indispensable à l'identification des espèces de staphylocoques.

Par ailleurs, de nombreux travaux ont permis de démontrer le mécanisme complexe de cette hydrolyse et ont mis en évidence que, l'enzyme, appelée «arginine dihydrolase», était en fait un système complexe. La réaction commence par une hydrolyse de l'arginine en citrulline. Il se produit ensuite une dégradation de la citrulline en ornithine, ammoniac et gaz carbonique. D'abord considérée comme une simple hydrolyse catalysée par la citrullinase, cette réaction impliquerait, en réalité, un couplage avec une phosphorylation de l'adénosine. De surcroît, l'arginine dihydrolase est un système induit [39].

Concernant *S. epidermidis*, les trois caractères discordants se rapportaient aux tests révélés et à celui de l'ONPG.

Le test à l'ONPG est resté négatif tout au long de l'étude. D'autres auteurs tels que Sow M. F. (2007) s'étaient heurtés au même problème et, pour expliquer ce constat, ils avaient émis l'hypothèse suivante : la β -galactosidase est une enzyme inductible et pour favoriser la réaction, il aurait fallu ajouter une solution de lactose à 10%. Nous pensons que cette hypothèse est pertinente dans la mesure où lors de la préparation de la solution du test à l'ONPG des Micro-CSB System, l'élution était effectuée avec de l'eau distillée. Une autre hypothèse serait que les faibles quantités de substrats pourraient empêcher une expression métabolique suffisante en compétition avec une éventuelle lyse bactérienne. L'hypothèse de la mutation bactérienne n'est pas à écarter : le génome des bactéries est constitué d'un seul chromosome et toute mutation, aussi minime soit-elle, se traduit directement par un phénomène visible comme l'absence de métabolisme d'un substrat donné. Les bactéries ne possèdent pas un deuxième chromosome qui pourrait compenser les mutations occasionnées sur le premier [10].

Il aurait été intéressant de déterminer au cours des différentes lectures, si les tests nécessitant d'être révélés par d'autres réactifs avaient donné les résultats attendus et, au bout de combien de temps d'incubation. Cette démarche aurait pu éventuellement nous fournir de meilleurs résultats. Cependant, l'addition des réactifs de révélation aurait arrêté toute activité métabolique au niveau de ces cupules en entraînant une mort bactérienne. Ce désagrément aurait pu être évité en ensemençant un plus grand nombre de plaques, ce qui risquerait d'être coûteux et par conséquent pas dans l'intérêt de l'étude.

Certains paramètres explorés par les micro-plaques CSB sont indispensables à une bonne identification des staphylocoques ; par contre, d'autres sont moins importants [29] (cf. tableau ci-dessous).

Tableau XXVI: Caractères secondaires (.) et indispensables (X) à l'identification de *Staphylococcus aureus* [29]

CARACTERES															
	GLU	TRE	MAN	XYL	SAC	GLY	MNE	LAC	RAF	URE	ADH	ODC	VP	ONPG	NIT
<i>S aureus</i>	x	.	x	.	x	x	.	x	x	.	.	x	.	.	.
<i>S. epidermidis</i>	x	x	x	.	.	x	.	.	x	x	.	.	.	x	.

En comparant ce tableau avec les résultats que nous avons obtenus à la douzième heure d'incubation de la plaque, nous notons que 100% des caractères indispensables ont donné des résultats favorables pour *Staphylococcus aureus*. Pour *Staphylococcus epidermidis* 86% des caractères indispensables sont concordants ; le seul caractère indispensable discordant est le test à l'ONPG.

La capacité de détection des caractères enzymatiques et métaboliques des bactéries grâce à des substrats synthétiques a été largement explorée par des études antérieures [5]. La détermination des activités enzymatiques des isolats avec une série de substrats synthétiques peut être employée pour l'identification et donner des résultats similaires à ceux obtenus par d'autres méthodes de caractérisation. La caractérisation enzymatique des micro-organismes au moyen de substrats synthétiques est basée sur le fait que beaucoup d'enzymes sont constitutivement présents ou facilement induits et rapidement perceptibles [5]. Aujourd'hui une large gamme de galeries est disponible sur le marché. Parmi ces kits, certains ont largement pu réduire leur temps d'incubation, ainsi les Vitek 2 (BioMérieux-vitek) et MicroScan Rapid Pos ID (Dade Behring) ne nécessitent qu'une incubation de 3h et 2h respectivement ; il faut remarquer que ces systèmes présentent l'avantage d'être automatiques comme la plupart des galeries de nos jours [5, 23, 44].

D'autres galeries restent encore manuelles à l'instar de Staph Ident System (Analytab Products) et de Gp Microplate panel (Biolog) qui nécessitent une incubation de 5h et 4h respectivement [1, 12, 44].

La plupart des études qui ont été effectuées sur ces galeries mettaient en évidence leur efficacité de même que leur précision par comparaison à d'autres méthodes de référence. Cependant, le problème de la standardisation de l'inoculum n'était que très rarement abordé, encore moins son effet sur l'identification.

IV.3.2. *Streptococcus pyogenes* et *Enterococcus faecalis*

Aux inocula correspondant à 10^7 et 10^8 U.F.C/ml, l'identification de *S. pyogenes* et de *E. faecalis* a été possible après 12h d'incubation des plaques Micro-CSB.

Pour *E. faecalis*, trois caractères étaient discordants. Ces derniers concernaient les tests de Voges Proskauer, de croissance en milieu hypersalé et de l'acidification de l'amidon.

Pour *S. pyogenes* seuls les tests d'assimilation du sorbose et de Voges Proskauer étaient discordants.

Le résultat du test de VP ne pouvait être déterminé qu'au bout de 24h d'incubation des Micro-CSB System.

Le test de croissance en milieu hypersalé est resté négatif tout au long de l'étude de *E. faecalis* avec les micro-plaques CSB. Un bouillon hypersalé en tube ensemencé avec la même souche, avait fourni un résultat positif ; ce problème est donc certainement lié aux micro-plaques, il pourrait éventuellement s'agir d'un défaut de concentration du substrat ou de sensibilité de l'indicateur coloré. Bien que ce test soit utilisé pour le diagnostic du genre [6], il n'est toutefois pas indispensable à l'identification des espèces du genre *Enterococcus* raison pour laquelle il n'avait pas été inclus dans l'algorithme d'identification recommandé par l'Agence de la Protection de la Santé [19].

Concernant *Streptococcus pyogenes*, le test de l'acidification du sorbose a été positif; une des limites de l'identification phénotypique est que la comparaison se fait souvent par rapport à un profil de référence, cependant, à l'intérieur d'une même espèce il peut être noté des différences, lorsque celles-ci sont biochimiques ou physiologique, les souches sont des biovars [35]. De même, les caractères considérés comme importants sont subjectifs ; il faut garder à l'esprit que ces caractères peuvent être absents, notamment chez les germes mutants [35].

Durant l'étude de *Enterococcus faecalis*, le test à l'amidon est resté négatif. Aux hypothèses déjà émises concernant les tests d'assimilation des sucres, nous pourrions ajouter que : « Les activités enzymatiques sont influencées par des variations de pH et de température. Chaque enzyme travaille plus rapidement à un pH optimal spécifique. Quand le pH est trop éloigné du pH optimal l'activité diminue et l'enzyme peut être endommagée. » [36].

IV.4. Validation

Nous avons procédé à la validation de notre méthode en termes de linéarité. L'étude de la linéarité a été effectuée par la détermination de la droite de régression, il a été ainsi établi la corrélation entre le logarithme de la concentration de l'inoculum et le pourcentage de concordance des caractères. Les coefficients de corrélation ont subséquemment été déterminés. Les valeurs obtenues : 0,78 pour *S. aureus*, 0,61 pour *S. epidermidis* et 0,78 pour *S. pyogenes* montrent une bonne corrélation entre les deux variables étudiées. La plus faible valeur $r = 0,39$ obtenue pour *E. faecalis*, est due à une baisse des caractères concordants lorsque l'inoculum atteint une certaine taille, ce phénomène a été précédemment évoqué.

En Résumé

Toutes les souches étudiées ont pu être identifiées dans les douze heures d'incubation des Micro-CSB system. Cependant, très souvent l'identification n'était qu'acceptable, elle n'était franchement bonne qu'au bout de 24h d'incubation. Les inocula ayant permis une identification à la douzième heure étaient : $8,8.10^8$ et $1,11.10^{10}$ U.F.C/ml pour *S. aureus*; $2,3.10^6$ U.F.C/ml et $7,3.10^6$ pour *S. epidermidis* ; $2,06.10^7$ et $1,55.10^8$ U.F.C/ml pour *S. pyogenes* et 3.10^8 et $7,5.10^9$ U.F.C/ml pour *E. faecalis*. Avec ces inocula 354 caractères ont été explorés, 277 tests ont donné les résultats escomptés à la douzième heure d'incubation soit 78,82% et 77 tests n'ont pas donné le résultat attendu soit 21,7% (cf. figure ci-après).

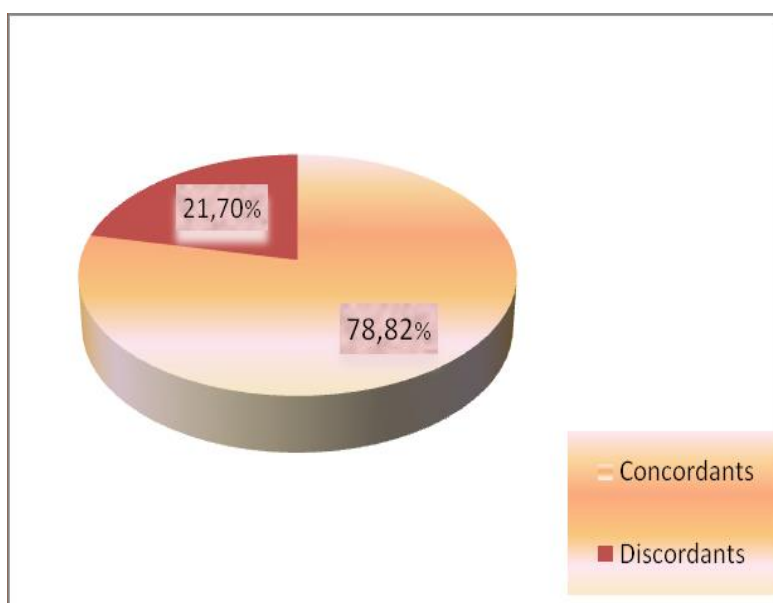


Figure 29 : Diagramme de distribution de la concordance des caractères pour tous les tests à la douzième heure d'incubation des Micro-CSB System

La détermination de la droite de régression a montré une bonne corrélation entre la concentration de l'inoculum et le pourcentage de concordance des caractères pour *S. aureus*, *S. epidermidis*, et *S. pyogenes* ; pour *E. faecalis*, la corrélation a été moyenne.

Les cocci à Gram positif occupent une place importante en pathologie infectieuse et une bonne prise en charge des affections qu'ils entraînent nécessite une identification efficiente. Celle-ci est de nos jours le plus souvent assurée grâce à l'utilisation de galeries biochimiques et métaboliques qui reposent sur la mise en évidence des caractères phénotypiques de ces germes. En routine, les galeries les plus souvent utilisées sont les galeries API (BioMérieux). Ces dernières présentent cependant le désagrément d'être onéreuses pour les populations démunies de nos pays en voie de développement. C'est dans ce contexte que les galeries Micro-CSB System ont été développées par l'unité de recherche de microbiologie du laboratoire de bactériologie-virologie Aristide Le Dantec.

Cette gamme de galeries a eu pour avantage de concilier une bonne identification avec un faible coût. Toutefois, elle présente l'inconvénient de nécessiter une longue durée d'incubation (24h). L'importance d'un diagnostic précoce dans la prise en charge des infections bactériennes n'est plus à démontrer ; de plus, de nombreuses galeries d'identification existant actuellement sur le marché ont considérablement réduit leur délai de lecture. Notre travail a donc eu pour objectif d'étudier une éventuelle possibilité de réduction des temps d'incubation des Micro-CSB Staph et Strepto. Il a été réalisé en déterminant l'effet que pouvait avoir une variation de la taille de l'inoculum bactérien sur le temps d'incubation des micro-plaques.

Cette étude a eu lieu entre octobre 2007 et juin 2008 et a porté sur 4 espèces bactériennes qui étaient :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ;
- *Staphylococcus epidermidis* ;
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ;
- *Streptococcus pyogenes*.

L'étude de l'effet de l'inoculum et du temps d'incubation a été réalisée en ensemençant une à deux colonies du germe étudié dans 10 ml de bouillon glucosé tamponné. Puis, à chaque espace temps (30 min pour les staphylocoques et 1h pour les streptocoques), était effectué un prélèvement de 1,4 ml de la suspension bactérienne. Celui ci servait à inoculer une micro-plaque CSB et deux géloses MH. Les résultats des micro-plaques étaient notés au bout de 4h, 8h, 12h et 24h d'incubation. Les géloses MH étaient utilisées pour le dénombrement bactérien et leur lecture se faisait au bout de 24h.

Nous avons ainsi pu identifier toutes nos souches au bout de 12h d'incubation des micro-plaques. L'évolution du pourcentage de concordance des caractères était variable en fonction de la concentration de la suspension bactérienne. Les inocula qui permettaient une identification au bout 12h d'incubation étaient : $8,8.10^8$ et $1,11.10^{10}$ U.F.C/ml pour *S. aureus*; $2,3.10^6$ et $7,3.10^6$ U.F.C/ml pour *S. epidermidis* ; $2,06.10^7$ et $1,55.10^8$ U.F.C/ml pour *S. pyogenes* et 3.10^8 et $7,5.10^9$ U.F.C/ml pour *E. faecalis*. La valeur de la concordance des caractères avec ces inocula était de 80%.

La méthode a été validée en termes de linéarité. Ainsi, la détermination de la droite de régression a permis de mettre en exergue une corrélation positive entre le logarithme de la concentration de l'inoculum et la concordance des caractères conformes au profil de référence. Néanmoins, il a été noté pour certaines souches telles que *E. faecalis* et *S. epidermidis* une valeur seuil des inocula au-delà de laquelle le nombre de caractères concordants diminuait.

Les résultats obtenus nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

- la réduction du temps d'incubation des galeries Micro-CSB est envisageable ;
- il existe une densité bactérienne plus adaptée à un court délai d'incubation des micro-plaques ;
- il y a une corrélation positive entre la taille de l'inoculum et l'identification des souches ;
- il existe pour chaque inoculum une valeur seuil au delà de laquelle l'identification est perturbée.

Ces données pourraient constituer une base pour des études ultérieures ; en effet la réduction effective du temps d'incubation des Micro-CSB System nécessite d'autres recherches. Il serait ainsi intéressant de contourner la principale limite de ce travail qui n'est autre que l'impossibilité de déterminer les résultats des tests à révéler après une courte durée d'incubation. De plus, les effets de la variation de la concentration du substrat et de la sensibilité de l'indicateur coloré sur l'identification pourraient être déterminés en prenant en compte ces résultats désormais acquis. Nous pensons que la détermination de ces paramètres pourrait fournir de meilleurs résultats. Une nouvelle génération de Micro-CSB System est née.

**1. ALDRIDGE K. E., STRATTON C. W., PATTERSON L. S.,
EVANS M.E. AND HODGES R.L.**

Comparison of the Staph-Ident System with a Conventional Method for species identification of urine and blood Isolates of coagulase-negative staphylococci.

Journal of Clinical Microbiology, 1983, 17(3) : 516-520.

2. API STAPH

Identification for staphylococci and micrococci.

Lyon : BioMérieux sa, 2002.

008038-4

**3. ASSOCIATION DES ENSEIGNANTS DE MICROBIOLOGIE ET
D'IMMUNOLOGIE DES FACULTES DE PHARMACIE FRANCAISES ;
COORDINATEUR: BOSGIRAUD C.**

Microbiologie générale et santé.

Paris : ESKA, 2003, 155-207.

ISBN : 2-7472-0420-0

4. BAKHOUM I. M.

Contrôle de qualité et validation des différentes microméthodes d'identification bactérienne.

Thèse pharmacie. Dakar : U.C.A.D., 2004, N° 08.

5. BASCOMB S. AND MAMMAD M. M.

Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultatively anaerobic Gram-Positive cocci.

American Society for Microbiology. April 1998, 11(2): 318-340.

6. BENSLIMINA A.

Endocardites infectieuses : étiologies et approche épidémiologique de cas enregistrés en trois ans à Alger. Thèse sciences médicales.

Alger : Université Benyousséf Benyedda, 2006, N°16/6429.

7. BES M. ET BRUN Y.

Staphylococcus : actualités taxonomiques et identification.

Revue française des laboratoires. Mai 2002, 23-30.

8. BOYD. R. F. ET MARR J.J.

Medical Microbiology.

USA : Little, Brown and Company, 1980, 272-273.

ISBN : 0-316-10432-9.

9. BREAND S.

Etude biométrique de la réponse d'une population bactérienne à une variation défavorable de température ou de pH : application en microbiologie prévisionnelle alimentaire.

Thèse 3^e cycle. Lyon : Université Claude Bernard, 1998, N°89.

10. BURKE K.A. AND LASCELLES J.

Nitrate reductase activity in heme-deficients mutants of *Staphylococcus aureus*.

Journal of Bacteriology. April 1976, 126(1) : 225-231.

11. CORNU M.

Dynamique des populations bactériennes en cultures mixtes.

Thèse 3^e cycle. Lyon : Université Claude Bernard, 2000, N° 213.

12. CROUCH S. F., TED A., PEARSON T. A. AND PARHAM D. M.

Comparison of modified Minitex System with Staph-Ident System for species identification of coagulase-negative staphylococci.

American Society for Microbiology. September 1987, 1626-1628.

13.DIOUF M.F.

Evaluation de différentes méthodes de conservation des souches bactériennes exigeantes.

Thèse Pharmacie. Dakar : U.C.A.D., 2004, N° 13.

14.EDUMETRIE : QUALITE DE LA MESURE EN EDUCATION.

Disponible sur :

<http://www.irdp.ch/edumetrie/lexique/droite_regression.htm>. Consulté le 28/06/08.

15.EYQUEM A ., ALOUF J. ET MONTAGNIER L.

Traité de microbiologie clinique.

3^e mise à jour et complément. 2003, 60 (3) : 5.

16.FERRON A.

Bactériologie médicale.

12^e édition. France : C. et R., 1984, 20-26.

ISBN : 2-85510-020-8

17.FLEURETTE J.

Staphylocoques et microcoques.

In : Bactériologie médicale 1^{ère} édition. Paris : Flammarion, 1982.

18.FOURNIER J. M.

Staphylococcus aureus : vaccines and immunotherapy.

Pergamon Press, 1991, 166-177.

19.HEALTH PROTECTION AGENCY

Standard operating procedure identification of Streptococcus species, Enterococcus species and morphologically similar organisms.

In : Standards Units, Evaluations and Standards Laboratory, 2003, 3-12.

BSOP ID 4i1

20. HOPITAL RIVIERA

Streptocoques. *Disponible sur :*

<www.hopital-riviera.ch/soins-intensifs/Definitions/Streptocoques>. Consulté le 20/06/08.

21. KLOOS W. E. AND LAMBE JR. D. W.

Staphylococcus.

In : Manual of clinical microbiology. 4th edition.

Washington : American Society for Microbiology, 1981, 222-235.

22. KONATE B.

Microméthodes d'identification et étude de la sensibilité des staphylocoques, entérocoques et streptocoques : intérêt et application dans le diagnostic rapide des infections microbiennes.

Thèse pharmacie. Dakar : U.C.A.D., 2001, N°100.

23. LIGOZZI M., BERNINI C., BONORA M. G., FATIMA M., ZULIANI J. AND FONTANA R.

Evaluation of the VITEK 2 System for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant Gram-Positive cocci.

Journal of Clinical Microbiology. May 2002, 40(5) : 1681-1686.

24. MARCHAL N., BOUDON J.L. ET RICHARD C.L.

Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries.

Paris : Doins Editeurs, 1987.

ISBN : 27-0440-0417-X

25. MARTINEAU F.

Développement de tests de diagnostics basés sur l'ADN pour l'identification de *Staphylococcus aureus* et de *Staphylococcus epidermidis* associés aux infections humaines.

DEA spécialité Microbiologie et immunologie. Québec : Université de Laval, 1997, 2-4.

ISBN : 0-612-25672-3

26. MINOR L. ET VERRON M.

Bactériologie médicale.

1^{ère} édition. Paris : Flammarion, 1984, 509- 549.

ISBN : 2-257-10418-8

27. MOUSTADIER G.

Bactériologie médicale.

Paris : Maloine, 1972, 551-557.

28. MURAY R. P., BARRON H. J., MICHEAL A. P. AND ROBERT Y.

Manual of clinical microbiology.

8th edition. Washington : ASM Press, 2003.

29. N'DAO S. K.

Mise au point d'une microméthode d'identification biochimique des staphylocoques.

Thèse pharmacie. Dakar : U.C.A.D., 1996, N° 44.

30. NAUCIEL C.

Bactériologie médicale.

Paris : Masson, 2000, 11-15.

ISBN : 2-294-00428-0

31. NNOCHIRI E.

Microbiology in the tropics.

American Journal of tropical Medecine and Hygiene. 1975, 24(6) : 10-15.

32. NOVICK R. P.

Staphylococci.

In: Micobiology, 4th edition. New York: J. B. Lippincott Company, 1990, 539-560.

33. PELMONT J.

Bactéries et environnement : adaptations physiologiques.

Grenoble : Presses Universitaires de Grenoble, 1993.

ISBN : 978-2-86883-442-3.

34. PILET C., BOURDON J. L., TOMA B., MARCHAL N. ET BALBASTRE C.

Bactériologie médicale et vétérinaire.

In: Systématique bactérienne. 2^e édition. Paris : Doins, 1979, 52-53.

ISBN : 2-7040-0362-9

35. PINA G. ET RAYNAUD D.

Critères de choix d'une méthode d'identification.

DES Bactériologie-Virologie. Lyon : Université Claude Bernard, 2003.

36. PRESCOTT L., HARLEY J. P. ET KLEIN D. A.

Microbiologie.

1^{ère} édition. Bruxelles : De Boeck Université, 1995, 109-457.

ISBN : 2-8041-1591-7

37. SARR T.

Algorithmes d'identification des staphylocoques à coagulase négative et des streptocoques non groupables.

Thèse pharmacie. Dakar : U.C.A.D., 2004, N°84.

38. SCHAECHTER M., EISENSTEIN B. I. ET MEDOFF G.

Microbiologie et pathologie infectieuse.

2^e édition. Bruxelles : De Boeck Université, 1995.

39. SCHMIDT J. L. ET LENOIR J.

Contribution à l'étude des entérocoques et de leurs aptitudes technologiques : aptitude à la dégradation des acides aminés.

I.N.R.A. Paris-Grignon : 1974, 377.

40. SNEATH P. H. A., MAIR N. S., SHARPE M. E. AND HOLT J.G.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

Baltimore : Lipincott Willian & Wilking, 1986, 2 : 1013-1071.

ISBN: 0-683-07893-3.

41. SOW M. F.

Utilisation des méthodes biométriques pour la validation de l'identification des cocci à Gram positif.

Thèse pharmacie. Dakar : U.C.A.D., 2007, N° 48.

42. STANDEART A. R., FRANCOIS K., DEVLIEGHIERE F., DEBEVERE J. AND VAN IMPE J.F.

Modelling individual cell time distributions for *Listeria monocytogenes*.

Risk Anal. 2007, 27(1) : 241-254.

43. TRAORE H.

Droites de régression et validation du dosage microbiologique de médicaments antibiotiques et antifongiques.

Thèse pharmacie. Dakar : U.C.A.D., 2004, N°58.

44. TRUANT A. L.

Manual of commercial methods in microbiology.

American Society for Microbiology. Washington : 2002, 22-27.

45. UNIVERSITE DE RENNES.

Corrélation et régression linéaire. *Disponible sur :*

<<http://www.med.univ->

[rennes1.fr/wkf/stock/RENNES20061124103958cuggiacorrelationregressionPCEM1.pdf](http://www.med.univ-rennes1.fr/wkf/stock/RENNES20061124103958cuggiacorrelationregressionPCEM1.pdf)>.

Consulté le 28/06/08.