

## INTRODUCTION

Les cocci à Gram positif occupent une place importante en pathologie humaine. Sous cette dénomination sont regroupées des espèces bactériennes constituées par des cellules de forme arrondie (coques ou cocci) immobiles, à Gram positif, aérobies anaérobies facultatives, dont l'importance médicale est grande (12).

On distingue :

- les staphylocoques (genre *Staphylococcus*)
- les streptocoques (genre *Streptococcus*) dont le pneumocoque (12).

Les staphylocoques sont fréquemment isolés particulièrement au cours des suppurations. La pathogénicité des staphylocoques pose peu de problèmes en ce qui concerne *Staphylococcus aureus*, mais elle est plus discutée pour les staphylocoques coagulase-négative.

La plupart des streptocoques sont des commensaux habituels des cavités naturelles ou des téguments. Mais certaines espèces peuvent devenir pathogènes dans certaines circonstances et être responsables d'infections streptococciques sévères.

Depuis quelques années avec l'avènement des galeries d'identification existant sur le marché et plus particulièrement des Api, l'identification des bactéries au laboratoire est devenue plus facile, plus rapide et plus fiable. Cependant ces galeries se sont avérées très coûteuses pour les populations à revenus moyennes.

C'est dans ce contexte, que des études initiées au sein de l'Unité de Recherche et de Biotechnologie microbienne du laboratoire de Bactériologie-virologie de l'Hôpital Aristide le Dantec, ont abouti à la mise au point de mini galeries d'identification de nombreuses bactéries : les Micro-CSB.

L'efficacité et la fiabilité de ces microméthodes dans l'identification bactérienne ont été démontrées et validées par des études antérieures (30, 34). Néanmoins cette méthode souffre d'un manque de standardisation de l'inoculum.

Dans un souci d'affiner et d'améliorer l'identification bactérienne par ces microméthodes, l'objectif de notre travail était de :

- déterminer grâce à l'étude de la croissance, l'inoculum adéquat pour une bonne identification des cocci à Gram positif avec les Micro-CSB Staph et Micro-CSB Strepto ;
- d'appliquer une méthode de prédiction du temps de seuil de la densité microbienne permettant une bonne identification de ces germes.

## I. RAPPELS SUR LES STAPHYLOCOQUES

### 1.1. DEFINITION

Les staphylocoques sont des cocci à Gram-positif.

### 1.2. HISTORIQUE

Les staphylocoques ont été découverts dans un pus par Pasteur en 1880. En 1883, Ogston a créé le nom de « Staphylocoque » pour décrire ces grains (kokoss) groupés en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisin (staphylos). En 1884, Rosenback a obtenu des cultures pures de ces bactéries. Il a scindé le genre *Staphylococcus* en deux groupes selon que les colonies étaient blanches ou dorées.

### 1.3. TAXONOMIE ET CLASSIFICATION

Les staphylocoques appartiennent à la famille des Micrococcaceae qui comprend quatre genres qui diffèrent par la composition en base de leur ADN G+ C (mol%) :

- *Micrococcus*
- *Staphylococcus*
- *Stomatococcus*
- *Planococcus*

Les espèces appartenant à ces genres possèdent une catalase et se développent en aérobie. Les cocci à Gram positif en amas qui se développent uniquement en anaérobiose sont dénommés Peptococcus (2).

- **Le genre Micrococcus**

Comprend les microcoques qui sont également des hôtes normaux de la peau et des muqueuses de l'homme et par conséquent souvent présents dans les prélèvements. Ce sont presque toujours des contaminants qu'il importe de distinguer des Staphylocoques.

- **Le genre Staphylococcus**

Plus de 30 espèces de staphylocoques ont été identifiées dont la plupart sont trouvés seulement chez les mammifères inférieurs (36).

Leur classification a subi depuis 30 ans d'incessants changements aboutissant à une meilleure précision grâce à la prise en compte non seulement des classiques caractères morphologiques, physiologiques et métaboliques mais aussi de certains caractères génétiques, antigéniques et écologiques. Il existe malheureusement non pas une seule mais plusieurs classifications, qu'il est cependant utile de connaître en pratique (14).

**- Classification de Baird-Parker (14)**

Elle ne reconnaît que trois espèces bien déterminées : *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus*. Mais beaucoup de souches de Staphylocoques demeurent inclassables. Les espèces *S. epidermidis* et *S. saprophyticus* comportent chacune 4 biotypes.

**- Classification de Kloss et Schleifer (14)**

Ces auteurs distinguent dix espèces dans le genre *Staphylococcus*. Certaines d'entre elles sont bien individualisées ; d'autres sont regroupées sur la base de caractères communs. Malgré cette division du genre, la pratique montre qu'il reste 15 p.100 de souches inclassables.

**- Subdivision des souches de *Staphylococcus aureus* en fonction de l'origine animale.**

Espèce ubiquitaire, *S. aureus* s'est cependant adapté à diverses niches écologiques et des biotypes ont été décrits chez les différentes espèces animales. Récemment Hajek et Marsalek ont proposé une subdivision en 4 biotypes A, B, C et D. Les biotypes E et F initialement décrits ont été regroupés dans une espèce : *S. intermedius*. Deux autres espèces ont été récemment identifiées : *S. hyicus* et *S. sciuri*.

Mais récemment la famille des Micrococacceae a été démantelée et l'espèce *S. aureus* n'est plus regroupée avec d'autres genres bactériens. En 1998, 41 taxons incluant 35 espèces et 7 sous espèces ont été décrits.(14)

*S. aureus* exprime des caractères qui le différencient des autres staphylocoques : il possède notamment une coagulase et est souvent pathogène. On l'oppose classiquement aux autres staphylocoques non producteurs de coagulase et plus rarement responsables d'infections.

- **Le genre *Stomatococcus***

Comprend *Stomatococcus mucilaginosus* qui fait partie de la flore buccale.

- **Le genre Planococcus**

Comprend des bactéries du milieu marin.

#### **1.4. HABITAT (12,2)**

Il s'agit de germes très répandus dans la nature (air, eau, sol).

Les Staphylocoques en particulier les espèces *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, font partie de la flore normale de nombreux individus qui sont des « porteurs asymptomatiques ». Cependant ces souches peuvent être à l'origine d'auto-infections ou contaminer d'autres individus. Les staphylocoques peuvent être trouvés particulièrement dans les fosses nasales antérieures.

Les Staphylocoques sont fragiles et vivent à l'état commensal au niveau des téguments ou des muqueuses de l'homme ou des animaux. Certains groupes sont rencontrés dans le sol, dans l'air et dans l'eau. Leur présence normale au niveau cutanéomuqueux explique qu'ils peuvent contaminer fréquemment des prélèvements et constituer des souillures.

#### **1.5. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES**

##### **1.5.1. Caractères morphologiques**

Dans le pus *S. aureus* se présente sous l'aspect de cocci en petit amas, en diplocoques ou en très courtes chaînettes (3 à 5 éléments), mesurant de 0,8 à 1µm, gardant le Gram .Sur les cultures en milieu solide il se dispose en « grappe de raisin », alors qu'en milieu liquide il est isolé, en diplocoques. Il est immobile, non sporulé et ne possède pas de capsule visible au microscope optique sauf de très rares souches (souche Smith). (14)

##### **1.5.2. Caractères cultureux (12,14,2)**

*Staphylococcus aureus* est un germe aérobie-anaérobie facultatif. Il croît abondamment sur milieu gélosé (colonies de 1 à 2mm de diamètre) ; certaines souches produisent un pigment jaune-orange, mais cette production est irrégulière (2), car certaines donnent des colonies blanches ; le caractère pigmentaire n'est donc pas propre à l'espèce.

La culture est obtenue en 18 à 24 heures à 37°C (culture possible entre 10 et 45°C) sur milieux ordinaires. *S. aureus* pousse en présence de fortes concentrations salines (milieu sélectif de Chapman à 7,5% de NaCl). Le pH optimal est de 7,0 à 7,5.

Certains facteurs de croissance sont indispensables (vitamines B<sub>1</sub>, acide nicotinique). (2)

En bouillon ordinaire, la culture est rapide ; en quelques heures, un trouble homogène puis un dépôt sont observés. Il n'y a pas de production de pigment en milieu liquide.

Sur gélose ordinaire, les colonies sont lisses, rondes, bombées et leur diamètre est de 1mm.

À +4°C, le Staphylocoque conserve sa vitalité pendant 3 mois dans le pus, pendant 1 an sur gélose, il est détruit à 58°C au bout de 60 minutes. Sa croissance est inhibée par les androgènes et la progestérone. (14)

*Staphylococcus aureus* possède un équipement enzymatique permettant de métaboliser de nombreux substrats (glucides, lipides, protides). (12)

Il existe des colonies naines de *S. aureus* provenant de milieux contenant certains sels minéraux (chlorure de lithium ou de baryum), certains colorants (violet de gentiane, acrydine orange), certains antibiotiques (methicilline, aminoside) ou provenant de prélèvements de patients mis sous antibiotiques. Ces souches retrouvent généralement leurs caractères culturels normaux après une ou deux subcultures. (14)

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

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

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

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

**Tableau II : classification simplifiée des staphylocoques cutanés d'origine humaine (d'après Kloos et Schleifer 1975)**

| <i>Staphylo-</i><br><i>coccus</i> | Diamètres des colonies (5j>5mm) | Croissance anaérobie en thioglycate | lystaphine (R à 50 µg/ml) | Hémolyse (érythrocytes de boeuf) | Réduction du nitrate | Phosphatase | Novobiocine (R à 1,6µg/ml) | Coagulase | Fructose | Galactose | Mannose | Xylose/Arabinose | Ribose | Maltose | Lactose | Saccharose | Tréhalose | Turanose | Mélézitose | Mannitol | Xylitol |
|-----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------------------|-------------|----------------------------|-----------|----------|-----------|---------|------------------|--------|---------|---------|------------|-----------|----------|------------|----------|---------|
| <i>aureus</i>                     | +                               | +                                   | -                         | (+)                              | +                    | +           | -                          | +         | +        | +         | (+)     | -                | +      | +       | (+)     | +          | +         | (+)      | -          | +        | -       |
| <i>saprophyticus</i>              | +                               | +/-                                 | +                         | -                                | -                    | (-)         | +                          | -         | +        | -         | -       | -                | -      | +       | (+)     | +          | +         | +        | -          | +        | +/-     |
| <i>epidermidis</i>                | -                               | +                                   | +                         | -/+                              | +<br>+/-             | +           | -                          | -         | +        | (+)       | (+)     | -                | -      | +       | (+)     | +          | -         | V        | (-)        | -        | -       |
| <i>haemolyticus</i>               | (+)                             | ±C                                  | +                         | (+)                              | +                    | (-)         | -                          | -         | +/-      | V         | -       | -                | (-)    | +       | -+      | +          | +         | V        | -          | +/-      | -       |

**Légende** : + positif ; ± faible ; - : négatif ; V : variable ; ces signes indiquent une fréquence de 90 à 100p.100 ; entre ( ) ils indiquent une fréquence de 70 à 89 p.100 ; ±C : gradient avec de grosses colonies.

Dans l'ensemble, *S. epidermidis* a un métabolisme beaucoup plus faible que

*S. aureus*.

### 1.5.3. Caractères biochimiques

L'étude des différents caractères biochimiques et métaboliques des souches de staphylocoques a permis le développement de galeries d'identification rapides et efficaces, permettant de définir les différents profils biochimiques de souches appartenant à une même espèce. (22)

#### ***1.5.3.1. Caractères généraux***

Les staphylocoques possèdent une catalase à l'exception de *S. aureus* sous espèce *anaerobius* que l'on retrouve exclusivement chez les moutons et qui est une souche anaérobie stricte (22, 24). Ils sont dépourvus d'oxydase en dehors de *S. lentus*, *S. sciuri* et *S. caseolyticus*. (22, 13)

#### ***1.5.3.2. 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 directement, s'ils sont fournis sous une forme simple (glucose, fructose...). (27)

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

#### ***1.5.3.3. Production d'uréase (23)***

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 le virage de l'indicateur coloré.

L'uréase est également une enzyme inductible. La recherche de l'uréase repose sur la libération d'ions ammonium qui alcalinisent le milieu, entraînant le virage du rouge de phénol, du jaune au rouge cerise.

Les souches de *S. epidermidis*, *S. intermedius* et la plupart des souches de *S. saprophyticus* sont uréase positive.

#### **1.5.3.4. Production d'acétoïne (23)**

Les micro-organismes produisent lors de leur métabolisme de nombreux produits de dégradation qui, comme dans le cas ci-présent peuvent être recherchés.

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 purvate.

Il existe entre autres, la méthode conventionnelle de Voges-Proskauer miniaturisée ou non, incorporée aux méthodes biochimiques d'identification des staphylocoques disponibles dans le commerce.

#### **1.5.3.5. Production de décarboxylases (23)**

Les décarboxylases sont des enzymes qui sont actives à pH acide, le milieu d'étude sera donc acidifié par la fermentation du glucose puis réalcalinisé par l'action des décarboxylases sur le substrat qui est un acide aminé.

La production de l'ornithine décarboxylase (ODC) concerne essentiellement l'espèce *S. lugdunensis* et secondairement certaines souches de *S. epidermidis* dont l'enzyme a une activité retardée.

Les décarboxylases clivent les acides aminés avec formation de l'amine correspondante et libération de dioxyde de carbone. Ces enzymes sont dites induites et leur synthèse est favorisée par un pH acide allant de 3,5 à 5,5 et des conditions d'anaérobiose obtenues en recouvrant le puits d'huile de paraffine. Leur caractérisation se fera par la mise en évidence de la modification du pH du milieu lié à la production d'amine qui l'alcalinise.

Les enzymes recherchées le plus souvent sont :

- l'ornithine décarboxylase (ODC)
- l'arginine dihydrolase (ADH)
- la lysine décarboxylase (LDC)

### ***1.5.3.6. Production de la bêta-galactosidase (23)***

La bêta-galactosidase est une enzyme bactérienne inductible, existant à un niveau de base dans le milieu intracellulaire. Elle est capable de cliver 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  $\beta$ -galactosidase perméase.

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

En effet, il existe des germes qui reconnaissent l'ONPG du côté du nitro-2-phénol et non de celui du bêta-galactoside. Ces germes ont donc une activité ONPG hydrolase tout en ne fermentant pas 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-bêta-D-galactopyranoside, ou le 2-naphtol-bêta-D-galactopyranoside. Ceux-ci sont utilisés comme substrats et libèrent respectivement l'orthonitrophénol jaune et le bêta-naphtol qui se combine au sel de Fast blue  $\beta$  en solution dans le 2-méthoxyéthanol pour donner une coloration rouge pourpre.

Ce test est positif pour *S. intermedius*, la plupart des souches de *S.saprophyticus* et *S. xylosus*.

## II. LES STREPTOCOQUES

### 2.1. DEFINITION

Les streptocoques sont des cocci à Gram positif ; les cellules peuvent être ovoïdes, sphériques ou rarement allongées en bâtonnets, et se divisent en un seul plan pour former des paires ou plus souvent des chaînettes. Ils sont dépourvus de cytochromes et de catalase. Le contenu en ( G + C ) p. 100 du DNA est compris entre 33 et 42. (2)

### 2.2. HISTORIQUE

Le nom de *Streptococcus* (streptus, flexible, coccus, grain) fut pour la première fois attribué par Bibroth et Ehrlich (1877) à des cocci formant des chaînettes observées dans des blessures infectées. Fehleisen (1883) décrit un coccus similaire comme agent le l'érysipèle. Rosenbach (1884) donne le nom de *Streptococcus pyogenes* ou Streptocoque du groupe A à des cocci groupés en chaînettes et isolés de lésions suppuratives de l'homme. (18)

### 2.3. CLASSIFICATION

Il n'existe pas de critère unique qui permette de classer en pratique les différentes espèces du genre *Streptococcus*.

La classification fait appel à l'étude de plusieurs types de caractères bactériologiques. (2)

- Selon leur pouvoir hémolytique, on distingue :
  - des souches  $\alpha$  hémolytiques : hémolyse incomplète
  - des souches  $\beta$  hémolytiques : hémolyse complète
  - des souches non hémolytiques ( $\gamma$ ) : pas d'hémolyse.

Ce critère ancien n'a plus aujourd'hui qu'une valeur d'orientation.

- Selon l'équipement antigénique : classification de Lancefield (1933).

Elle s'appuie sur des critères immunologiques qui permettent de détecter des antigènes spécifiques de groupe.

La plupart des espèces de streptocoques, notamment bêta hémolytiques, possèdent dans leur paroi un polysaccharide C dont la composition et les propriétés antigéniques permettent de définir des groupes sérologiques.

La classification de Lancefield distingue 20 groupes sérologiques (désignés par des lettres de A à M et de K à W). (2)

Certaines espèces dépourvues de polyoside C sont souvent des souches non hémolytiques ou donnant une hémolyse dite  $\alpha$  viridans. Elles sont dites « non groupables ». (2)

La technique de Lancefield comprend une extraction du polyoside C à partir d'une suspension de la souche par l'acide chlorhydrique à chaud ou par l'acide nitrique ou la formamide.

- Selon les caractères biochimiques qui permettent d'individualiser des espèces dans le genre *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus bovis*, etc...

Les critères de la taxonomie moléculaire ont permis de définir des groupes génomiques et d'individualiser de nouvelles espèces. Le séquençage d'un fragment de l'ARN 16 S conduit à reconnaître 6 groupes :

- les « pyogènes » (groupes A, B et C),
- les streptocoques oraux ou « viridans » en 3 groupes,
- les streptocoques du groupe D,
- les streptocoques non classés. (2)

Une classification encore largement acceptée, basée sur des tests sérologiques et biochimiques reconnaît quatre divisions principales :

- Streptocoques pyogènes (habituellement  $\beta$  hémolytiques possédant un antigène polyosidique de groupe),
- Entérocoques (résistant à 6,5 p.100 de NaCl),
- Streptocoques lactiques (isolés principalement des produits laitiers),
- Streptocoques « viridans » (dépourvus d'antigène de groupe). (18)

## 2.4. HABITAT

Découverts par Pasteur, les streptocoques sont des bactéries ubiquistes :

- Saprophytes, ils sont retrouvés aussi bien dans l'eau que dans l'air ou le sol ;
- Commensaux, au niveau des téguments ou des muqueuses de l'homme ou des animaux. (33)

Les streptocoques viridans plus résistants sont des commensaux constants des voies digestives et de la flore buccale.

La présence normale de streptocoques au niveau cutané-muqueux explique qu'ils peuvent contaminer fréquemment des prélèvements et constituer des souillures.

Récemment des épidémies d'infections à *Streptococcus pyogenes* d'origine alimentaire ont été décrites. (2)

Le streptocoque du groupe A est une bactérie strictement humaine. Il se localise préférentiellement au niveau des amygdales et du pharynx. Le portage asymptomatique cutané, vaginal ou anal est beaucoup plus rare. C'est une bactérie fragile qui ne survit pas longtemps dans le milieu extérieur. (12)

## 2.5. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

### (*STREPTOCOCCUS PYOGENES*)

#### 2.5.1. Caractères morphologiques

Les streptocoques se présentent sous forme de cocci à Gram positif disposés en chaînettes, immobiles, non encapsulés et non sporulés. (11)

Habituellement ils sont sous la forme coccale individuelle ou en diplocoques dans des lésions actives, étendues et profondes. Dans les milieux artificiels, la formation des chaînettes est la règle. (18)

*Streptococcus pyogenes* donne une culture en dépôt en milieux liquides et est caractérisé par la formation de longues chaînettes. Certaines souches forment des capsules dans la phase exponentielle de croissance. (18)

En culture sur milieux gélosés, les chaînettes sont généralement plus courtes qu'en milieu liquide. (11)

#### 2.5.2. Caractères cultureux

Le streptocoque A présente des exigences nutritives complexes. Il se comporte en culture comme un aérobie-anaérobie facultatif ; il tolère l'oxygène. Mais l'eau oxygénée, produite lors du métabolisme respiratoire, lui est nuisible car il est dépourvu de catalase.

Son isolement se pratique sur gélose au sang de cheval. L'adjonction de sang dans le milieu est utile à cause de l'action catalasique de l'hémoglobine. Les colonies sur gélose au sang, sont petites et entourées d'une grande zone d'hémolyse totale de type bêta. (12)

En milieu liquide la culture prend dans le bouillon l'aspect de « mie de pain ».

La température optimale de croissance se situe entre 35° et 37°C. Le pH qui doit être voisin de 7,2, impose d'utiliser des milieux tamponnés.

### 2.5.3. Caractères biochimiques

Comme tous les streptocoques, *Streptococcus pyogenes* ne possède ni catalase ni peroxydase.

L'absence de catalase permet d'établir un diagnostic différentiel entre *Streptococcus* et *Staphylococcus* d'une part, et entre *Streptococcus* et *Micrococcus* d'autre part. Elle constitue alors un caractère clef d'orientation vers les streptocoques.

La mise en évidence d'activités enzymatiques, de la fermentation de sucres et de la croissance en milieu hostile, à l'aide de microméthodes, permet l'identification des différentes espèces de Streptocoques. Les caractères biochimiques de *Streptococcus pyogenes* sont présentés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau III : Caractères biochimiques de *Streptococcus pyogenes*. (19)**

| Test     | VP | ESC | ADH | BHS | ARA | MAN | SOR | TRE | RAF | SOS | INU | LAC | RIB | AMI | GLY |
|----------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Résultat | -  | -   | +   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   |

**Légende:**

(-) = Caractère négatif (0 – 25 % des souches)

(+) = Caractère positif (71 – 90 % des souches)

(d) = Caractère variable (26 – 70 % des souches).

### 2.5.4. Identification formelle

L'identification formelle de *S. pyogenes* repose sur :

- la sensibilité à la bacitracine,
- le groupage antigénique.

#### **2.5.4.1. Sensibilité à la bacitracine (2)**

Ce test a été très critiqué car c'est une épreuve mal standardisée : la charge des disques n'est pas toujours précisée par les fabricants : la densité de l'inoculum varie ; le diamètre de la zone d'inhibition considéré comme significatif n'est pas toujours le même. Si l'on retient toute zone d'inhibition quelqu'en soit le diamètre, la presque totalité des Streptocoques du groupe A est sensible à la bacitracine.

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

Les Streptocoques viridans peuvent également être inhibés par la bacitracine.

#### **2.5.4.2. Le groupage antigénique**

Il se fait à l'aide d'un antisérum monovalent dirigé contre l'antigène spécifique du groupe A. Plusieurs techniques existent :

- la technique de LANCEFIELD, (cf. 2.3. classification)
- la précipitation en milieu gélosé par contre-immunoélectrophorèse,
- l'immunofluorescence directe,
- la coagglutination de staphylocoques ou de particules de latex sensibilisées par des anticorps spécifiques (actuellement la plus utilisée).

### III. PHYSIOLOGIE ET CROISSANCE BACTERIENNES

#### 3.1. PHYSIOLOGIE ET METABOLISME BACTERIENS

Selon Claude Bernard, la physiologie a pour projet d'étudier les phénomènes des êtres vivants et de déterminer les conditions matérielles de leur manifestation. Les caractères physiologiques des bactéries sont donc liés aux conditions (38) dans lesquelles nous pouvons les observer.

Pour se maintenir, croître et se reproduire, les bactéries doivent trouver dans le milieu extérieur des conditions physicochimiques favorables ainsi que les aliments qui leur sont nécessaires. (12)

Le métabolisme bactérien est l'ensemble des réactions cataboliques, consistant à dégrader les éléments nutritifs du milieu, à transférer et à stocker l'énergie résultant de ces dégradations, afin de réaliser les réactions anaboliques permettant aux bactéries de réaliser la synthèse de leurs propres constituants. (26)

##### 3.1.1. Nutrition (12,26,31)

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

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

Les aliments servent non seulement de matériaux de construction et de sources d'énergie nécessaires à la synthèse des constituants des bactéries en phase de croissance, mais aussi de source d'énergie nécessaire au maintien de la vie bactérienne en dehors de toute croissance.

Les aliments des bactéries peuvent être assimilés directement s'ils sont sous une forme simple (glucose, acides aminés...) ; par contre lorsqu'ils sont fournis sous forme complexe, ils doivent d'abord être dégradés par des exoenzymes avant d'être assimilés (polymères, polyoses, protéines...).

Un petit nombre de molécules traversent la membrane cytoplasmique par diffusion libre : ce sont des gaz ( $O_2$ ,  $CO_2$ ), des acides gras, certains nutriments liposolubles. La majorité des substances pénètrent grâce à des perméases, systèmes membranaires augmentant la vitesse de passage à travers la membrane.

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

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

L'azote est assimilé par les bactéries sous forme ammoniacale. Les bactéries autotrophes, ainsi que nombre de bactéries hétérotrophes pour l'énergie et le carbone se contentent d'une source inorganique d'azote.

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

### 3.1.2. Respiration (12,26,31)

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

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

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

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

### 3.1.3. Métabolisme bactérien (12,26,31)

#### *a) Métabolisme général*

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

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

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

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

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

La bactérie utilise son matériel nutritif pour deux buts importants :

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

### ***b) Métabolisme énergétique***

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

#### 1. La respiration : on distingue :

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

#### 2. La fermentation:

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

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

### *c) Métabolisme des hydrates de carbone*

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

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

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

### *c) Métabolisme des protéines*

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

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

## **3.2. LA CROISSANCE BACTERIENNE**

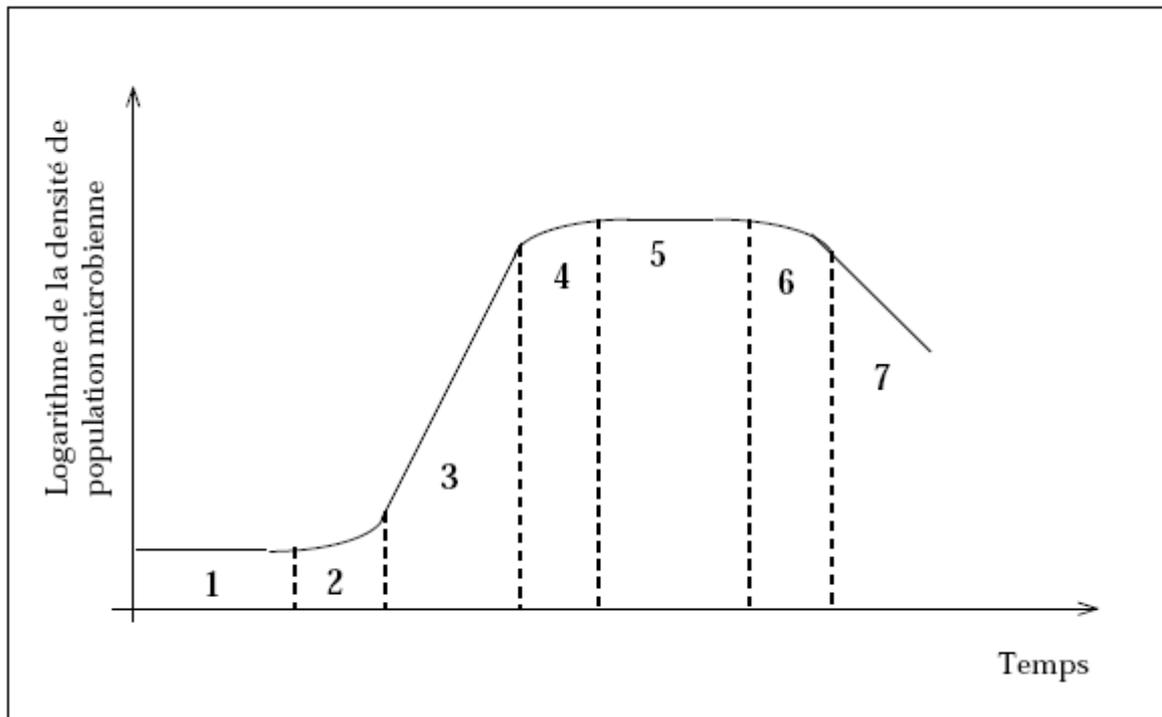
### 3.2.1. Définition

La croissance est l'augmentation ordonnée de la somme de tous les composants d'un organisme. Ainsi, l'augmentation de la taille lorsqu'une cellule absorbe l'eau ou libère un lipide ou un polysaccharide n'est pas la croissance réelle. La multiplication des cellules est une conséquence de la croissance ; dans les organismes unicellulaires, la croissance conduit à une augmentation du nombre d'individus composant une population ou une culture. **(20)**.

La division bactérienne est le corollaire habituel mais non obligé de la croissance. **(38)**

### 3.2.2. La courbe de croissance et les phases de la croissance

Si un milieu liquide non renouvelé estensemencé avec des cellules bactériennes prélevées d'une culture déjà saturée et le nombre de cellules viables par millilitre déterminé régulièrement, une courbe du type de celle de la figure ci-dessous, est habituellement obtenue **(20)**. La courbe peut être segmentée en 7 phases représentées par les chiffres 1 – 7.



**Figure 3.1.** Les 7 phases de la cinétique de croissance d'une population bactérienne. D'après Buchanan (1919).(4)

- La phase de latence [1]

Elle représente la période où les cellules ayant épuisées les métabolites et les enzymes de leur environnement initial, s'adaptent à leur nouvel environnement. Les enzymes et les intermédiaires sont formés et s'accumulent jusqu'à ce qu'ils soient présents à des concentrations permettant une reprise de la croissance.

Elle peut être supprimée en incubant le milieu avec des bactéries prélevées pendant la phase exponentielle de croissance.

- La phase d'accélération [2] au cours de laquelle, le taux de croissance s'accroît régulièrement. (38)

- La phase exponentielle [3]

Les cellules sont en équilibre. Le nouveau matériel de la cellule est synthétisé à un taux constant, mais ce matériel est également catalysé, et la masse augmente de façon exponentielle. Ceci continue jusqu'à ce que l'un des deux phénomènes suivants se produisent : un ou plusieurs des nutriments s'épuisent dans le milieu, ou, que des produits métaboliques toxiques s'accumulent et inhibent la croissance. Le taux de croissance devient constant et atteint sa valeur maximale. (20,38).

- La phase de ralentissement [4], liée à l'épuisement du facteur limitant. La valeur de  $\mu$  diminue progressivement. **(12,38)**

$\mu$  : taux de croissance

- La phase stationnaire [5], liée à l'épuisement de l'aliment, à l'accumulation de produits toxiques ou à la constitution d'un équilibre ionique défavorable. **(12)**

- La phase de décroissance [6] au cours de laquelle la masse bactérienne décroît et le taux de croissance prend des valeurs négatives. Cette phase de décroissance correspond à une mort et à une lyse progressive des bactéries en présence des déchets du métabolisme accumulés pendant la croissance. **(38)**

- La phase de mortalité logarithmique [7], durant cette phase le taux de mortalité par organisme reste constant.

***NB.*** Les bactéries peuvent être maintenues dans la phase exponentielle en les transférant à plusieurs reprises dans le milieu frais de composition identique. Deux dispositifs automatiques ont été inventés pour suivre ce processus automatiquement : le chemostat et le turbidostat. **(20)**

### 3.2.3. Facteurs influençant la croissance

De nombreux facteurs physiologiques affectent la croissance de la cellule bactérienne et incluent la concentration en ions hydrogène de son environnement, la température, l'humidité et le potentiel d'oxydo-réduction. **(31)**

- a)** la température : suivant leur comportement à l'égard de la température, on distingue classiquement des micro-organismes mésophiles (l'échelle de température est comprise entre 20 et 45°C). Les bactéries pathogènes pour l'homme font partie des mésophiles et ont un optimum aux environs de 37°C ; toutefois certaines espèces comme *Listeria monocytogenes* peuvent se développer à + 4°C. Cependant certaines bactéries ne se comportent qu'occasionnellement comme des parasites des organismes supérieurs (infections à bactéries opportunistes), et leurs conditions confèrent une adaptation soit à des températures inférieures à 30°C (bactéries psychrophiles), soit à des températures de l'ordre de 40 à 45°C (bactéries thermophiles). **(28)**

La température, paramètre sélectif pour la croissance des bactéries, conditionne la prolifération exclusive de certaines espèces dans un biotype donné. **(28)**

Les températures élevées sont incompatibles avec la multiplication et même la survie des bactéries, la chaleur sèche au poupinel à 180° C pendant 30 minutes et la chaleur humide par l'autoclave à 120°C pendant 30 à 60 minutes servent pour la stérilisation. **(14)**

#### **b) Le pH**

Les bactéries sont généralement tolérantes à des variations de pH entre 6 et 9, grâce à la régulation exercée par leur membrane à l'encontre des ions H<sup>+</sup>. **(7)**

Les bactéries fermentant l'urée et productrices d'ammoniaque tolèrent des pH très alcalins. **(12)**

Dans les cultures en milieux non tamponnés, les alcalins libérés à partir notamment des réactions de décarboxylation des acides aminés ou les acides libérés par dégradation des carbohydrates peuvent modifier le pH dans des conditions telles que le milieu devient toxique pour les bactéries.

#### **c) La pression osmotique**

Les bactéries sont assez tolérantes vis-à-vis des variations des concentrations ioniques ; l'affinité de certaines espèces pathogènes pour la salinité est utilisée pour la réalisation de milieux sélectifs (staphylocoques, vibron cholérique). On décrit des bactéries halophiles exigeant plus de 2% de NaCl pour cultiver tel *Vibrio para haemolyticus*.

#### **d) Les pressions partielles d'oxygène** (cf. 3.1.2. Respiration)

#### **e) Les radiations (12)**

Les bactéries sont sensibles aux rayons UV, aux rayons RX, à la lumière.

## f) Les substances antibactériennes

Les antiseptiques, les antibiotiques s'opposent à la croissance des bactéries et sont utilisés pour les détruire. Toutefois, certaines substances sont des inhibiteurs sélectifs de certains micro-organismes et on les ajoute dans les milieux pour favoriser électivement la multiplication de bactéries insensibles.

### 3.2.4. Techniques de mesure de la croissance bactérienne

La croissance bactérienne peut être appréciée en estimant, en fonction du temps, les variations de la masse bactérienne ou, plus souvent, du nombre de cellules. **(38)**

Des concentrations microbiennes peuvent être mesurées en termes de concentration en cellules (le nombre de cellules viables par unité de volume de culture) ou de la concentration de biomasse (poids sec de cellules par unité de volume). Ces deux paramètres ne sont pas toujours équivalents, parce que le poids sec moyen de la cellule change à différentes étapes de l'évolution d'une culture. Ils ne sont pas non plus d'importance égale. **(20)**

Deux groupes de méthodes sont utilisés pour mesurer la croissance bactérienne :

- les méthodes de numération,
- les méthodes quantitatives.

- Méthode de numération **(12, 20, 21 ,38)**

Deux méthodes principales peuvent être utilisées :

- numération totale : elle consiste à dénombrer au microscope ou avec des compteurs spéciaux les individus viables ou non.

Les cellules mortes ne peuvent pas être distinguées de celles en vie. Seules les suspensions denses peuvent être comptées ( $>10^7$  cellules par ml), mais des échantillons peuvent être concentrés par centrifugation ou filtration pour augmenter la sensibilité ;

- numération des cellules viables : on compte les colonies bactériennes apparues sur ou dans un milieu de culture gélosé convenable, inoculé par une aliquote d'une suspension bactérienne homogène et suffisamment diluée.

Sur un milieu approprié, chaque unité viable croît et forme une colonie. Chaque colonie pouvant être comptée s'appelle une unité formant colonies (UFC), et le nombre d'UFC est lié au nombre de bactéries viables dans le milieu. Cette méthode est plus facile et de très grande sensibilité, mais elle nécessite beaucoup de dilutions et de boîtes.

- Méthodes quantitatives (12, 20, 21, 38)

Plusieurs méthodes sont envisageables, parmi lesquelles :

- la mesure directe de la masse bactérienne : en principe, la biomasse peut être mesurée directement en déterminant le poids sec d'une culture microbienne. Les bactéries sont lavées, séchées et pesées. C'est une méthode longue qui nécessite une grande quantité de cellules pour que les pesées soient assez précises. Mais c'est la méthode de référence (1mg de poids sec correspond à quelques milliards de corps bactériens).
- la mesure de l'activité enzymatique : mesure du pH, mesure de la consommation d'oxygène. Ces méthodes sont peu précises.
- le dosage de l'azote bactérien : cette méthode a les mêmes applications que la méthode gravimétrique.
- la mesure de la densité optique : ici on admet que l'absorption lumineuse est proportionnelle à la masse des microbes. Elle est rapide et précise, mais sa sensibilité est modérée, car il faut une teneur d'au moins  $10^7$  bactéries/ml pour obtenir une densité optique mesurable. Elle est fortement entachée d'erreurs en cas de suspensions bactériennes non homogènes.

**Tableau IV : Exemple de comptage de cellules viables**

| Dilution                          | Dénombrement sur boîte* |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Non dilué }<br>10 <sup>-1</sup> } | Trop trouble            |
| 10 <sup>-2</sup>                  | 510                     |
| 10 <sup>-3</sup>                  | 72                      |
| 10 <sup>-4</sup>                  | 6                       |
| 10 <sup>-5</sup>                  | 1                       |

\* Chaque dénombrement est effectué sur 3 boîtes (20).

### 3.2.5. Conditions de croissance des Staphylocoques et des Streptocoques

#### 3.2.5.1. *Les staphylocoques*

Les staphylocoques cultivent sur des milieux contenant 5% de chlorure de sodium et certaines espèces tolèrent jusqu'à 10 et même 15%. Les staphylocoques fermentent les sucres en produisant abondamment de l'acide lactique. Ils puisent l'énergie indispensable à leur métabolisme par respiration, ils possèdent en effet une chaîne de transport électronique adaptée et en particulier des cytochromes et d'autres chromoprotéines porphyriniques.

*Staphylococcus aureus* est auxotrophe vis-à-vis de la thiamine qui agit comme un facteur de croissance. C'est une molécule organique indispensable à la croissance et qui n'est pas synthétisée par l'organisme.

Les températures minimales et maximales de développement sont respectivement de 6 à 8°C et de 45°C. Il se multiplie facilement à des pH compris entre 4,0 et 9,8 même s'il affectionne plutôt les pH légèrement acides. Il se développe dans des milieux dont l'A<sub>w</sub> est de 0,86.

#### 3.2.5.2. *Les streptocoques*

La majorité des souches de Streptocoque est capable de croître en présence de 40% de bile mais incapable de cultiver à 45°C ou à pH 9,6. La température idéale de croissance est de 36°C ± 2, le pH est de 7.

Une culture est facilement obtenue sur gélose au sang et les colonies, de petite taille, sont parfois pigmentées en jaune ou en orange ; l'hémolyse est variable.

## IV. METHODES BIOMETRIQUES D'ETUDE DE LA CROISSANCE ET PREDICTION

Dans cette partie, nous nous proposons de définir les outils mathématiques permettant de décrire la cinétique de croissance d'une population de bactéries dans le but d'en prédire l'évolution dans des conditions bien définies.

### 4.1. LA « MICROBIOLOGIE PREDICTIVE »

Pendant longtemps, lorsqu'un microbiologiste voulait prédire l'évolution d'une population de micro-organismes contaminants dans un produit alimentaire donné, il devait réaliser expérimentalement des cinétiques de croissance dans les conditions environnementales correspondant aux caractéristiques physico-chimiques du produit considéré. Si l'un des facteurs (température, pH...) était modifié dans le produit alimentaire, il n'avait plus qu'à refaire ses expériences dans les nouvelles conditions. Cette démarche était longue et coûteuse.

Des microbiologistes ont montré que l'on pouvait se servir des expériences antérieures pour prédire le comportement de la flore microbienne des produits alimentaires en étudiant l'influence des principaux facteurs environnementaux sur la cinétique de croissance des micro-organismes (McMeekin & Olley, 1986), (Baird-Parker & Kilsby, 1987). Ainsi est née une nouvelle discipline actuellement en pleine expansion dans le secteur agro-alimentaire : la microbiologie prédictive. (8)

Cette expression cerne assez bien les potentialités que les microbiologistes décelaient dans l'utilisation d'une démarche biométrique. (4)

L'hypothèse à la base de la microbiologie prédictive est que l'évolution d'une population bactérienne dans des conditions environnementales données est reproductible (Rosso, 1995). Ainsi en considérant les conditions environnementales comme les contraintes définissant un domaine d'étude, il est possible à partir d'observations passées de prédire la réponse des micro-organismes (Rosso & McMeekin, 1994).

Au début des années 1980, l'utilisation des outils biométriques en microbiologie alimentaire a connu un nouvel essor. Il s'agissait de construire un modèle de description de l'évolution d'une population bactérienne pour ensuite réaliser des prédictions de ce développement dans de nouvelles conditions environnementales (McMeekin & al, 1993).

## 4.2. LA MODELISATION CLASSIQUE

### 4.2.1. Définition du modèle

La démarche biométrique est placée selon Tomassone & al. (1993), sur un « triplet » méthodologique, défini par :

- un objectif scientifique susceptible d'être atteint,
- un modèle choisi pour l'atteindre,
- un corpus de données expérimentales. (6)

Un modèle est une représentation simplifiée de la réalité, facilitant la prédiction ou l'estimation et est exprimée en langage mathématique (Brouwn & Rothery, 1993, Witzjes, 1996 ; Pavé, 1994). Toute la réalité ne pouvant être modélisée, un choix doit être fait sur la partie de la réalité à modéliser. L'espace du modèle est alors défini. Les informations qui pourront être extraites de la modélisation ne seront valables que pour l'espace choisi (Tomassone et al., 1993). (4)

### 4.2.2. Les différents types de modèle (4, 6)

Deux types de modèle sont classiquement distingués : les modèles empiriques et les modèles mécanistes (Brouwn & Rothery, 1993).

Les modèles empiriques sont construits pour décrire le mieux possible un nuage de points (Pavé, 1994, Brouwn & Rothery, 1993). L'utilisation de ces modèles est essentiellement pratique : il s'agit par exemple de prédire le temps au bout duquel la densité bactérienne aura dépassé un seuil donné. Ces modèles sont de type « boîte noire » (Witzjes, 1996 ; Pavé, 1994). Ils correspondent en général à une démarche phénoménologique, fondée uniquement sur l'observation des effets et non sur la compréhension des mécanismes.

En revanche, les modèles mécanistes sont construits à partir d'hypothèses expliquant les processus donnant lieu aux phénomènes observés.

Le choix entre ces deux types de modèles est guidé par l'objectif donné à la modélisation (Pavé, 1994). Les modèles mécanistes sont souvent plus compliqués et plus difficiles à manier que les modèles empiriques (Heitzer et al., 1991). (6)

En microbiologie alimentaire, étant donnés les objectifs assignés à la modélisation ainsi que la complexité des processus physiologiques expliquant les phénomènes observés, ce sont les modèles empiriques qui sont majoritaires (Bazin & Rosso, 1992).(4)

Il existe deux types de modèles prédictifs en microbiologie alimentaire :

- un modèle prédictif probabiliste,
- un modèle prédictif cinétique qui permet de prédire le taux de développement d'une population bactérienne (Rosso & McMeekin, 1994 ; Roberts, 1989).

Ces modèles empiriques développés ci-dessous sont regroupés sous le nom de modèles de dynamique. Ceux-ci décrivent l'évolution de la densité bactérienne en fonction du temps. En microbiologie prévisionnelle, l'expression « modèle primaire » est souvent utilisée.

Ces modèles peuvent être utilisés pour des données issues d'un dénombrement (et donc exprimées en termes de population) ou de mesures turbidimétriques (et donc exprimées en termes de densité de biomasse). (6)

Plusieurs auteurs ont proposé différents modèles qui sont plus ou moins similaires: Gompertz, Baranyi *et al.*, Laurent Rosso, Jean Lobry.

#### 4.2.2.1. Les modèles classiques

-Le modèle de croissance le plus simple est le modèle exponentiel (Mc Meekin et al, 1993). Il suppose que la vitesse de la variation de la densité de population microbienne  $x$  est proportionnelle à  $x$ , c'est-à-dire que le taux de croissance  $dx/dt$  est constant :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dx}{xdt} = \mu_{\max} \\ t \geq 0 ; x \geq x_0 > 0 \end{array} \right. \quad (\text{IV.1})$$

$x$  : représente la densité de population microbienne au temps  $t$  et,

$\mu_{\max}$  : le taux de croissance spécifique maximal.

Ce modèle décrit uniquement la phase 3 de la croissance.

- Des modèles de croissance décrivant aussi les phases 4 et 5 à l'aide d'une fonction de freinage  $f$  ont été proposés :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dx}{xdt} = \mu_{\max} f(x) \\ \lim_{x \rightarrow \infty} x = x_{\max} \\ t \geq 0 ; x_{\max} \geq x \geq x_0 > 0, \quad \text{selon Gompertz} \end{array} \right. \quad (\text{IV.2})$$

$$\text{avec} \quad f(x) = \frac{\ln[x_{\max}/x]}{\ln[x_{\max}/x_0]} \quad (\text{IV.3})$$

Or nous savons que la croissance apparaît souvent après une phase de latence causée par changement des conditions de croissance au moment de l'inoculation. Les modèles définis précédemment n'intègrent pas ce délai.

-Les phases 1 à 5 de la croissance sont couramment décrites par le modèle de Gompertz appliqué non pas à la densité de population microbienne, mais à son logarithme.

$$\left\{ \begin{array}{l} t < \text{lag}, x(t) = x_0 \\ t \geq \text{lag}, x(t) = \frac{x_{\max}}{1 + \frac{[x_{\max} - 1]}{x_0} e^{-\mu_{\max}(t-\text{lag})}} \end{array} \right. \quad (\text{IV.4})$$

lag : délai de croissance ou phase de latence

#### 4.2.2.2. *Limites de la modélisation classique*

Cependant ces méthodes classiques de prédiction d'une cinétique à partir de ses premiers points expérimentaux permettant une estimation des paramètres du modèle et par conséquent la prédiction de la cinétique complète, présentent néanmoins un certain nombre de limites parmi lesquelles :

- la modélisation de données d'origine diverses,
- l'ajustement parfait des points expérimentaux quand il s'agit de données biologiques,

- l'identifiabilité de tous les paramètres du modèle à partir des premiers points de la cinétique,
- l'augmentation de la sensibilité aux erreurs de mesures si le nombre de points sur lequel on ajuste le modèle est faible,
- l'ajustement d'un modèle non linéaire à des points expérimentaux qui nécessite une estimation approximative préliminaire des paramètres. (8)

Ces difficultés rencontrées sur les données expérimentales ont motivé la recherche de méthodes alternatives de prédiction. Dans ce cadre il a été admis des méthodes permettant d'intégrer à la prédiction la connaissance acquise antérieurement sur des données expérimentales. Nous avons choisi d'appliquer l'une de ces méthodes à savoir la technique d'inférence bayésienne.

### 4.3. LA METHODE D'INFERENCE BAYESIENNE

#### 4.3.1. Principe

Dans cette étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à la prédiction du temps de seuil de densité microbienne pouvant être identifiée par la microméthode CSB, paramètre qui peut par exemple rendre compte de la durée de stabilité des caractères physiques et biochimiques d'une cellule bactérienne. Nous construisons une méthode d'ajustement d'un modèle à partir des premiers points, laquelle méthode est basée sur l'incorporation au critère d'ajustement de la relation entre le temps de latence et le taux de croissance, à l'aide du théorème de Bayes.

#### 4.3.2 Le théorème de Bayes

Considérons un modèle non linéaire de la forme

$$y = f(\theta, x) + \varepsilon \quad (\text{IV.5})$$

où  $y$  est la variable mesurée,

$x$  la variable de contrôle associée et,

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

A partir de  $p(\theta, \sigma)$  la distribution marginale *a priori* des paramètres connaissant les données :

$$p(\theta, \sigma | y) = \frac{p(\theta, \sigma, y)}{p(y)} = \frac{p(y | \theta, \sigma) p(\theta, \sigma)}{p(y)} \propto p(y | \theta, \sigma) p(\theta, \sigma) \quad (\text{IV.6})$$

On appelle cette densité la distribution *a posteriori* des paramètres. L'utilisation de ce théorème dans l'estimation du vecteur paramètre est la base de l'inférence et a été appliquée à des modèles linéaires puis à des modèles non linéaires (Berkey, 1982).

Berkey a montré que cette méthode permettait de prédire correctement les paramètres de croissance même à partir de jeux de données incomplets, et était moins sensible aux erreurs de mesure que la méthode des moindres carrés.

#### 4. 3.3. Méthode d'estimation des paramètres

Elle oriente le choix de la distribution *a priori* des paramètres lorsque l'on ne possède aucune information *a priori* sur les paramètres à estimer, grâce à une méthode d'estimation des paramètres du modèle avec la loi :

$$p(\theta, \sigma | y) \propto \frac{P(\theta)}{\sigma^{n+1}} \exp \left\{ - \frac{1}{2\sigma} \{S(\theta)\} \right\} \quad (\text{IV.7})$$

Où  $S(\theta)$  représente la somme des carrés des écarts.

Une estimation des paramètres peut être déterminée en calculant soit la moyenne, soit le mode de cette distribution. Le calcul de la moyenne de la distribution *a posteriori* nécessite malheureusement la normalisation de cette densité *a posteriori*. C'est une intégration qui implique en général un calcul numérique fastidieux. Ainsi l'on a remarqué que lorsque  $p(\theta)$  est constant, ce qui correspond à une distribution localement uniforme de  $\theta$ , ou lorsque le nombre de points de mesure  $n$  devient grand, la méthode se ramène à une minimisation  $S(\theta)$ .

## I. METHODOLOGIE

### 1.1. MATERIEL ET MILIEUX

#### 1.1.1. Matériel

##### *1.1.1.1. Cadre d'étude*

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

##### *1.1.1.2. Souches bactériennes*

Nous avons utilisé des souches de référence et de contrôle de staphylocoques et de streptocoques, déjà identifiées et conservées à -20°C :

- la souche de référence de *Staphylococcus aureus* : *S.aureus* ATCC 29213
- des souches de contrôle dont :
  - Une souche de *Staphylococcus epidermidis*,
  - Une souche de *Staphylococcus saprophyticus*,
  - Une souche de *Staphylococcus haemolyticus*,
  - Une souche de *Streptococcus pyogenes*.

##### *1.1.1.3. Matériel pour l'identification*

- Bec bunsen
- Etuve
- Four à micro-ondes
- Agitateur magnétique
- Dessiccateur sous vide à air renouvelé
- Microscope optique
- Micropipettes
- Microplaques
- Embouts stériles
- Becher rempli d'eau de javel
- Plateau (inoxydable de préférence)
- Papier buvard
- Anse de platine
- Emballage plastique
- Lame porte-objet
- Lamelles

#### ***1.1.1.4. Matériel pour l'étude de la croissance***

- Appareillage pour la stérilisation en chaleur humide (autoclave) ;
- Etuve capable de maintenir une température de  $(36\pm 2)^{\circ}\text{C}$  ;
- Boîtes de Pétri en matière plastique ;
- Tubes à vis stériles ;
- Embouts stériles ;
- Micropipettes de 100  $\mu\text{l}$  et 1000  $\mu\text{l}$ ;
- Bain-marie
- Appareil pour le comptage des colonies muni d'un système d'éclairage sur fond noir
- Spectrophotomètre

#### ***1.1.1.5. Matériel pour la conservation des souches***

- Tubes nunc
- Tubes stériles à vis
- Gryotubes avec billes
- Portoirs
- Anse de platine

### 1.1.2. Milieux

#### Milieux pour l'enrichissement et le dénombrement

- Bouillon glucosé tamponné ( BGT)
- Bouillon trypticase soja
- Gélose Müller Hinton (MH)
- Gélose au sang de mouton
- Gélose chapman



**Figure 1.1. : Matériel et milieux nécessaires au dénombrement sur boîtes de Pétri.**

## 1.2. CONTROLE DE QUALITE DES TESTS EFFECTUES

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

### 1.2.1. Contrôle de stérilité des milieux d'enrichissement et d'isolement

#### - *Milieux liquides*

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

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

#### - *Milieux solides*

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

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

### 1.2.2. Contrôle de qualité des galeries d'identification déshydratées

100 µl de milieu sont distribués dans chaque puit. La déshydratation se fait en présence d'un dessiccateur ou dans un four à micro-ondes.

### ***1.2.2.1. Contrôle de stérilité***

Après 24 à 48 heures d'incubation et après révélation de certains tests, le lot est considéré stérile en l'absence de virage de l'indicateur et de réaction positive pour les tests révélés.

### ***1.2.2.2. Contrôle d'efficacité***

Il est réalisé avec des souches de référence et de contrôle dont le profil biochimique est stable et bien connu.

Ainsi le milieu considéré stérile doit faire l'objet d'une étude en ce qui concerne sa capacité à donner un résultat positif ou négatif pour un caractère donné.

- **Technique**

Deux plaques sont prévues pour chaque galerie (contrôles positifs et négatifs).

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

La turbidité de la suspension bactérienne est ajustée à :

- 1 à l'échelle McFarland pour les staphylocoques

- 4 à l'échelle McFarland pour les streptocoques.

100 µl de chaque suspension bactérienne sont déposés dans les puits correspondants de la plaque et ceci pour chaque galerie.

Pour les cupules contenant les sucres, la suspension bactérienne est mélangée avec le MEVAG Strepto/Staph ce mélange est ensuite ensemencé dans les cupules (100 µl).

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

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

La lecture est effectuée grâce à des fiches de lecture (tableaux **V** et **VI**).

### 1.2.3. Contrôle des appareils

- L'étuve

La température était toujours à 37°C.

- Le spectrophotomètre

Avant toute mesure, l'appareil était étalonné avec de l'eau distillée.

**Tableaux V : Plan des plaques pour le contrôle des réactifs pour les staphylocoques**

**Tableau Va : Plaque des contrôles positifs**

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

**Tableau Vb : Plaque des contrôles négatifs**

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

**Tableaux VI : Plan des plaques pour le contrôle des réactifs pour les streptocoques**

**Tableau VIa : Plaque des contrôles positifs**

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

**Tableau VIb : Plaque des contrôles négatifs**

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

## 1.3. METHODES

### 1.3.1. Identification

Comme nous avons travaillé sur des souches déjà identifiées et conservées, nous n'avons procédé qu'à une identification sommaire des bactéries à étudier.

#### ***1.3.1.1. Identification des souches de Staphylococcus aureus , de Staphylococcus epidermidis, de Staphylococcus saprophyticus et de Staphylococcus haemolyticus***

En vue d'obtenir des colonies isolées, nous avons isolé les souches sur de la gélose Chapman, et incubé à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

##### ***- Examen macroscopique***

*Staphylococcus aureus* donne sur gélose chapman des colonies lisses, luisantes et bombées, plus ou moins pigmentées en jaune or d'où l'appellation *Staphylococcus aureus* ou staphylocoque « doré ». Il produit dans le bouillon un trouble homogène.

*Staphylococcus epidermidis* donne sur chapman des colonies opaques, lisses, jaunes ou blanches. Il en est de même pour *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus haemolyticus*.

##### ***- Examen microscopique***

A partir d'une colonie, nous avons confectionné un frottis que nous avons ensuite coloré au Gram.

L'examen microscopique à l'objectif à immersion (X100) montrait des coques à Gram positif d'un diamètre d'environ 1 micromètre apparaissant en « amas » ou en « grappes de raisin ».

Pour les souches de *Staphylococcus epidermidis*, de *Staphylococcus saprophyticus* et de *Staphylococcus haemolyticus*, nous avons observé des diplocoques Gram positif disposés en « amas » ou « grappes de raisin ».

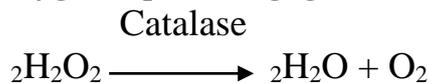
Ils sont immobiles, non sporulés et ne présentent pas de capsule visible au microscope optique.

### - *Test à la catalase*

- Principe

L'eau oxygénée produite par certaines déshydrogénases de la chaîne respiratoire est toxique pour la bactérie. Ainsi c'est la catalase qui va permettre la détoxification de cette eau oxygénée.

La catalase est une enzyme qui hydrolyse le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui se dégage.



- Technique

Ce test consiste à réaliser un frottis à partir de colonies isolées sur un milieu exempt de globules rouges comme la gélose trypticase soja.

Déposer quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène à 3%. Puis rechercher une libération immédiate d'oxygène.

- Lecture

Catalase positive : apparition de bulles d'oxygène

Catalase négative : l'aspect reste inchangé.

- Résultat

*Staphylococcus aureus* est catalase positive, de même que *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus haemolyticus*.

#### **1.3.1.2. Identification des souches de *Streptococcus pyogenes***

Afin d'obtenir des colonies isolées, les souches ont été ensemencées sur de la gélose au sang, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

#### **- Examen macroscopique**

Les streptocoques A se présentent sous forme de petites colonies transparentes entourées d'une zone d'hémolyse  $\beta$ .

### **- Examen microscopique**

Nous confectionnions un frottis à partir d'une colonie, que nous colorions au Gram.

L'observation microscopique à l'objectif à immersion des streptocoques montrait des cocci à Gram positif regroupés en chaînettes plus ou moins longues, immobiles, non sporulés, non capsulés.

### **- Test à la catalase (*idem pour les staphylocoques*)**

Le streptocoque A est catalase négative.

### **1.3.2. Etude de la croissance et de l'effet de l'inoculum sur l'identification par la galerie Micro-CSB**

En vue d'obtenir des résultats superposables, nous avons travaillé avec le même inoculum. Notre travail comprenait deux étapes pour chaque échantillon de la suspension bactérienne :

- le dénombrement bactérien exprimé en UFC/ml,
- l'ensemencement d'une galerie Micro-CSB.

#### **1.3.2.1. Etude de la croissance**

##### **a) Les staphylocoques**

#### **- Préparation de l'inoculum**

A partir de colonies isolées sur de la gélose Chapman(1 à 2 colonies), nous avons préparé une suspension bactérienne dans du bouillon glucosé tamponné (BGT 10ml) que nous avons incubé pendant 3 h.

#### **- Etude de la croissance**

A partir de  $t_0$ , nous avons prélevé toutes les 30 minutes 1,5 ml de la suspension bactérienne, dont nous avons déterminé la concentration par le dénombrement bactérien sur BP, et ce pendant 3 heures de temps.

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

- Dénombrement bactérien sur Boîtes de Pétri

- Principe

La technique de mesure de la croissance d'une population bactérienne par dénombrement sur boîtes de Pétri consiste à ensemercer à des intervalles de temps réguliers des boîtes de Pétri par une dilution appropriée d'un échantillon de la suspension bactérienne : la dilution est calculée pour obtenir entre 30 et 300 colonies sur chaque boîte, ces deux bornes étant considérées comme donnant le moins d'erreurs sur le dénombrement final. Cette étape est suivie d'une culture de 24 à 48h à 37°C au terme de laquelle les colonies sont dénombrées. (3)

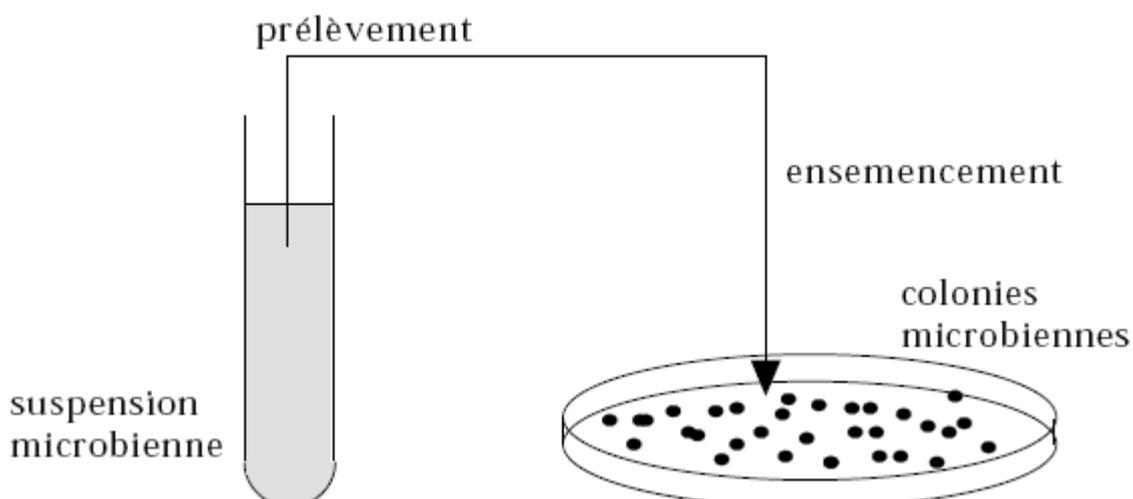
Les intervalles de temps entre les prélèvements (toutes les 30 minutes) ont été choisis pour avoir un maximum de points dans la phase exponentielle de la croissance.

- Technique

Nous avons effectué la technique de l'ensemencement par incorporation 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 mis dans la boîte en même temps que la gélose molle, l'ensemble était mélangé par rotation lente de la boîte. Lorsque la gélose devenait sèche, les boîtes étaient placées à l'étuve pendant 24 heures à 37°C.

Pour chaque inoculum nous ensemençons 2 boîtes de Pétri.



**Figure 1.2. Technique de dénombrement sur boîte de Pétri. (8)**

- Expression des résultats

Les résultats sont obtenus en faisant la moyenne du dénombrement de chaque boîte de Pétri, exprimés en UFC/ml.

*b) Les streptocoques*

***-Préparation de l'inoculum***

A partir de colonies isolées sur de la gélose au sang ordinaire ( 1 à 2 colonies), nous préparons une suspension bactérienne dans du bouillon Trypticase soja (10ml) que nous incubons pendant 5h.

***- Etude de la croissance***

A partir de  $t_0$ , nous prélevons toutes les heures 1,5 ml de la suspension bactérienne, dont nous déterminons la concentration par le dénombrement bactérien sur Boîte de Pétri, et ce pendant 5 heures de temps.

Au total, nous avons 6 points à étudier :  $t_0$  ,  $t_1= 1h$ ,  $t_2= 2h$ ,  $t_3= 3h$  ,  $t_4= 4h$ ,  $t_5= 5h$ .

Pour les streptocoques l'ensemencement se faisait par étalement des 100 derniers  $\mu\text{l}$  sur de la gélose au sang.

***- Résultats du dénombrement***

Les résultats sont obtenus en faisant la moyenne du dénombrement de chaque boîte, exprimés en UFC/ml.

(cf exploitation des résultats)

***1.3.2.2. Application à la galerie Micro-CSB***

Avec l'inoculum prélevé aux différents intervalles de temps, nous ensemencions une galerie. Au total 5 galeries étaient ensemencées pour chaque souche de Staphylocoques et 4 pour *Streptococcus pyogenes*.

Nous les avons incubées à  $37^\circ\text{C}$  pendant 24h, et nous avons déterminé l'inoculum qui donnait une positivité franche de tous les caractères de la galerie.

- Principe

Les galeries CSB Staph et Strepto permettent la mise en évidence d'activités enzymatiques ou d'assimilation de substrats carbonés en milieu approprié (fermentation) ou hostile avec 15 tests biochimiques, elles permettent de faire un diagnostic d'espèces de staphylocoques et de streptocoques.

- Technique

### Les staphylocoques

Il faut :

- distribuer 100µl d'inoculum bactérien par microcupule de URE à NIT,
- verser le reste de la suspension bactérienne dans 1ml de MEVAG et mélanger,
- ensemercer les cupules de GLU à RAF avec 100µl de MEVAG ainsi inoculé,
- recouvrir les puits URE, ADH, ODC et tous les sucres avec 2 gouttes d'huile de paraffine afin de maintenir l'anaérobiose nécessaire aux réactions,
- incuber à 37°C sur un plateau recouvert de papier buvard imbibé d'eau,
- lire après 4 heures, puis après 18 heures d'incubation.

### Les streptocoques

Il faut :

- distribuer 100µl d'inoculum bactérien par cupule de VP à BHS,
- verser le reste de la suspension bactérienne dans 1ml de MEVAG streptocoque et mélanger,
- ensemercer les cupules ARA à GLY avec le MEVAG ainsi inoculé (100µl par cupule),
- fermer les cupules ADH et tous les sucres avec 2 gouttes d'huile de paraffine,
- incuber à 37°C sur un plateau recouvert de papier buvard imbibé d'eau,
- lire après 4 heures, puis après 18 heures d'incubation.

- Lecture et expression des résultats

La lecture reposait sur le changement de la coloration initiale des différents milieux. Pour la plupart des milieux, la lecture se faisait directement alors que pour d'autres, elle nécessitait l'addition de réactifs de révélation.

La lecture des caractères est faite sur une fiche de lecture (cf. tableaux **VII** et **VIII**).

En fonction des résultats obtenus, nous avons procédé à la validation de l'identification des différentes espèces.

**Tableau VII : Lecture des staphylocoques**

| Tests   | Substrats   | Réactions / 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<br>1 goutte de $\alpha$ -naphthol                | Rose-rouge         | Incolore           |
| ONPG  | ONPG  | $\beta$ -galactosidase  |  | Rouge              | Incolore           |
| NIT   | Nitrate de potassium  | Nitrate réductase       | 1 goutte d'acide sulfanilique<br>1 goutte $\alpha$ -naphtylamine | Rouge              | Incolore           |
| GLU<br>TRE<br>MAN<br>XYL<br>SAC<br>GLY<br>MNE<br>LAC<br>RAF | Glucose<br>Tréhalose<br>Mannitol<br>Xylose<br>Saccharose<br>Glycérol<br>Mannose<br>Lactose<br>Raffinose | Fermentation            |  | Jaune              | Rouge              |

L'identification est rendue possible grâce à l'utilisation de tableau d'identification (cf. **tableau IX**).

**Tableau VIII : Lecture des streptocoques**

| Tests   | Substrats  | Réactions Enzymes              | Réactifs à ajouter  | Résultats positifs | Résultats négatifs |
|---|--|--------------------------------|---|--------------------|--------------------|
| VP  | Glucose + Pyruvate   | Production d'acétoïne          | 1 goutte de KOH<br>1 goutte de créatinine<br>1 goutte de $\alpha$ -naphthol | Rose-rouge         | Incolore           |
| ESC   | Esculine   | $\beta$ -glucosidase           |   | Noir               | Incolore           |
| ADH   | Arginine   | Arginine dihydrolase           |   | Rouge              | Jaune              |
| BHS   | Glucose  | Croissance en milieu hypersalé |   | Jaune              | Violet             |
| ARA<br>MAN<br>SOR<br>TRE<br>RAF<br>SOS<br>INU<br>LAC<br>RIB<br>AMD<br>GLY | L Arabinose<br>Mannitol<br>Sorbitol<br>Tréhalose<br>Raffinose<br>Sorbose<br>Inuline<br>Lactose<br>Ribose<br>Amidon<br>Glycérol | Fermentation                   |   | Jaune              | Rouge              |

L'identification est rendue possible grâce à l'utilisation de tableau d'identification (cf. **tableau X**).

**Tableau IX: Identification des espèces de staphylocoques étudiées**

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

**Caractère négatif : 0-25 % des souches ;**

**Caractère positif > 70% des souches ;**

**Caractère variable (d) : 26-70 % des souches**

**Tableau X : Identification de *Streptococcus pyogenes***

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

**Caractères négatifs : 0-25 % des souches ;**

**Caractères variables (d) : 26-70 % des souches**

**Caractères positifs > 70 % des souches**

### ***1.3.2.3. Prédiction***

Elle est basée sur les résultats du dénombrement. Cette partie était purement mathématique et sera traitée au niveau de l'exploitation des résultats.

## II. EXPLOITATION DES RESULTATS ET COMMENTAIRES

### 2.1. CINETIQUES DE CROISSANCE ET EFFET INOCULUM SUR L'IDENTIFICATION

#### 2.1.1. *Staphylococcus aureus*

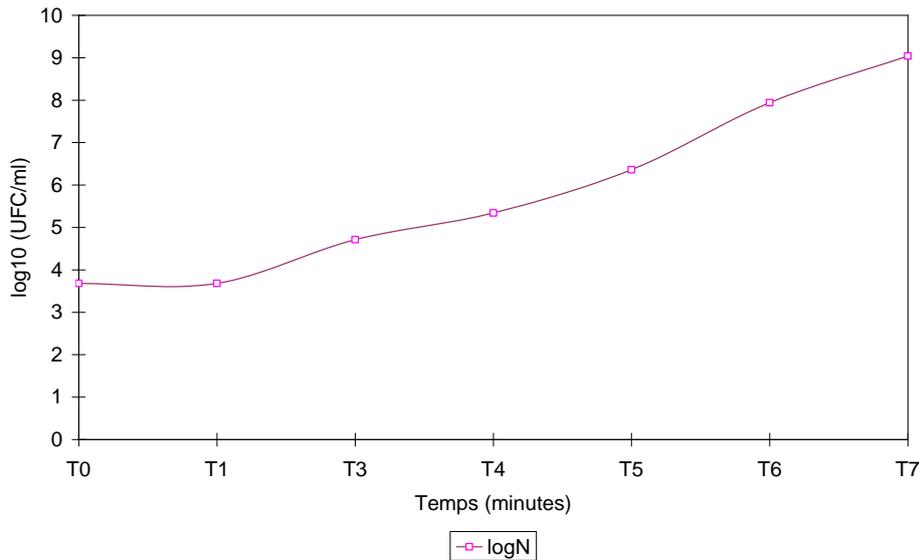
##### a) Résultats du dénombrement

Le tableau XI. montre les résultats du dénombrement de *S. aureus*.

**Tableau XI** : Dénombrement de *Staphylococcus aureus*

| Temps (min) | N (UFC/ml)           | Log (N) |
|-------------|----------------------|---------|
| 0           | 4,8 10 <sup>3</sup>  | 3.68    |
| 30          | 4,8 10 <sup>3</sup>  | 3.68    |
| 60          | 5.7 10 <sup>4</sup>  | 4.76    |
| 90          | 2.2 10 <sup>5</sup>  | 5.34    |
| 120         | 2.3 10 <sup>6</sup>  | 6.36    |
| 150         | 8.8 10 <sup>7</sup>  | 7.94    |
| 180         | 1.11 10 <sup>9</sup> | 9.04    |

La courbe est représentée à la figure (2.1)



**Figure 2.1** : Courbe de croissance de *S. aureus* à partir des données expérimentales,  $f(t) = \log_{10}(\text{UFC/ml})$ .

Nous avons observé sur la courbe que durant trente minutes, la bactérie ne présentait pas de croissance, cette période correspondait donc au temps de latence de la bactérie. La définition utilisée dans cette étude a été proposée par Monod (1949) ; le regroupement des phases de croissance 1 et 2 (figure 3.1, Généralités) est à la base de cette définition. La fin du temps de latence, *lag*, est définie comme le point d'intersection entre la tangente à la phase exponentielle de croissance et l'horizontale de la droite passant par  $\log(N_0)$ .(4)

A partir de cet instant la bactérie commençait à se multiplier dans le bouillon, elle se trouvait ensuite en phase exponentielle pendant les trois heures que nous avons eu à la suivre.

Ainsi en fonction de la courbe nous avons pu déterminer les paramètres ( $G$ ,  $\mu$ , *lag*, et  $K$ ) qui ont servi à modéliser la croissance pour la prédiction.

#### *b) Détermination des paramètres*

##### **- Temps de génération : $G$**

Le temps de génération peut être déterminé à partir de la courbe de manière mathématique avec la formule suivante :

$$G = \frac{t}{n} ;$$

Soit l'équation :  $N_t = N_0 2^n$  , dans la phase exponentielle

$N_t$  : nombre de bactéries à l'instant t,

$N_0$  : nombre de bactéries à  $t_0$ ,

n : nombre de générations.

La forme logarithmique de l'équation est :

$$\log N_t = \log N_0 + n \ln 2$$

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

Application numérique :

$$\text{Pour } \log N_t = \log N_{120} = 6,36$$

$$\log N_0 = 3,68$$

$$\mathbf{G = 31 \text{ min}}$$

- **Taux de croissance :  $\mu$**

C'est la vitesse avec laquelle la bactérie croît dans le milieu, ce taux est donné par la relation suivante :

$$\mu = \frac{\ln 2}{G}$$

$$\text{Pour cette espèce } \mathbf{\mu = 0,022 \text{ min}^{-1}}$$

*c) Résultats des galeries micro- CSB Staph*

Les galeries ensemencées à chaque intervalle de temps comme décrit dans le protocole ont donné, après lecture au bout de 24 heures d'incubation, les résultats suivants. Il est à préciser que compte tenu de la faiblesse de la taille de l'inoculum aux temps égaux à  $t_0$  et 30 minutes, nous avons préféré commencer l'identification à partir de 60 minutes.

### Conditions d'interprétation des résultats de la galerie Micro-CSB (34)

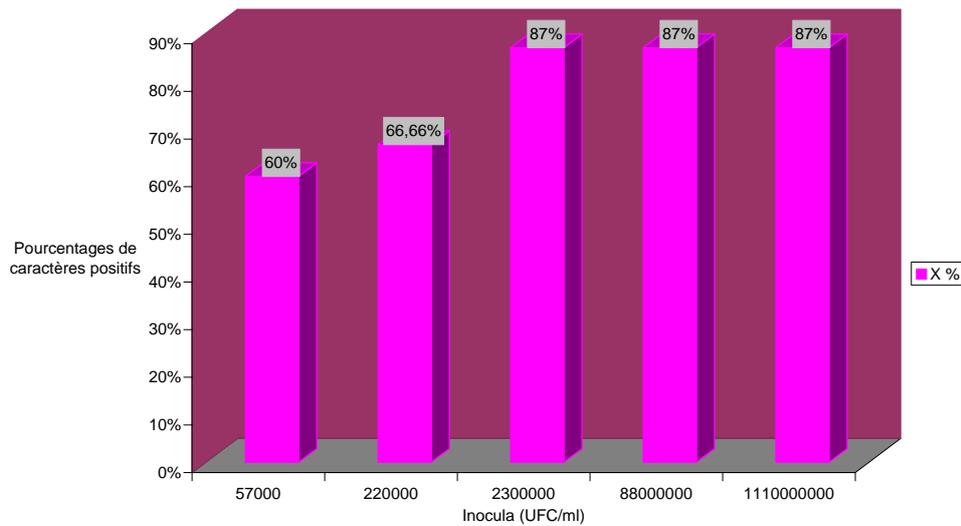
Les conditions d'interprétation des résultats de la galerie étaient les suivantes :

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

**Tableau XII : Concordance des caractères biochimiques en fonction de l'inoculum de *Staphylococcus aureus*.**

| Temps<br>Inocula         | 60                 | 90                 | 120                | 150                | 180                 | Caractères<br>d'identification<br>de <i>Staphylococcus<br/>aureus</i> |
|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---|
|                          | 5,710 <sup>4</sup> | 2,210 <sup>5</sup> | 2,310 <sup>6</sup> | 8,810 <sup>7</sup> | 1,1110 <sup>9</sup> |   |
| ADH                      | +                  | +                  | +                  | +                  | +                   | +   |
| β Gal                    | -                  | -                  | -                  | -                  | -                   | -   |
| NIT                      | -                  | -                  | +                  | +                  | +                   | +   |
| ODC                      | -                  | -                  | -                  | -                  | -                   | -   |
| URE                      | -                  | -                  | -                  | -                  | -                   | +   |
| VP                       | +                  | +                  | +                  | +                  | +                   | +   |
| GLU                      | -                  | +                  | +                  | +                  | +                   | +   |
| XYL                      | -                  | -                  | -                  | -                  | -                   | -   |
| TRE                      | -                  | -                  | +                  | +                  | +                   | +   |
| SAC                      | -                  | -                  | +                  | +                  | +                   | +   |
| RAF                      | -                  | -                  | -                  | -                  | -                   | -   |
| MNE                      | +                  | +                  | +                  | +                  | +                   | +   |
| MAN                      | +                  | +                  | +                  | +                  | +                   | +   |
| LAC                      | +                  | +                  | +                  | +                  | +                   | +   |
| GLY                      | -                  | -                  | -                  | -                  | -                   | +   |
| <b>Concordance<br/>%</b> | <b>60%</b>         | <b>66,66%</b>      | <b>87%</b>         | <b>87%</b>         | <b>87%</b>          | <b>100%</b>   |

**Légende :** Temps en minutes,  
Inocula en UFC/ml,  
(+) = caractère positif,  
(-) = caractère négatif.



**Figure 2.2. : Pourcentages de concordance des caractères d'identification de *Staphylococcus aureus* en fonction de l'inoculum.**

Aux inocula de  $5,7 \times 10^4$  et  $2,2 \times 10^5$  UFC/ml (temps 60 et 90 minutes), l'identification était inacceptable ; beaucoup de caractères n'ont pas pu être révélés en l'occurrence les caractères indispensables à la bonne identification de l'espèce : SAC, GLU, LAC, GLY.

Mais l'espèce a été correctement identifiée dans les mêmes conditions d'étude à partir d'un inoculum de  $2,3 \times 10^6$  UFC/ml ( $T_{120}$ ) ; tous les principaux caractères furent justifiés excepté le glycérol. Le test à l'urée était également négatif pour tous les points.

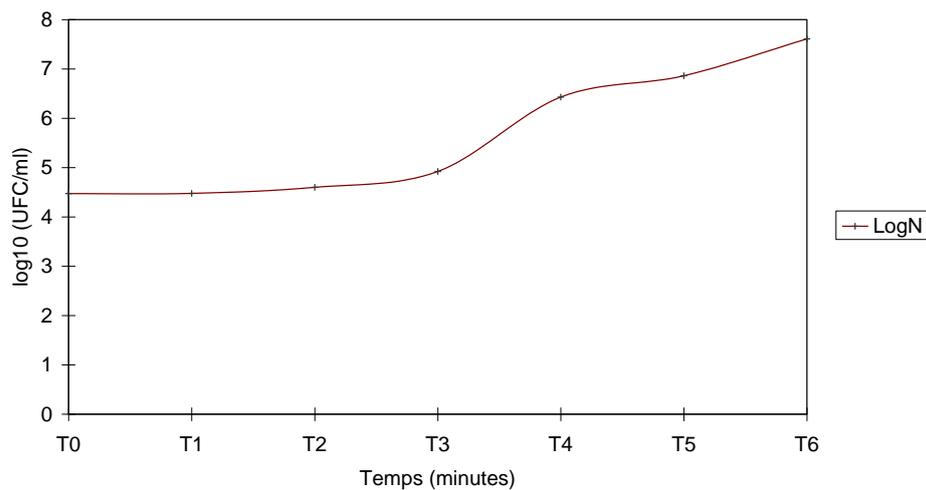
### 2.1.2. *Staphylococcus epidermidis*

#### a) Résultats du dénombrement

**Tableau XIII : Dénombrement de *Staphylococcus epidermidis***

| Temps (min) | N (UFC/ml)        | log N |
|-------------|-------------------|-------|
| 0           | $2,97 \cdot 10^4$ | 4,472 |
| 30          | $3 \cdot 10^4$    | 4,477 |
| 60          | $4 \cdot 10^4$    | 4,6   |
| 90          | $8,5 \cdot 10^4$  | 4,92  |
| 120         | $2,7 \cdot 10^6$  | 6,43  |
| 150         | $7,3 \cdot 10^6$  | 6,86  |
| 180         | $4,1 \cdot 10^7$  | 7,61  |

La courbe est représentée à la figure (2.3).



**Figure 2.3. :** Courbe de croissance de *Staphylococcus epidermidis* à partir des données expérimentales,  $f(t) = \log_{10} \text{UFC/ml}$ .

*b) Détermination des paramètres*

Le même cheminement que précédemment a été appliqué à cette espèce.

- *Temps de génération*

$$\text{lag} = 45 \text{ min}$$

Ce temps de latence est déterminé par la technique de Monod (voir annexes F. 2.2. a).

Pour  $\log N_t = 6,43$ , et  $\log N_0 = 4,472$

$$\mathbf{G = 43 \text{ min}}$$

- *Taux de croissance*

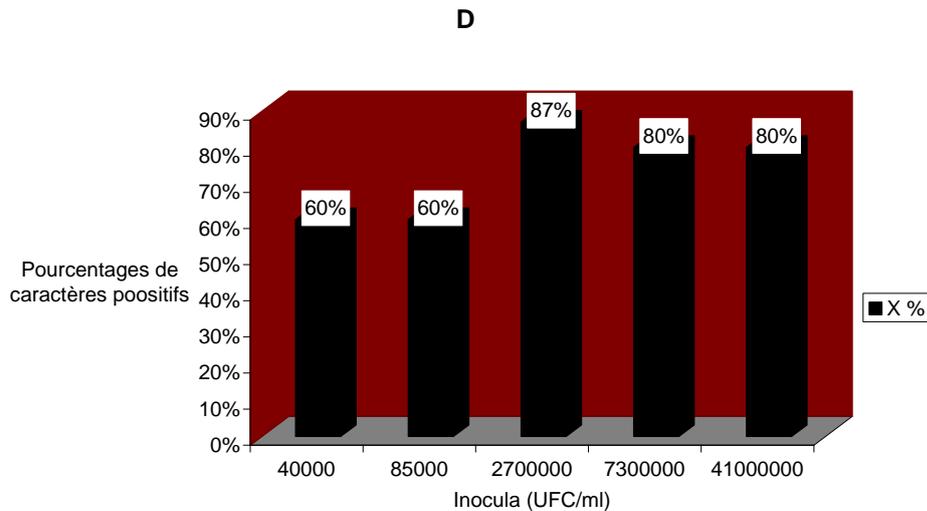
$$\mu = 0,016 \text{ min}^{-1}$$

## c) Résultats des galeries micro- CSB Staph

**Tableau XIV : Concordance des caractères biochimiques en fonction de l'inoculum de *Staphylococcus epidermidis*.**

| Temps<br>Inocula | 60               | 90                 | 120                | 150                | 180                | Caractères<br>d'identification<br>de <i>Staphylococcus<br/>epidermidis</i> |
|------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--|
| Tests            | 410 <sup>4</sup> | 8,510 <sup>4</sup> | 2,710 <sup>6</sup> | 7,310 <sup>6</sup> | 4,110 <sup>7</sup> |  |
| ADH              | +                | -                  | -                  | -                  | -                  | -  |
| β Gal            | -                | -                  | -                  | -                  | -                  | +  |
| NIT              | -                | -                  | +                  | +                  | +                  | +  |
| ODC              | -                | -                  | -                  | -                  | -                  | -  |
| URE              | -                | -                  | -                  | -                  | -                  | +  |
| VP               | +                | +                  | +                  | +                  | +                  | +  |
| GLU              | -                | +                  | +                  | +                  | +                  | +  |
| XYL              | -                | -                  | -                  | -                  | -                  | -  |
| TRE              | -                | -                  | -                  | -                  | -                  | -  |
| SAC              | -                | +                  | +                  | +                  | +                  | +  |
| RAF              | -                | +                  | -                  | -                  | -                  | -  |
| MNE              | -                | -                  | -                  | -                  | -                  | -  |
| MAN              | -                | -                  | -                  | -                  | -                  | -  |
| LAC              | +                | -                  | +                  | +                  | +                  | +  |
| GLY              | -                | -                  | +                  | -                  | -                  | +  |
| Concordance<br>% | 60%              | 60%                | 87%                | 80%                | 80%                | 100%   |

**Légende :** Temps en minutes,  
 Inocula en UFC/ml,  
 (+) = caractère positif,  
 (-) = caractère négatif.



**Figure 2.4. : Pourcentages de concordance des caractères d'identification de *Staphylococcus epidermidis* en fonction de l'inoculum.**

Pour les inocula de  $4 \times 10^4$  et  $8,5 \times 10^4$  UFC/ml (temps 60 et 90 minutes) 4 caractères parmi les 7 principaux sont faussés, ces résultats n'étaient donc pas bons. A la deuxième heure, seuls deux caractères étaient discordants il s'agissait de l'urée et de l'ONPG même le glycérol négatif pour tous les tests était positif à cet instant.

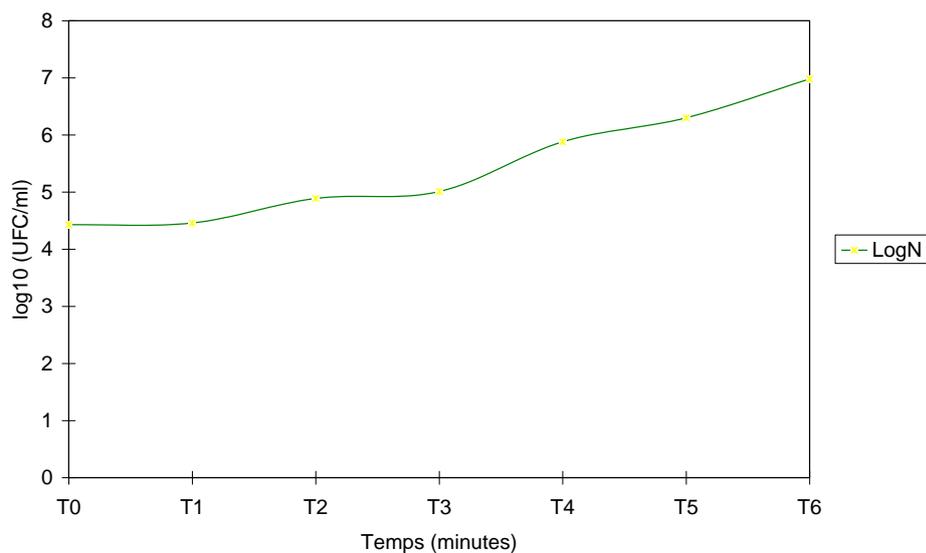
Du fait des caractéristiques propres à chaque espèce, la croissance était plus lente et par conséquent les pourcentages de positivité plus faibles. Néanmoins l'identification restait tout de même possible à partir d'un inoculum de  $2,7 \times 10^6$  UFC/ml ( $T_{120}$ ).

### 2.1.3. *Staphylococcus saprophyticus*

#### a) Résultats du dénombrement

**Tableau XV : Dénombrement de *Staphylococcus saprophyticus*.**

| Temps (min) | N (UFC/ml)        | log N |
|-------------|-------------------|-------|
| 0           | $2,7 \cdot 10^4$  | 4,43  |
| 30          | $2,92 \cdot 10^4$ | 4,46  |
| 60          | $7,8 \cdot 10^4$  | 4,89  |
| 90          | $1,04 \cdot 10^5$ | 5,01  |
| 120         | $7,5 \cdot 10^5$  | 5,88  |
| 150         | $1,95 \cdot 10^6$ | 6,3   |
| 180         | $9,7 \cdot 10^6$  | 6,98  |



**Figure 2.5. : Courbe de croissance de *Staphylococcus saprophyticus* à partir des données expérimentales  $f(t) = \log_{10}$  (UFC/ml).**

La courbe (2.5) montre 2 phases de croissance à partir de  $T_0$  puis à  $T_3$ . En effet entre  $T_2$  et  $T_3$ , nous avons remarqué une phase en plateau, la bactérie semblait s'arrêter de croître. Les paramètres ont été déterminés à partir de la première croissance c'est-à-dire entre  $T_0$  et  $T_3$ , car nous supposons que la seconde phase de croissance était due à l'influence de la présence d'un produit du métabolisme de la bactérie ou d'un facteur limitant.

*b) Détermination des paramètres*

- *Temps de génération*

Le temps de latence étant de 38 min, (voir détermination du *lag* en annexes F. 2.3. a).

$$G = 57 \text{ min}$$

- *Taux de croissance*

$$\mu = 0,012 \text{ min}^{-1}$$

## d) Résultats des galeries micro -CSB Staph

**Tableau XVI : Concordance des caractères biochimiques en fonction de l'inoculum de *Staphylococcus saprophyticus*.**

| Temps<br>Inocula         | 60                 | 90                  | 120                | 150                 | 180                | Caractères<br>d'identification<br>de <i>Staphylococcus<br/>saprophyticus</i> |
|--------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--|
|                          | 7,810 <sup>4</sup> | 1,0410 <sup>5</sup> | 7,510 <sup>5</sup> | 1,9510 <sup>6</sup> | 9,710 <sup>6</sup> |  |
| ADH                      | -                  | -                   | -                  | -                   | -                  | d  |
| β Gal                    | -                  | -                   | -                  | -                   | -                  | +  |
| NIT                      | -                  | -                   | -                  | -                   | -                  | d  |
| ODC                      | -                  | -                   | -                  | -                   | -                  | -  |
| URE                      | -                  | -                   | +                  | +                   | +                  | +  |
| VP                       | +                  | +                   | +                  | +                   | +                  | +  |
| GLU                      | +                  | +                   | +                  | +                   | +                  | +  |
| XYL                      | d                  | -                   | -                  | -                   | -                  | -  |
| TRE                      | +                  | +                   | +                  | +                   | +                  | +  |
| SAC                      | +                  | +                   | +                  | +                   | +                  | +  |
| RAF                      | -                  | -                   | -                  | -                   | -                  | -  |
| MNE                      | +                  | +                   | +                  | +                   | +                  | +  |
| MAN                      | +                  | +                   | +                  | +                   | +                  | +  |
| LAC                      | +                  | +                   | +                  | +                   | +                  | +  |
| GLY                      | +                  | +                   | +                  | +                   | +                  | +  |
| <b>Concordance<br/>%</b> | <b>87%</b>         | <b>87%</b>          | <b>94%</b>         | <b>94%</b>          | <b>94%</b>         | <b>100%</b>  |

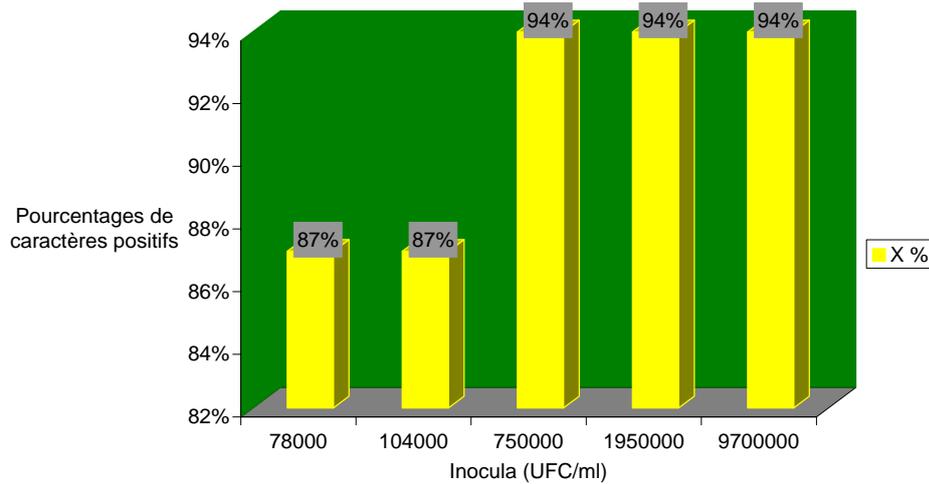
**Légende :** Temps en minutes

Inocula en UFC/ml

(+) = caractère positif,

(-) = caractère négatif,

(d) = caractère variable.



**Figure 2.6. : Pourcentages de concordance des caractères d'identification de *Staphylococcus saprophyticus* en fonction de l'inoculum.**

Bien que sa croissance soit lente par rapport aux deux premières espèces, *Staphylococcus saprophyticus* était déjà bien identifié à partir de  $7,8 \times 10^4$  UFC/ml ( $T_{60}$ ) avec seulement 2 caractères discordants (ONPG et URE). Mais à  $7,5 \times 10^5$  UFC/ml (2 heures) et plus l'identification était bonne, tous les caractères indispensables à l'identification de *Staphylococcus saprophyticus* étaient retrouvés.

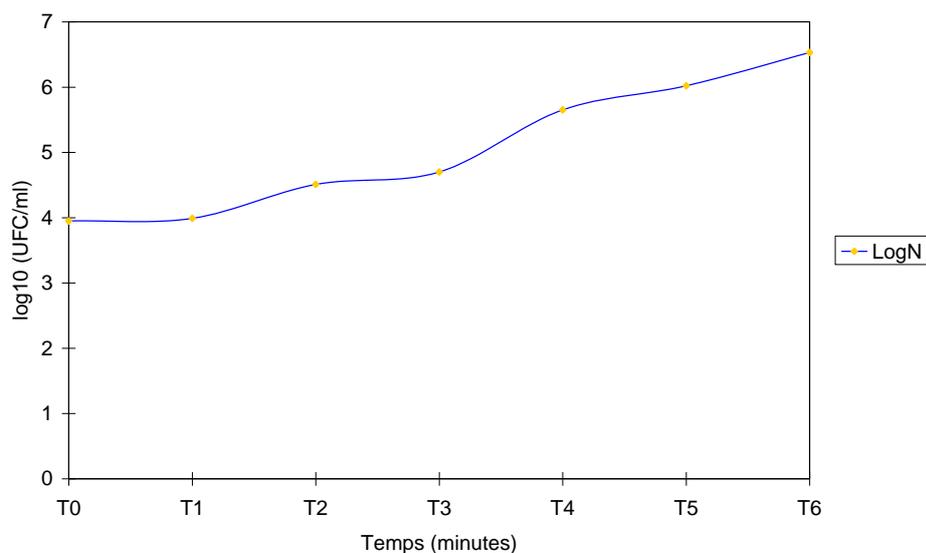
### 2.1.4. *Staphylococcus haemolyticus*

#### a) Résultats du dénombrement

**Tableau XVII : Dénombrement de *Staphylococcus haemolyticus***

| Temps (min) | N (UFC/ml)        | log N |
|-------------|-------------------|-------|
| 0           | $9 \cdot 10^3$    | 3,95  |
| 30          | $9,9 \cdot 10^3$  | 3,99  |
| 60          | $3,3 \cdot 10^4$  | 4,51  |
| 90          | $5 \cdot 10^4$    | 4,7   |
| 120         | $4,5 \cdot 10^5$  | 5,65  |
| 150         | $1,07 \cdot 10^6$ | 6,02  |
| 180         | $3,4 \cdot 10^6$  | 6,53  |

La courbe est représentée à la figure (2.7).



**Figure 2.7. : Courbe de croissance de *Staphylococcus haemolyticus* à partir des données expérimentales,  $f(t) = \log_{10}$  (UFC/ml).**

*b) Détermination des paramètres*

- *Temps de génération :*

Le temps de latence était de 30 minutes (voir figure **2.4.a.annexes**).

$$\mathbf{G = 49 \text{ minutes}}$$

- *Taux de croissance :*

$$\mathbf{\mu = 0,014 \text{ min}^{-1}}$$

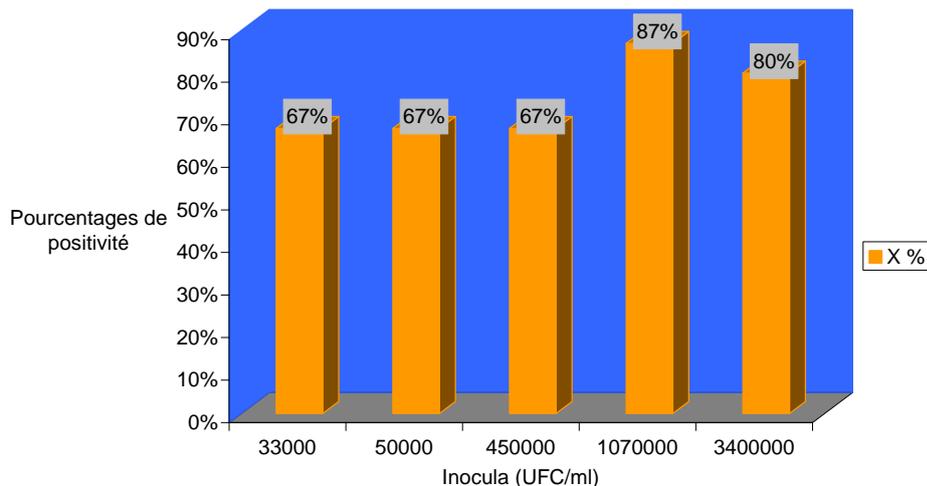
c) Résultats des galeries micro-CSB Staph

Les résultats des galeries sont représentés ci-dessous :

**Tableau XVIII: Concordance des caractères biochimiques en fonction de l'inoculum de *Staphylococcus haemolyticus*.**

| Temps<br>Inocula         | 60                 | 90               | 120                | 150                 | 180                | Caractères<br>d'identification<br>de <i>Staphylococcus<br/>haemolyticus</i> |
|--------------------------|--------------------|------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---|
| Tests                    | 3,310 <sup>4</sup> | 510 <sup>5</sup> | 4,510 <sup>5</sup> | 1,0710 <sup>6</sup> | 3,410 <sup>6</sup> |   |
| ADH                      | +                  | +                | +                  | +                   | +                  | +   |
| β Gal                    | -                  | -                | -                  | -                   | -                  | -   |
| NIT                      | -                  | -                | -                  | -                   | -                  | +   |
| ODC                      | -                  | -                | -                  | -                   | -                  | -   |
| URE                      | -                  | -                | -                  | -                   | -                  | -   |
| VP                       | +                  | +                | +                  | +                   | +                  | +   |
| GLU                      | +                  | -                | +                  | +                   | +                  | +   |
| XYL                      | +                  | -                | +                  | -                   | -                  | -   |
| TRE                      | +                  | -                | +                  | +                   | +                  | +   |
| SAC                      | +                  | -                | +                  | +                   | +                  | +   |
| RAF                      | +                  | -                | +                  | -                   | +                  | -   |
| MNE                      | +                  | -                | +                  | +                   | +                  | -   |
| MAN                      | +                  | +                | +                  | +                   | +                  | +   |
| LAC                      | +                  | +                | +                  | +                   | +                  | +   |
| GLY                      | -                  | -                | -                  | +                   | +                  | +   |
| <b>Concordance<br/>%</b> | <b>67%</b>         | <b>67%</b>       | <b>67%</b>         | <b>87%</b>          | <b>80%</b>         | <b>100%</b>   |

**Légende :** Temps en minutes,  
Inocula en UFC/ml,  
(+) = caractère positif,  
(-) = caractère négatif.



**Figure 2.8. : Pourcentages de concordance des caractères d'identification de *Staphylococcus haemolyticus* en fonction de l'inoculum.**

Nous avons constaté que les résultats étaient pratiquement pareils à ceux des espèces précédemment étudiées. L'identification était correcte à partir d'un inoculum de  $1,07 \times 10^6$  UFC/ml, seul un caractère d'ailleurs indispensable (le mannose) était discordant pour tous les inocula.

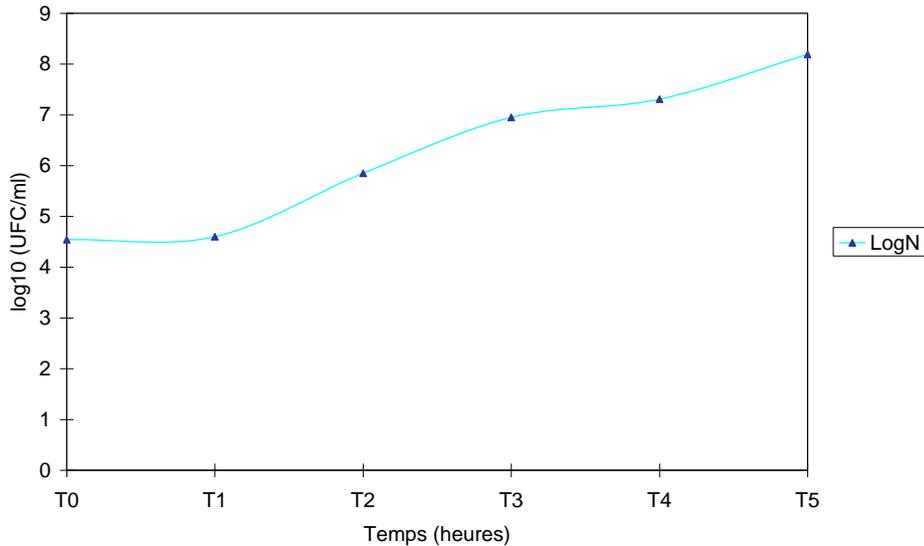
### 2.1.5. *Streptococcus pyogenes*

#### a) Résultats du dénombrement

D'après des expériences antérieures, nous avons constaté que les streptocoques croissaient plus lentement que les staphylocoques ; aussi avons-nous choisi d'augmenter les intervalles de mesure. Les mesures étaient effectuées toutes les heures et ceci pendant cinq heures de temps.

**Tableau XIX : Dénombrement de *Streptococcus pyogenes***

| <b>Temps<br/>(min)</b> | <b>N (UFC/ml)</b>          | <b>log N</b> |
|------------------------|----------------------------|--------------|
| <b>0</b>               | <b>3,5 10<sup>4</sup></b>  | <b>4,54</b>  |
| <b>60</b>              | <b>4 10<sup>4</sup></b>    | <b>4,6</b>   |
| <b>120</b>             | <b>7,2 10<sup>5</sup></b>  | <b>5,85</b>  |
| <b>180</b>             | <b>8,9 10<sup>6</sup></b>  | <b>6,95</b>  |
| <b>240</b>             | <b>2,06 10<sup>7</sup></b> | <b>7,31</b>  |
| <b>300</b>             | <b>1,55 10<sup>8</sup></b> | <b>8,19</b>  |



**Figure 2.9. :** Courbe de croissance de *Streptococcus pyogenes* à partir des données expérimentales,  $f(t) = \log_{10} (\text{UFC/ml})$ .

Bien que le temps de latence soit plus long que pour les staphylocoques, le germe a présenté une bonne croissance pendant ces cinq heures de suivi.

*b) Détermination des paramètres*

- ***Temps de génération***

Le temps de latence était de 68 minutes d'après la courbe de la figure (2.5. a, annexe).

$$\mathbf{G = 52 \text{ min}}$$

- ***Taux de croissance***

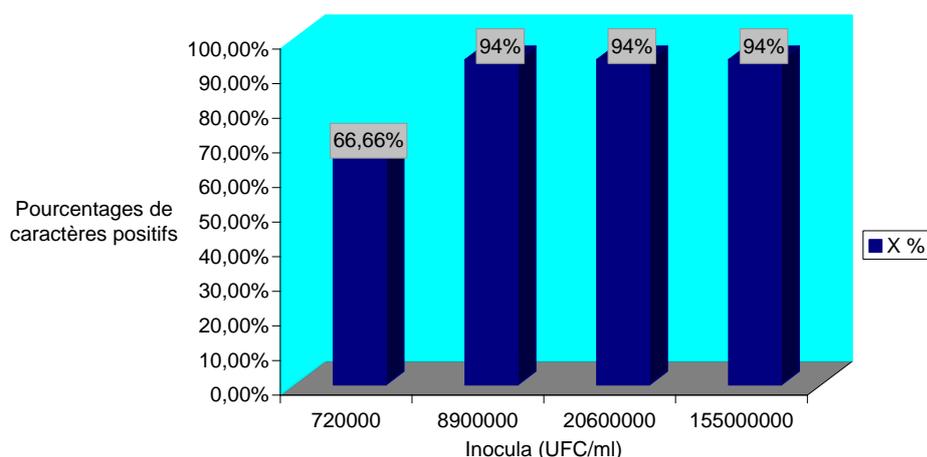
$$\mathbf{\mu = 0,013 \text{ min}^{-1}}$$

## c) Résultats des galeries micro -CSB Strepto

**Tableau XX** : Concordance des caractères biochimiques en fonction de l'inoculum de *Streptococcus pyogenes*.

| Temps<br>Inocula<br>Tests | 120                | 180                | 240                 | 300                 | Caractères<br>d'identificationn<br>de <i>Streptococcus<br/>pyogenes</i> |
|---------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---|
|                           | 7,210 <sup>5</sup> | 8,910 <sup>6</sup> | 2,0610 <sup>7</sup> | 1,5510 <sup>8</sup> |   |
| ADH                       | -                  | +                  | +                   | +                   | +   |
| BHS                       | -                  | -                  | -                   | -                   | -   |
| ESC                       | -                  | -                  | -                   | -                   | -   |
| VP                        | -                  | -                  | -                   | -                   | -   |
| AMD                       | +                  | +                  | +                   | +                   | d   |
| ARA                       | -                  | -                  | -                   | -                   | -   |
| GLY                       | -                  | -                  | -                   | -                   | -   |
| TRE                       | +                  | +                  | +                   | +                   | +   |
| SOS                       | +                  | -                  | -                   | -                   | -   |
| SOR                       | -                  | -                  | -                   | -                   | -   |
| RIB                       | +                  | +                  | +                   | +                   | -   |
| RAF                       | +                  | -                  | -                   | -                   | -   |
| MAN                       | -                  | -                  | -                   | -                   | -   |
| LAC                       | +                  | +                  | +                   | +                   | +   |
| INU                       | +                  | -                  | -                   | -                   | -   |
| <b>Concordance<br/>%</b>  | <b>66,6%</b>       | <b>94%</b>         | <b>94%</b>          | <b>94%</b>          | <b>100%</b>   |

**Légende** : Temps en heures,  
 Inocula en UFC/ml,  
 (+) = caractère positif,  
 (-) = caractère négatif,  
 (d) = caractère variable.



**Figure 2.10. : Pourcentages de concordance des caractères d'identification de *Streptococcus pyogenes* en fonction de l'inoculum.**

Nous avons noté que l'identification était correcte avec un inoculum de  $8,9 \times 10^6$  UFC/ml et plus (à partir de 180 minutes) avec un seul caractère discordant qui était la fermentation du ribose. En raison de la faible taille de l'inoculum, les résultats étaient ininterprétables en dessous de 180 minutes.

#### 2.1.6. Conclusion

Le temps que mettaient les germes pour croître de manière significative (temps de latence) différaient de peu au sein du même genre : 30 min pour *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus haemolyticus*, 45 min pour *Staphylococcus epidermidis* et 38 min pour *Staphylococcus saprophyticus* ; par contre il peut grandement varier d'un genre à l'autre : 68 min pour *Streptococcus pyogenes*.

Concernant l'identification par la microméthode, elle était quasiment possible pour les quatre espèces de staphylocoque à partir de 2 heures ainsi qu'à partir de 3 heures d'incubation pour les streptocoques correspondant généralement à un inoculum de  $10^6$  UFC/ml (en milieu de phase exponentielle). A partir de cet inoculum, la majorité des caractères biochimiques (secondaires et indispensables) étaient vérifiés sur toutes les espèces étudiées.

Les résultats de nos expériences ont montré qu'une identification acceptable voir très bonne était possible avec des inocula plus faibles en l'occurrence de  $10^6$  UFC/ml.

**Remarque** : Tous les tests à l' ONPG se sont avérés négatifs même pour les espèces chez qui la  $\beta$  galactosidase est positive, et ce pour tous les tests d'identification des staphylocoques effectués au sein du labo.

## 2.2 MODELISATION ET PREDICTION DE LA CROISSANCE DANS LE TEMPS

### 2.2.1. *Staphylococcus aureus*

#### a) Modélisation

Nous avons choisi d'utiliser un modèle de croissance exponentiel ajusté sur le logarithme de la densité bactérienne  $X(t) = \log(N(t))$  avec temps de latence pour décrire l'évolution de la densité bactérienne  $N$  au cours du temps :

$$\begin{cases} t < lag, X(t) = X_0 \\ t \geq lag, X(t) = X_0 + \frac{\mu (t - lag)}{\ln 10} \end{cases} \quad (\text{II.1})$$

$X_0$  : densité bactérienne initiale,

lag : temps de latence,

$\mu$  : taux de croissance spécifique ici constant.

Il s'agit d'une équation différentielle sans phase de freinage. Le choix de ce modèle a été guidé par un souci de simplicité et de minimisation du nombre de paramètres à ajuster. Lors de la prédiction d'un temps de seuil de densité microbienne par exemple, à partir de quelques mesures précoces de la croissance bactérienne, l'ajustement de ce modèle aux données nécessite l'estimation de seulement deux paramètres, dès lors que  $X_0$  est fixé à la valeur du premier point de la courbe de croissance correspondant à l'inoculum.

Des études effectuées par DELIGNETTE Marie (8) ont montré une corrélation biologique nette entre les deux paramètres  $\mu$  et lag ; le taux de croissance  $\mu$  semblant être inversement proportionnel au temps de latence lag. Ceci implique une proportionnalité entre le temps de génération ( $T_g = \ln 2/\mu$ ) et le temps de latence. Ce qui a abouti à l'application de la loi de distribution de  $K = \ln(\mu \times lag)$ .

Pour utiliser l'information biologique sur  $K = \ln(\mu \times \text{lag})$ , (distribution *a posteriori*) comme aide à la prédiction, le modèle a été reparamétré :

$$\begin{cases} t < \exp(K)/\mu, X(t) = X_0 \\ t \geq \exp(K)/\mu, X(t) = X_0 + \frac{\mu t - \exp(K)}{\ln 10} \end{cases} \quad (\text{II.2})$$

### b) Prédiction par la théorie de Bayes

La prédiction consiste à utiliser la technique d'inférence bayésienne avec une densité *a priori* informative sur  $K$ .

Nous supposons que les paramètres de la loi *a priori* de  $K$  sont connus et égaux à la moyenne et à la variance de trois valeurs de  $K$  obtenus sur trois autres courbes de croissance de *S. aureus* réalisées dans d'autres conditions.

A partir de l'hypothèse de normalité sur les résidus des  $n$  points d'observations et connaissant la valeur de  $\theta$  ( $\mu, K$ ), la formule devient :

$$p(\mu, K, \sigma | X) \propto \frac{1}{\sigma^{n+1}} \exp \left[ -\frac{S(\mu, K)}{2\sigma^2} \right] \exp \left[ -\frac{1}{2} \left[ \frac{K - m_K}{\sigma_K} \right]^2 \right] \quad (\text{II.3})$$

Où  $S(\mu, K)$  représente la somme des carrés des écarts.

$m_K$  : moyenne des valeurs de  $K$

$\sigma_K$  : écart type de  $K$

$\sigma_K^2$  : variance de  $K$

En intégrant cette densité *a posteriori* par rapport à  $\sigma$ , on obtient la densité *a posteriori* marginale des paramètres :

$$p(\mu, K | X) \propto S(\mu, K)^{-\frac{n}{2}} \exp \left[ -\frac{1}{2} \left[ \frac{K - m_K}{\sigma_K} \right]^2 \right] \quad (\text{II.4})$$

Une estimation des paramètres peut être obtenue par maximisation de cette densité *a posteriori*, ce qui revient à une minimisation de la fonction objectif:

$$O(\mu, K) = \frac{(K - m_K)}{2\sigma_K} + \frac{n}{2} \ln(S(\mu, K)) \quad (\text{II.5})$$

**Remarque:** Dans le chapitre 4.3.3. des généralités, il a été dit que lorsque le nombre de points de mesure devient grand, l'estimation des paramètres se résume à minimiser  $S(\theta)$ , ici  $S(\mu, K)$ .

Ainsi minimiser  $S(\mu, K)$  revient à tracer la droite de régression qui est donc la droite qui minimise la somme des carrés des écarts entre les valeurs observées et les valeurs théoriques (des résidus). Il s'agit de la droite la plus représentative du lien entre les deux variables ( $\mu$  et  $K$ ). Elle est aussi appelée droite des moindres carrés.

Il est alors possible de trouver "a" et "b" pour une droite  $y = a + b x$  telle que l'on obtient :

$$\begin{aligned} & \min_{a, b, \mu} \sum (a + b X_i - Y_i)^2 \\ \Rightarrow & b = \frac{N \sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{N \sum X^2 - (\sum X)^2} \\ & \text{et} \\ & a = \frac{\sum Y}{N} - b \frac{\sum X}{N} \end{aligned}$$

N: nombre de paires (X,Y)

Dans notre étude, nous avons considéré :

$$\begin{aligned} X &= \mu, \\ Y &= K \end{aligned}$$

Les trois valeurs de  $\mu$  ayant servi à minimiser  $S(\mu, K)$  furent :

$$\begin{aligned} \mu_1 &= 0,015, & \text{et } K &= -0,287 \\ \mu_2 &= 0,018, & \text{et } K &= -0,279 \\ \mu_3 &= 0,022, & \text{et } K &= -0,415 \end{aligned}$$

D'après les applications numériques faites des formules ci –dessus, nous obtenons :

$$\min S(\mu, K) = 0,01$$

$$m_K = - 0,327$$

$$\sigma_K^2 = 1,5 \cdot 10^{-5}$$

Les paramètres  $m_K$  et  $\sigma_K$  caractérisant l'information *a priori* sur  $K$  estimés, nous pouvons en déduire les nouvelles valeurs de  $\mu$  et de  $K$  qui furent :

|  |
|--|
| <b>K = - 0,313</b>                               |
| <b><math>\mu = 0,024 \text{ min}^{-1}</math></b> |

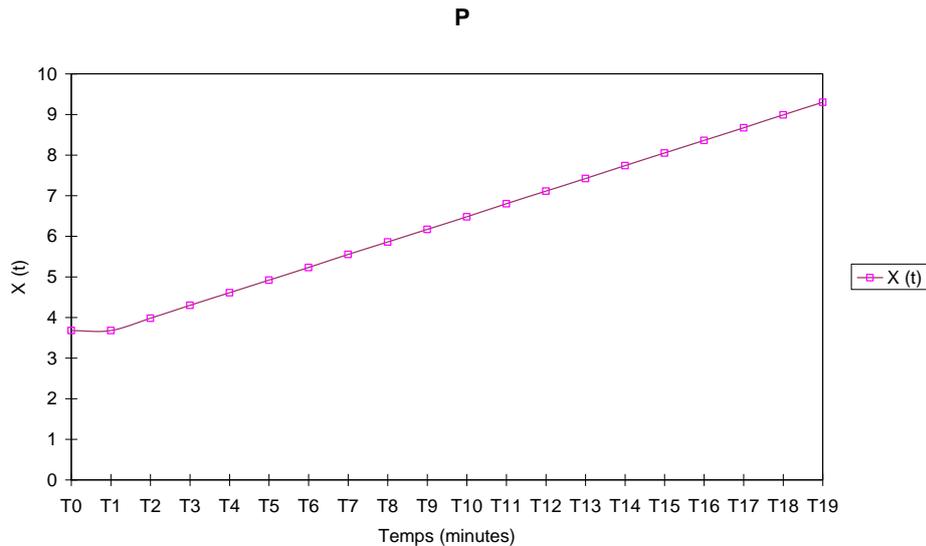
Ces valeurs sont utilisées pour prédire la courbe de croissance de *S. aureus* à partir de ses premiers points par la méthode d'inférence bayésienne (IB). La prédiction est réalisée dès l'obtention d'un point de mesure dépassant le doublement de l'inoculum.

**Tableau XXI : Points prédits par la méthode d'inférence bayésienne**

|                    |             |             |             |            |             |             |             |             |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Temps (min)</b> | <b>0</b>    | <b>30</b>   | <b>60</b>   | <b>90</b>  | <b>120</b>  | <b>150</b>  | <b>180</b>  | <b>210</b>  |
| <b>X (t)</b>       | <b>3,68</b> | <b>3,68</b> | <b>3,98</b> | <b>4,3</b> | <b>4,61</b> | <b>4,92</b> | <b>5,23</b> | <b>5,55</b> |

|                    |             |             |             |            |             |             |             |             |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Temps (min)</b> | <b>240</b>  | <b>270</b>  | <b>300</b>  | <b>330</b> | <b>360</b>  | <b>390</b>  | <b>420</b>  | <b>450</b>  |
| <b>X(t)</b>        | <b>5,86</b> | <b>6,17</b> | <b>6,48</b> | <b>6,8</b> | <b>7,11</b> | <b>7,42</b> | <b>7,74</b> | <b>8,05</b> |

|                    |             |             |             |            |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| <b>Temps (min)</b> | <b>480</b>  | <b>510</b>  | <b>540</b>  | <b>570</b> |
| <b>X(t)</b>        | <b>8,36</b> | <b>8,67</b> | <b>8,99</b> | <b>9,3</b> |



**Figure 2.11. : Courbe de *Staphylococcus aureus* prédite selon Bayes.**

La courbe de la figure (2.11) montre une bonne prédiction. Les valeurs de  $\mu$  et de  $K$  ont varié après ajustement avec une augmentation de  $\mu$  de l'ordre de  $2 \cdot 10^{-3}$  unités et également de  $K$  de l'ordre de  $-0,1$  unité.

La pente de la courbe ajustée est plus forte.

*c) Calcul du temps de seuil*

La valeur de l'inoculum est donnée par le dénombrement sur les boîtes initiales, il était de  $4,8 \cdot 10^3$  UFC/ml. Pour notre étude nous avons choisi de fixer le seuil de densité identifiable  $X_s$  à  $10^6$  UFC/ml soit une multiplication par 1000 de la population de départ. A partir des paramètres du modèle estimés, le temps  $T_s$  de seuil de densité microbienne identifiable a pu être calculé par la relation suivante :

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

$$T_s = 270 \text{ min}$$

### 2.2.2. *Staphylococcus epidermidis*

#### a) *Modélisation de la croissance*

Le même modèle exponentiel est utilisé avec la constante K :

$$\mathbf{K = - 0,328}$$

#### b) *Prédiction*

Le même raisonnement que précédemment est appliqué pour cette souche. Les applications numériques des formules ont donné les résultats suivants :

$$\begin{aligned} \mu_1 &= 0,012, & \text{et } K &= - 0,551 \\ \mu_2 &= 0,016, & \text{et } K &= - 0,328 \\ \mu_3 &= 0,020, & \text{et } K &= - 0,356 \end{aligned}$$

$$\min S(\mu, K) = 0,04$$

$$m_K = - 0,41$$

$$\sigma_K^2 = 9,08 \cdot 10^{-5}$$

Les nouvelles valeurs des paramètres  $\mu$  et  $K$  estimés étaient :

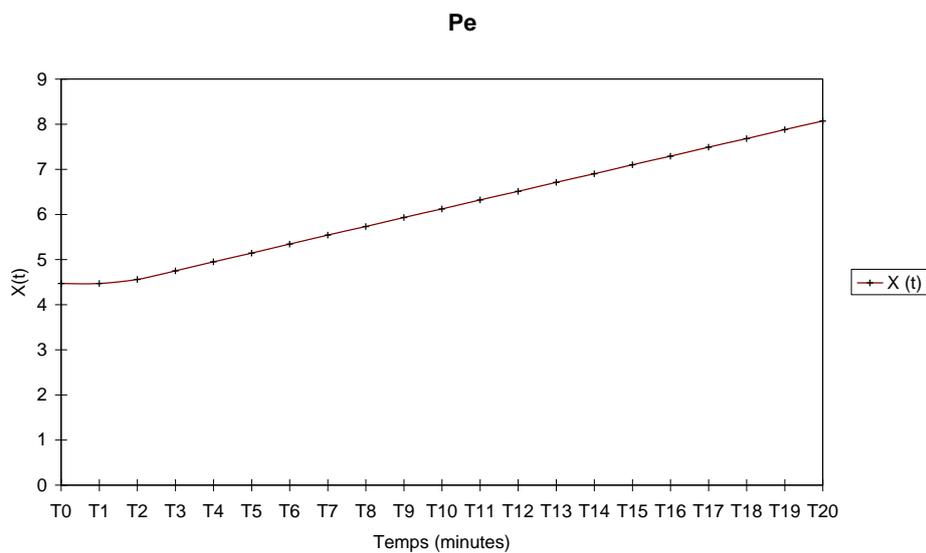
|  |
|--|
| <b>K = - 0,381</b>                               |
| <b><math>\mu = 0,015 \text{ min}^{-1}</math></b> |

**Tableau XXII: Points prédits par la méthode d'inférence bayésienne**

| <b>Temps<br/>(min)</b> | <b>0</b>    | <b>30</b>   | <b>60</b>   | <b>90</b>   | <b>120</b>  | <b>150</b>  | <b>180</b>  | <b>210</b>  |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>X(t)</b>            | <b>4,47</b> | <b>4,47</b> | <b>4,56</b> | <b>4,76</b> | <b>4,95</b> | <b>5,15</b> | <b>5,34</b> | <b>5,54</b> |

|                    |             |             |             |             |             |             |             |            |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| <b>Temps (min)</b> | <b>240</b>  | <b>270</b>  | <b>300</b>  | <b>330</b>  | <b>360</b>  | <b>390</b>  | <b>420</b>  | <b>450</b> |
| <b>X(t)</b>        | <b>5,73</b> | <b>5,93</b> | <b>6,12</b> | <b>6,32</b> | <b>6,51</b> | <b>6,71</b> | <b>6,91</b> | <b>7,1</b> |

|                    |            |             |             |             |             |
|--------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Temps (min)</b> | <b>480</b> | <b>510</b>  | <b>540</b>  | <b>570</b>  | <b>600</b>  |
| <b>X(t)</b>        | <b>7,3</b> | <b>7,49</b> | <b>7,69</b> | <b>7,88</b> | <b>8,08</b> |



**Figure 2.12. : Courbe de *Staphylococcus epidermidis* prédite selon Bayes.**

Contrairement au premier exemple, l'ajustement du modèle a conduit à une légère diminution de  $\mu$ , pareil pour la constante K.

Comme nous l'avons remarqué sur la figure (2.12), la pente de la courbe est plus petite.

La durée de la phase exponentielle est plus longue après ajustement des paramètres du modèle.

*c) Calcul du temps de seuil*

A partir des paramètres estimés et d'un inoculum de départ de  $2,9710^4$ UFC/ml, le temps de seuil était de :

$$\mathbf{T_s = 298 \text{ min}}$$

*2.2.3. Staphylococcus saprophyticus*

*a) Modélisation de la croissance*

Le modèle de croissance exponentiel utilisé pour les espèces précédentes, est également appliqué à cette souche pour la prédiction.

$$\mathbf{K = - 0,785}$$

*b) Prédiction*

Nous avons utilisé les mêmes formules que précédemment, pour des valeurs de:

$$\begin{array}{ll} \mu_1 = 0,012, & \text{et } K = - 0,785 \\ \mu_2 = 0,015, & \text{et } K = - 0,393 \\ \mu_3 = 0,021, & \text{et } K = - 0,307 \end{array}$$

Les résultats étaient les suivants :

$$\min S(\mu, K) = 0,152$$

$$m_K = - 0,49$$

$$\sigma_K^2 = 7,48 \cdot 10^{-4}$$

L'estimation des paramètres a conduit aux résultats suivants :

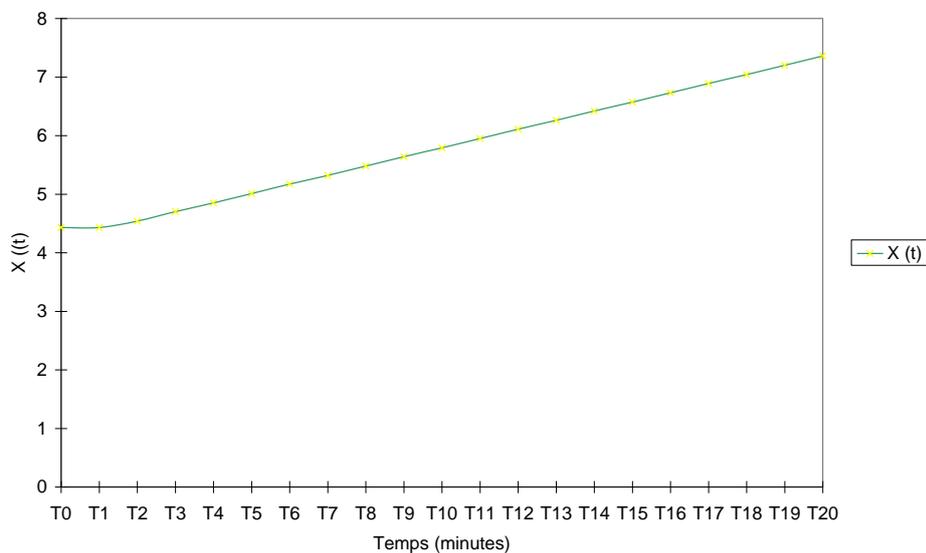
|   |
|---|
| $\mathbf{K = - 0,387}$                  |
| $\mathbf{\mu = 0,017 \text{ min}^{-1}}$ |

**Tableau XXIII: Points prédits par la méthode d'inférence bayésienne**

|                    |             |             |             |            |             |             |             |             |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Temps (min)</b> | <b>0</b>    | <b>30</b>   | <b>60</b>   | <b>90</b>  | <b>120</b>  | <b>150</b>  | <b>180</b>  | <b>210</b>  |
| <b>X(t)</b>        | <b>4,43</b> | <b>4,43</b> | <b>4,58</b> | <b>4,8</b> | <b>5,02</b> | <b>5,24</b> | <b>5,46</b> | <b>5,69</b> |

|                    |             |             |             |             |             |             |             |             |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Temps (min)</b> | <b>240</b>  | <b>270</b>  | <b>300</b>  | <b>330</b>  | <b>360</b>  | <b>390</b>  | <b>420</b>  | <b>450</b>  |
| <b>X(t)</b>        | <b>5,91</b> | <b>6,13</b> | <b>6,35</b> | <b>6,57</b> | <b>6,79</b> | <b>7,01</b> | <b>7,24</b> | <b>7,46</b> |

|                    |             |            |             |             |             |
|--------------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Temps (min)</b> | <b>480</b>  | <b>510</b> | <b>540</b>  | <b>570</b>  | <b>600</b>  |
| <b>X(t)</b>        | <b>7,68</b> | <b>7,9</b> | <b>8,12</b> | <b>8,34</b> | <b>8,56</b> |

**Figure 2.13. : Courbe de *Staphylococcus saprophyticus* prédite selon Bayes.**

Le même constat fait pour *S. aureus* concernant la variation des paramètres  $\mu$  et  $K$  est fait pour *S. saprophyticus* par rapport aux paramètres initiaux, mais la variation était plus significative.

*c) Calcul du temps de seuil*

A partir des paramètres estimés et d'un inoculum de départ de  $2,710^4$ UFC/ml, le temps de seuil est de :

$$\mathbf{T_s = 269 \text{ min}}$$

*2.2.4. Staphylococcus haemolyticus*

*a) Modélisation*

Les paramètres initiaux déterminés à partir de la courbe expérimentale ont servi à calculer la constante K et à adapter le modèle exponentiel.

$$\mathbf{K = - 0,867}$$

*b) Prédiction*

Les données ayant servi à prédire la croissance de cette espèce étaient :

$$\begin{array}{ll} \mu_1 = 0,012, & \text{et } K = - 0,616 \\ \mu_2 = 0,014, & \text{et } K = - 0,867 \\ \mu_3 = 0,015, & \text{et } K = - 0,393 \end{array}$$

Les résultats étaient les suivants :

$$\min S(\mu, K) = 0,14$$

$$m_K = - 0,625$$

$$\sigma_K^2 = 7,03 \cdot 10^{-5}$$

Les paramètres estimés par l'inférence de Bayes étaient donc:

|   |
|---|
| $\mathbf{K = - 0,536}$                  |
| $\mathbf{\mu = 0,019 \text{ min}^{-1}}$ |

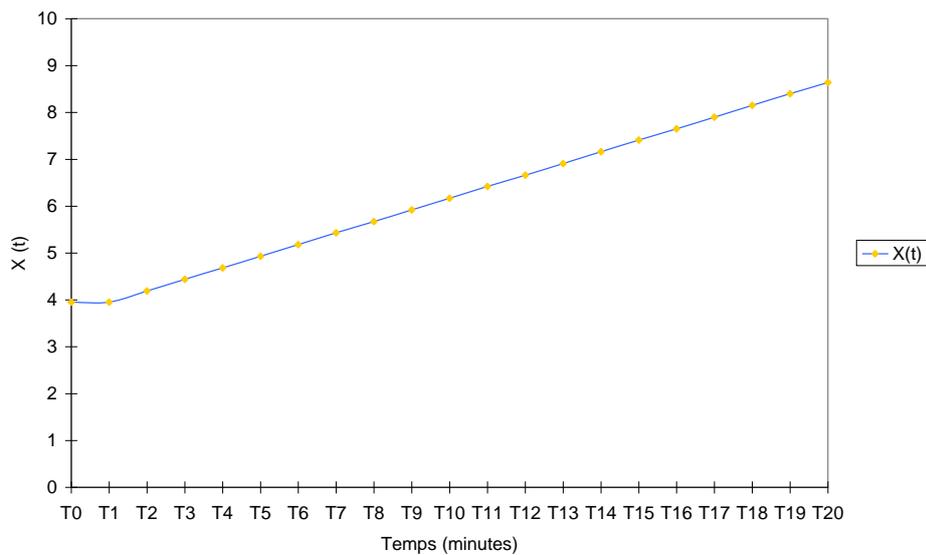
**Tableau XXIV: Points prédits par la méthode d'inférence bayésienne**

|                    |             |             |             |             |             |             |             |             |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Temps (min)</b> | <b>0</b>    | <b>30</b>   | <b>60</b>   | <b>90</b>   | <b>120</b>  | <b>150</b>  | <b>180</b>  | <b>210</b>  |
| <b>X(t)</b>        | <b>3,95</b> | <b>3,95</b> | <b>4,19</b> | <b>4,44</b> | <b>4,68</b> | <b>4,93</b> | <b>5,18</b> | <b>5,43</b> |

|                    |             |             |             |             |             |             |             |             |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Temps (min)</b> | <b>240</b>  | <b>270</b>  | <b>300</b>  | <b>330</b>  | <b>360</b>  | <b>390</b>  | <b>420</b>  | <b>450</b>  |
| <b>X(t)</b>        | <b>5,67</b> | <b>5,92</b> | <b>6,17</b> | <b>6,42</b> | <b>6,66</b> | <b>6,91</b> | <b>7,16</b> | <b>7,41</b> |

|                    |             |            |             |            |             |
|--------------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|
| <b>Temps (min)</b> | <b>480</b>  | <b>510</b> | <b>540</b>  | <b>570</b> | <b>600</b>  |
| <b>X(t)</b>        | <b>7,65</b> | <b>7,9</b> | <b>8,15</b> | <b>8,4</b> | <b>8,64</b> |

Le taux de croissance a augmenté de même que la constante K, la pente de la droite est donc plus forte.

**Figure 2.14. : Courbe de *Staphylococcus haemolyticus* prédite selon Bayes.**

c) *Calcul du temps de seuil*

A partir des paramètres estimés et d'un inoculum de départ de  $910^3$ UFC/ml, le temps de seuil était de :

$$\mathbf{T_s = 299 \text{ min}}$$

2.2.4. *Streptococcus pyogenes*

a) *Modélisation*

A l'instar des staphylocoques, le modèle exponentiel simplifié est également utilisé pour les streptocoques :

$$\begin{cases} t < \exp(K)/\mu, X(t) = X_0 \\ t \geq \exp(K)/\mu, X(t) = X_0 + \frac{\mu t - \exp(K)}{\ln 10} \end{cases}$$

avec  $\mathbf{K = - 0,123}$

b) *Prédiction*

L'estimation des paramètres en vue de la prédiction est effectuée de la même manière que pour les staphylocoques c'est-à-dire à partir de trois exemples de croissance de *Streptococcus pyogenes*.

Les paramètres de ces courbes étaient les suivants :

$$\begin{array}{ll} \mu_1 = 0,011, & \text{et } K = - 0,01 \\ \mu_2 = 0,013, & \text{et } K = - 0,123 \\ \mu_3 = 0,015, & \text{et } K = - 0,248 \end{array}$$

$$\min S(\mu, K) = 2,47 \cdot 10^{-5}$$

$$m_K = - 0,127$$

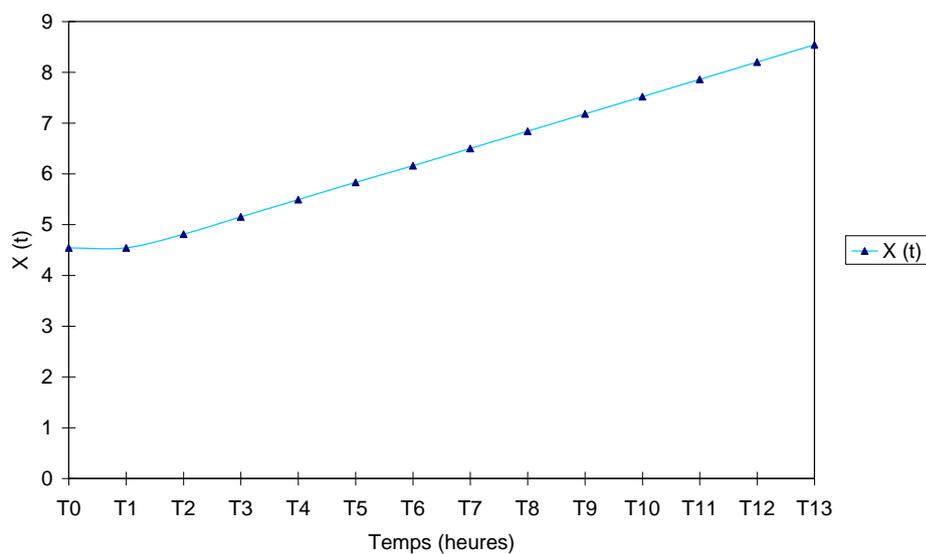
Les résultats de l'estimation étaient les suivants :

|   |
|---|
| $\mathbf{K = - 0,074}$                  |
| $\mathbf{\mu = 0,013 \text{ min}^{-1}}$ |

**Tableau XXV: Points prédits par la méthode d'inférence bayésienne**

|                    |             |             |             |             |             |             |             |            |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| <b>Temps (min)</b> | <b>0</b>    | <b>60</b>   | <b>120</b>  | <b>180</b>  | <b>240</b>  | <b>300</b>  | <b>360</b>  | <b>420</b> |
| <b>X(t)</b>        | <b>4,54</b> | <b>4,54</b> | <b>4,81</b> | <b>5,15</b> | <b>5,49</b> | <b>5,83</b> | <b>6,16</b> | <b>6,5</b> |

|                    |             |             |             |             |            |             |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|
| <b>Temps (min)</b> | <b>480</b>  | <b>540</b>  | <b>600</b>  | <b>660</b>  | <b>720</b> | <b>780</b>  |
| <b>X(t)</b>        | <b>6,84</b> | <b>7,18</b> | <b>7,52</b> | <b>7,86</b> | <b>8,2</b> | <b>8,54</b> |

**Figure 2.15. : Courbe de croissance de *Streptococcus pyogenes* prédite selon le modèle bayésien.**

Le taux de croissance après ajustement selon la technique de l'inférence bayésienne n'a pas changé, alors que la constante K est plus grande.

*c) Calcul du temps de seuil*

A partir des paramètres estimés, le temps de seuil était de :

$$T_s = 358 \text{ min}$$

### 2.2.5. Conclusion

En général nous pouvons dire que la modélisation a permis une meilleure appréciation de la cinétique de croissance de ces bactéries en vue de la prédiction. Le modèle bayésien a offert une plus grande précision, plus proche de la réalité pour toutes les espèces étudiées. Les prédictions ont été réalisées sur des souches de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus* et *Streptococcus pyogenes* à partir de tous les premiers points expérimentaux et d'une information *a priori* sur K extraite de trois exemples de courbes de croissance pour chaque souche.

Ces figures ont montré que lorsque l'on disposait de très peu de points de mesure, la méthode IB donnait une courbe de croissance assez proche des points expérimentaux observés après la prédiction. Et qu'avec la détermination du temps de seuil de densité microbienne permettant une bonne identification, les manipulations visant à l'identification de ces bactéries pourraient être allégées.

### **III. DISCUSSION**

#### **3.1 LES SOUCHES BACTERIENNES**

Notre travail ayant porté sur des souches préalablement identifiées puis conservées, il nous fallait nous assurer qu'il s'agissait bien des espèces à étudier, d'où l'intérêt de l'identification sommaire que nous avons effectuée. Ceci nous a permis d'éviter les erreurs d'interprétation dans la partie biométrique.

Le délai entre l'identification et l'étude biométrique devait être aussi court que possible pour éviter les méfaits d'une conservation peu appréciable. Ainsi tout risque de souillure était à éviter pour ne pas observer une croissance certes, mais pas celle de la bactérie étudiée. Cet aspect de la recherche nous a causé quelques désagréments.

#### **3.2. ETUDE DE LA CROISSANCE PAR LA METHODE DU DENOMBREMENT SUR BOÎTES DE PETRI**

Les difficultés rencontrées dans cette étape étaient, pour chaque souche, de trouver la dilution convenable du bouillon avant d'incorporer l'inoculum à de la gélose MH ou avant étalement sur de la gélose au sang, pour le dénombrement sur boîtes de Pétri. Nous nous faisons aider d'un spectrophotomètre et d'un densitomètre pour déterminer la turbidité de l'inoculum à chaque instant.

La mesure de la densité optique (turbidimétrie) aurait pu permettre de définir les cinétiques de croissance de ces bactéries. Mais compte tenu de la meilleure précision qu'offre le dénombrement des cellules viables, il nous a semblé plus approprié de l'utiliser pour la technique d'inférence bayésienne.

Par souci de minimisation des erreurs, il est courant d'utiliser la transformation logarithmique des modèles. Cela répond à une demande de simplification (le modèle linéaire étant mieux maîtrisé dans la communauté scientifique) mais dans le cas de dénombrements sur boîtes de Pétri, la justification statistique est pertinente. En effet, plus la suspension bactérienne est diluée avant étalement, plus l'erreur associée au dénombrement est élevée. Au cours d'une croissance, cette erreur augmente donc et la transformation logarithmique permet de réduire l'hétéroscédasticité des observations. (6)

#### **3.3 LA RECHERCHE DE L'EFFET DE L' INOCULUM**

Les galeries d'identification Micro-CSB Staph et Micro-CSB Strepto ont été validées par les études de stabilité, d'efficacité, et de reproductibilité avant leur utilisation.

### 3.3.1. Les staphylocoques

► Les différences notées sur les cinétiques de croissance des quatre espèces de staphylocoques témoignent des différences de caractéristiques intrinsèques propres à chaque espèce, bien qu'appartenant au même genre. De ces quatre espèces, cultivées presque dans les mêmes conditions, *Staphylococcus aureus* a présenté une croissance rapide.

Ainsi, sur les 15 caractères retenus, seuls 2 étaient nécessaires au diagnostic du genre : le glucose et le glycérol, et les 13 autres au diagnostic d'espèce : tréhalose, mannitol, xylose, saccharose, mannose, lactose, raffinose, urée, ODC, ONPG et le Voges Proskauer. Cependant, 2 caractères ne sont pas directement impliqués dans l'identification, ce sont l'ADH et le nitrate.

Ce constat rejoint le choix de Kloos et Lambe (1, 23) pour l'identification des espèces staphylococciques les plus couramment rencontrées en pathologie clinique. L'ADH ne figure pas dans le schéma d'identification simplifié, car il n'a pas été réellement jugé nécessaire.

► Aux inocula de  $10^4$  à  $10^5$  UFC/ml (entre 60 et 90 minutes, le plus souvent), nous observons les mêmes concordances entre 60 et 70% à l'exception de *Staphylococcus saprophyticus* qui présente à  $7,5 \cdot 10^5$  UFC/ml une bonne concordance de 94% (concordance : pourcentage de caractères justes).

Généralement à  $10^6$  UFC/ml correspondant aux temps 120 minutes pour *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, et 150 minutes pour *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus haemolyticus*, la concordance est bonne : 87 à 94% (soit 1 ou 2 caractères discordants).

► Pour toutes les espèces de staphylocoques et à tous les inocula, le test à la  $\beta$  Gal est négatif.

La  $\beta$  Gal est une enzyme inductible et le test se réalise en deux temps. Il faut d'abord une induction de l'enzyme par du lactose, ce qui va permettre à l'enzyme d'agir sur le substrat pour donner l'ortho-nitro-phénol. Des études antérieures ont montré que pour favoriser l'élution des disques, il fallait les immerger dans une solution de lactose de 10%.

Une des raisons qui pourrait expliquer la négativité du test à l'ONPG serait l'absence de lactose dans les milieux de culture (du genre Kligler Hajna ou Chapman lactosé).

Une autre raison est que les faibles volumes de substrats peuvent empêcher une expression métabolique suffisante en compétition avec une éventuelle lyse bactérienne.

► Deux autres caractères sont également négatifs pour 3 espèces :

- Pour *Staphylococcus aureus* : GLY et URE à tous les inocula,
- Pour *Staphylococcus epidermidis* : GLY et URE à tous les inocula sauf à  $2,7 \times 10^6$  UFC/ml,
- Pour *Staphylococcus saprophyticus* : URE à  $7,8 \times 10^4$  et à  $1,04 \times 10^5$  UFC/ ml.

Cette négativité de l'URE qui est une enzyme inductible, pourrait être attribuée au temps d'incubation de la galerie court par rapport aux inocula.

► Nous remarquons également que pour certaines espèces, le pourcentage de concordance diminue alors que la taille de l'inoculum augmente :

- *Staphylococcus epidermidis* : 80% à  $7,3 \times 10^7$  UFC/ml,
- *Staphylococcus haemolyticus* : 80% à  $3,4 \times 10^6$  UFC/ml.

Dans le premier exemple, c'est le GLY qui devient positif à  $2,7 \times 10^6$  UFC/ml alors qu'il est négatif pour tous les autres inocula.

Dans le second exemple c'est le RAF positif pour tous les autres résultats acceptables qui devient négatif. Dans ces deux exemples nous notons que les caractères discordants à l'origine de la perturbation sont l'assimilation des sucres. Ce qui rend compte de l'instabilité des sucres avec cette microméthode.

Sur les 300 caractères retenus, 236 concordent avec une bonne identification des staphylocoques soit 78,7%, et 64 caractères sont discordants soit 21,3%. Parmi ces derniers seuls 6 sont indispensables à une bonne identification des staphylocoques soit seulement 9,3%.

**Tableau XXVI : Caractères secondaires (.) et indispensables (X) à l'identification des espèces staphylococciques étudiées (30)**

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

### 3.3.2. Les streptocoques

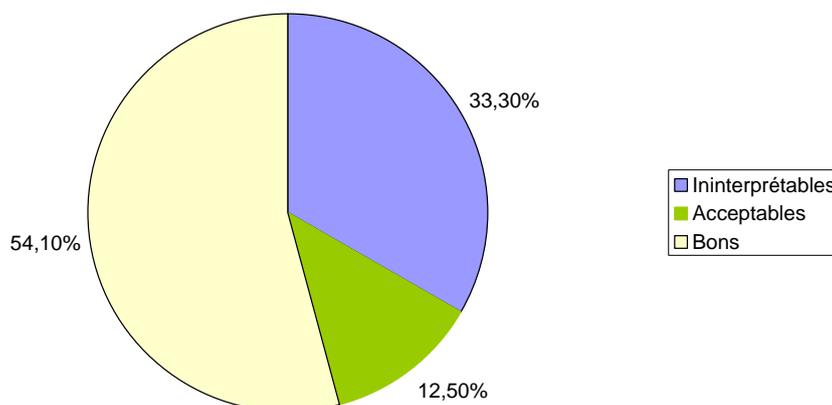
A  $10^6$  UFC/ml correspondant à 180 minutes, nous observons également une bonne concordance de 94%. Sur les 60 caractères étudiés 51 concordent avec une bonne identification soit 85%, et 9 sont discordants soit 15%.

L'instabilité des sucres est également notée pour *Streptococcus pyogenes* avec le ribose discordant pour tous les inocula. Comme pour les staphylocoques, les mêmes conclusions à savoir la faiblesse de l'inoculum ou un temps d'incubation assez court par rapport à l'inoculum peuvent être tirées.

**EN RESUME :**

L'inoculum bactérien constitue un élément important dans l'identification biochimique avec la microméthode car, elle utilise de très faibles quantités de substrats. Une forte concentration de l'inoculum entraîne leur épuisement rapide, tandis qu'une faible concentration de l'inoculum entraîne un temps de virage très long de l'indicateur coloré. C'est ce qui est en général l'origine de la majorité des discordances observées.

Sur les 24 tests réalisés pour toutes les espèces confondues, voici ci-dessous la distribution de la concordance des caractères.



**Figure 3.1. Diagramme de distribution de la concordance des caractères pour tous les tests.**

**Légende :** 8 résultats ininterprétables soit 33,3%,  
3 résultats acceptables soit 12,5%,  
13 bons résultats soit 54,1%.

En outre sur les 360 caractères étudiés seuls 72 sont discordants soit 20%.

En somme, partant du problème posé au départ à savoir le manque de standardisation de l'inoculum de la microméthode, nous avons montré que la biométrie nous permettrait de nous départir de la bonne vieille méthode qui consistait à préparer une suspension bactérienne dense à partir de colonies isolées sur boîtes de 24 heures.

Une telle étude effectuée pendant une durée plus longue, par exemple 5 à 6 heures, permettrait certainement d'aboutir à un inoculum adéquat et précis pour chaque type de galerie.

De plus avec cette nouvelle approche il ne sera plus nécessaire d'attendre 24 heures pour ensemer une galerie Micro-CSB Staph et Micro-CSB Strepto. Il suffirait de disposer de colonies bien isolées et d'un bouillon de culture adéquat.

Par ailleurs, des études antérieures (30) ont montré dans le cadre de la validation de cette microméthode pour les staphylocoques, qu'une suspension bactérienne de turbidité égale à 1 McFarland donnait de très bons résultats au bout de 16 heures d'incubation de la galerie, tandis qu'avec 0,5 McFarland l'incubation devait durer 24 heures.

Cet aspect de l'identification ouvre d'autres alternatives à savoir la recherche de l'effet du temps d'incubation de la galerie Micro-CSB en fonction de l'inoculum.

### 3.4. LA PREDICTION

La méthode IB proposée par DELIGNETTE (8) a été appliquée sur 4 courbes de croissance de staphylocoques : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus haemolyticus*; puis sur une courbe de croissance de *Streptococcus pyogenes*.

Trois exemples de courbes de croissance réalisées dans d'autres conditions ont permis d'estimer les paramètres  $m_K$  et  $\sigma_K$ . Ces valeurs ont été utilisées pour prédire les cinétiques de croissance de ces espèces.

Les figures de prédiction montrent que même lorsque nous disposons de très peu de points de mesure, la méthode IB donne une courbe de croissance assez proche des points expérimentaux observés.

Le même projet de recherche a fait l'objet d'une comparaison de cette méthode d'ajustement d'inférence bayésienne à d'autres méthodes MC1 et MC2 (MC : moindre carré ou régression linéaire). La méthode IB est apparue plus robuste vis-à-vis de la précision de l'information *a priori* informative sur K que la méthode MC1 (8). Avec son exemple d'application sur *Listeria monocytogenes*, l'étude a montré l'intérêt de la méthode dans le cas d'une prédiction précoce, c'est-à-dire lorsque les méthodes classiques d'ajustement (régression linéaire) ne permettent pas d'avoir un résultat suffisant.

Le temps de seuil de densité microbienne identifiable prédit donne une meilleure appréciation du moment à partir duquel l'identification des cocci par la microméthode CSB est correcte. Ce temps compris dans la phase exponentielle, coïncide pour toutes les espèces à un inoculum de  $10^6$  UFC/ml.

En pratique, chaque problème de prédiction de la croissance microbienne présente ses propres difficultés et exigences. Plus nous disposons d'outils sur un problème donné, plus nous avons de chance de tirer le meilleur parti des données en tenant compte des contraintes extérieures (temporelles et économiques) (8). En fait c'est la principale difficulté que nous avons rencontrée dans cette partie de notre travail. Aucun des logiciels mathématiques ayant servi à ces chercheurs de valider ces méthodes n'étaient à notre disposition. Notre travail a été purement manuel.

## CONCLUSION

La place des cocci à Gram positif en pathologie humaine n'est plus à démontrer.

Les staphylocoques sont des commensaux ubiquitaires de la peau et des muqueuses et sont aussi responsables d'infections sévères locales ou systémiques. *Streptococcus pyogenes* quant à lui est fréquemment isolé des infections de la sphère ORL et cutanées.

L'identification de ces germes au laboratoire ne constitue plus un problème. En effet diverses galeries d'identification dont la rapidité et l'efficacité ne sont plus à démontrer, sont retrouvées dans le commerce.

Cependant le coût de la plupart de ces galeries est inaccessible à une frange de la population qui est notamment la plus exposée aux infections causées par ces germes.

C'est dans ce contexte qu'ont été mises au point au laboratoire de Bactériologie-virologie de l'Hôpital Aristide le Dantec depuis quelques années, les galeries Micro-CSB, de moindre coût, d'efficacité garantie pour l'identification de nombreuses bactéries, mais dont l'inoculum n'est pas bien standardisé.

Afin de contribuer à l'amélioration des conditions d'utilisation de ces galeries, nous avons proposé une technique de recherche des différentes concentrations bactériennes sur l'identification des cocci à Gram positif avec les microméthodes Staph et Strepto, par le biais de l'étude de la cinétique de croissance.

Cette étude a eu lieu à Dakar entre Octobre 2006 et Juin 2007. Elle a porté sur 4 souches de staphylocoques :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213,
- *Staphylococcus epidermidis*,
- *Staphylococcus saprophyticus*,
- *Staphylococcus haemolyticus*,

et une souche de streptocoque : *Streptococcus pyogenes*.

Avec un inoculum de  $10^6$  UFC/ml, les staphylocoques sont déjà bien identifiés avec une concordance de 87 à 94 %.

Quant à *Streptococcus pyogenes*, il est également bien identifié à un inoculum de  $10^6$  UFC/ml correspondant à 94% de caractères positifs.

Néanmoins l'étude n'est pas exhaustive car nous n'avons pas atteint un inoculum donnant une excellente identification et donc une concordance de 100%, ce qui est imputable au temps de suivi assez court.

La prédiction du temps de seuil de densité microbienne capable d'être correctement identifiée par la méthode d'inférence bayésienne devrait permettre d'alléger les manipulations nécessaires à l'étude de la croissance des bactéries dans des conditions bien définies, et d'accélérer ainsi leur identification au laboratoire. Nous avons proposé ce travail comme aide à la prise de décision en microbiologie médicale. Il serait intéressant de tester encore la méthode sur des données en plus grand nombre en vue d'une application pratique bien définie. Il est important de bien connaître les capacités prédictives et les limites d'utilisation des méthodes de prédiction, car il en va de la santé du patient.

Mais ce travail n'est que le début d'une longue série de recherches plus approfondies qui visera :

- à parfaire notre travail en déterminant avec une plus grande précision l'inoculum approprié à une excellente identification des cocci à Gram positif par les Micro-CSB Staph et Micro-CSB Strepto ;
- à déterminer le temps d'incubation des galeries Micro CSB Staph et Micro-CSB Strepto avec de pareils inocula.
- à faire le même travail pour les autres galeries : Micro-CSB : Entéro., Bactéries à Gram Négatif Non Fermentaires, Bactéries à Gram Négatif, Myco., et autres.
- et peut être à déterminer le moment de la production de toxines de certaines espèces (entérotoxines, SLO, SLD...) en vue d'étudier leur métabolisme d'action.

- 1- ALDRIGE 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 isolate of Coagulase-Negative Staphylococci.  
*J. Clini. Microbiol* 1983;17(3):516-520.
  
- 2- Pr AVRIL Jean-Loup – Pr Henry DABERNAT  
Pr François DENIS – Pr Henry MONTEIL  
*Bacteriol. Clinique 3<sup>e</sup> édition, 2000;(1, 2):6-39.*
  
- 3- BAJARD Sandrine  
Modélisation à visée prévisionnelle de la cinétique de croissance d'une Population de *Listeria monocytogenes*  
*Thèse Lyon n° 312, 1996.*
  
- 4- BREAND Sophie  
Etude biométrique de la réponse d'une population bactérienne à une variation défavorable de température ou de pH.  
*Thèse Lyon n°089, 1998.*
  
- 5- Dr Christian  
Croissance et Nutrition bactériennes.  
*DEA 2005-2006.*
  
- 6- CORNU Marie  
Dynamique des populations bactériennes en culture mixte  
*Thèse Lyon n°213, 2000.*
  
- 7- CORVAGLIA Anna R.  
Rôle des résidus d'antibiotiques dans les environnements hydriques sur la sélection et la diffusion de bactéries résistantes des genres *Aeromonas*, *Acinetobacter* et *Legionella*.  
*Thèse Dr ès sciences n° 3796, mention biologique 2006.*

- 8- DELIGNETTE Marie L.  
Méthodes de Prédiction des aptitudes de croissance des populations de micro-organismes.  
*Thèse Lyon n°118, 1995.*
  
- 9- Direction générale des produits de santé et des aliments.  
Dénombrement des espèces *Listeria* dans les échantillons Environnementaux au moyen des plaques de numération des bactéries *Listeria* présentes dans l'environnement PETRIFILMMC 3MMC.  
*MFLP-11, Septembre 2006:1-5.*
  
- 10- EYQUEM A., Alouf J., Montagnier L.  
Traité de Microbiologie clinique  
*3<sup>e</sup> mise à jour et complément 2003;60:3.*
  
- 11- FASQUELLE Robert  
Eléments de Bactériologie médicale.  
*7<sup>e</sup> édition, 1968:23-35.*
  
- 12- FERRON Azèle  
Bactériologie médicale  
*Editions C. et R. 1984;(3,14,15):3-2- 15-6.*
  
- 13- FLEURETTE J.  
Staphylocoques et Microcoques dans le MINOR L. VERON.  
*Bactério-Med. Flam Med. Sciences, 1<sup>er</sup> ed. 1982:773-792.*
  
- 14- FLEURETTE J.  
Staphylocoques et Microcoques dans le MINOR L. VERON.  
*Bactériologie médicale 2<sup>e</sup> tirage, 1984;30:509-526.*
  
- 15- FUJIKAWA H., Morozumi S.  
Modelling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in Milk.  
*Food Microbiol. 2006 May;23(3):260-7. Epub 2005 Juin 17.*

- 16-** FUJIKAWA H, Yano K, Morozumi S, Kimura B, Fuji T.  
Development of a predictive program for microbial growth under various temperature conditions.  
*Food Microbiol.* 2006 Dec;47(6):288-92.
  
- 17-** GUILLIER L, Augustin JC.  
Modelling the individual cell lag time distributions of *Listeria monocytogenes* as a function of the physiological state and the growth conditions.  
*Food Microbiol.* 2006;111(3):241-51. Epub 2006 Jul.18.
  
- 18-** HORAUD T. (HORODNICEAU)  
Streptococcaceae.  
*Bactériologie médicale*, 1984;31:529-540.
  
- 19-** Hounkponou Edwige  
Etude comparée de l'identification et de la sensibilité de *Streptococcus Pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes* isolés d'infections humaines.  
*Thèse Pharm., Dakar, n° 42, 2003.*
  
- 20-** JAWETZ E., Melnick J. L., Adelberg E. A.  
The Growth, Survival, & Death of Micro-organisms.  
*Review of Medical Microbiology*, 1987;5:66-70.
  
- 21-** Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison  
Department of Bacteriology  
*Growth of Bacterial Populations, Rev. 2002:1-7.*
  
- 22-** KLOSS W. E., and BANNERMANT L.  
Update on clinical significance of Coagulase-negative Staphylococci.  
*J. Clin Microbiol, Rev.* 1994;7(1):117-140
  
- 23-** KLOSS W.E. and LAMBE JR. D. W.  
Staphylococcus.  
*In Manual of clinical Microbiology, 4<sup>th</sup> éd., 1981:222-235*

- 24-** KLOSS W. E. and WOLFSHOHL J. F.  
Identification of Staphylococcus species with the Api Staph Ident.  
System.  
*J. Clin Microbiol*, 1982;16(3):509-516
- 25-** KOSEKI S., Yamamoto K.  
Modelling the bacterial survival / death interface induced by high pressure  
processing.  
*Food Microbiol*. 2007 May 1;1116 (1):136-43.
- 26-** MAINIL J.  
*Bactériologie générale 3è candidature, 2004-2005:40-46.*
- 27-** MARCHAL N., BOUDON J.L., RICHARD C.L.  
Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des  
bactéries.  
*Doins Editeurs, 1987*
- 28-** Mc Meekin et al. 1992  
Predictive Microbiology : Theory and Application  
*International journal of food Microbiology, 1997 Oct.-Dec.:541-9.*
- 29-** Microbiologie prévisionnelle : Principaux modèles de croissance utilisés en  
appréciation quantitative des risques.  
*Epidemiolo. et santé anim.*, 2002;41:169-177.
- 30-** NDAO Khady  
Mise au point d'une microméthode d'identification biochimique des  
Staphylocoques.  
*Thèse Pharm., Dakar, n° 44,1999.*
- 31-** NNOCHIRI ENYINNAYA  
An Introduction to Medical Microbiology.  
*Medical Microbiology in the Tropics, 1975;1:10-15.*

- 32-** Norme marocaine PNMJSO 6222  
Qualité de l'eau – Dénombrement des micro-organismes revivifiants.  
Comptage des colonies par ensemencement dans un milieu de culture nutritif gélosé.  
*SNIMA 2006.*
- 33-** PILET C., Bourdon J.L, Toma, n. Marchal, Balbastre C.  
Bactériologie médicale et vétérinaire,  
*2<sup>e</sup> édition, 3<sup>e</sup> tirage 1983:41-67.*
- 34-** SARR T.  
Algorithme d'identification des Staphylocoques à coagulase négative et des Streptocoques non groupables.  
*Thèse Pharm., Dakar, n°27, 2004.*
- 35-** Standaert AR., François K., Devlieghere F., Debevere J., Van Impe JF.  
Geeraerd AH.  
Modelling individual cell lag time distributions for *Listeria monocytogenes*.  
*Risk Anal. 2007 Feb;27(1):241-554.*
- 36-** Standards Unit, Evaluation and Standards Laboratory Specialist and Reference Microbiology Division.  
Identification of *Staphylococcus* Species, *Micrococcus* Species and *Stomatococcus* Species .  
*BSOPID7 : 4-5.*
- 37-** VALERO A., Carrasco E., Perez-Rodriguez F., Garcia-Gimeno RM, Zwerá G.  
Modelling the growth of *Listeria monocytogenes* in pasteurized white asparagus.  
*J. Food Prot. 2007 March;70 (3):753-7.*
- 38-** VERON M.  
Croissance et nutrition bactériennes  
*Bactériologie médicale, 1984 ;2:22-28.*