

LISTE DES ABREVIATIONS

ADH : Arginine Dihydrolase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine Diphosphate

AMC: Acetyl-Méthyl-Carbinol

AMD: Amidon

API : Appareil et Procédé d'Identification

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adénosine Triphosphate

ARA: Arabinose

ARN: Acide Ribonucléique

BCP: Bromocrésol Pourpre

BGT: Bouillon Glucosé Tamponné

BHS : Bouillon Hypersalé

BTS : Bouillon Trypticase Soja

C: Cytosine

Cat: catalase

Coag: coagulase

CO₂: Dioxyde de Carbone

CSB: Conscience Scientifique pour le Bien-être / Cheikh Saad Bouh Boye

ESC: Esculine

Fig. : figure

G: Guanine

GLU: Glucose

GLY: Glycérol

GSO : Gélose au Sang Ordinaire

H : heure

INO: Inositol

INU: Inuline

JCM: Journal of Clinical Microbiology

KOH: Soude

LAC: Lactose

MALDI – TOF: matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry

MAN: Mannitol

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

MH: Mueller-Hinton

ml: Millilitre

mm: Millimètre

MNE: Mannose

NaCl : Chlorure de sodium

NAD: Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NIT: Nitrate

ODC: Ornithine Décarboxylase

OMA: Otites Moyennes Aigües

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

RAA: Rhumatisme Articulaire Aigü

RIB: Ribose

RM: Rouge de Méthyl

RP: Rouge de Phenol

S. : *Staphylococcus* ou *Streptococcus*

SAC: Saccharose

SCoN: Staphylocoque à Coagulase Négative

SNG: Streptocoque Non Groupable

SOR : Sorbitol

SOS : Sorbose

TDA: Tryptophane Désaminase

TDC: Témoin de décarboxylase

TRE : Tréhalose

UCAD : Université Cheikh Anta Diop

VP : Voges Proskauer

VP1 : alpha naphtol à 6%

VP2 : hydroxyde de potassium KOH à 40%

µg: Micro gramme

µl : Micro litre

µm : Micro mètre

α : Alfa

β : Bêta

Liste des figures

Figure 1 : Caractères morphologiques des staphylocoques (page 4)

Figure 2 : Différentes manières d'utilisation des glucides (page 6)

Figure 3 : Représentation graphique de la glycolyse (page 8)

Figure 4 : Voie d'Entner-Doudoroff (page 9)

Figure 5 : Voie des pentose-phosphates -en parallèle avec la glycolyse- (page 10)

Figure 6 : Mise en évidence de la production d'acétoïne (page 11)

Figure 7 : Mise en évidence de l'action de la β -galactosidase (page 11)

Figure 8 : Réaction de décarboxylation des acides aminés (page 12)

Figure 9 : Réactions d'hydrolyse de l'urée (page 12)

Figure 10 : Mise en évidence de la nitrate réductase (page 13)

Figure 11 : Arbre phylogénique des streptocoques basé sur la comparaison des séquences du gène codant l'ARN ribosomique 16S (page 17)

Figure 12 : caractères morphologiques des streptocoques (page 18)

Figure 13 : Représentation graphique de la fermentation homolactique (page 19)

Figure 14 : Réaction d'hydrolyse de l'esculine (page 20)

Figure 15 : Disposition des plaques d'identification micro-CSB (page 28)

Figure 16: Algorithme d'identification des principales espèces de SCoN (pages 47-48)

Figure 17 : Algorithme d'identification des principales espèces de streptocoques non groupables (page 49)

Liste des tableaux

Tableau I : Composition milieu urée – tryptophane (annexe 1)

Tableau II : Composition milieu Clark & Lubs (annexe 2)

Tableau III : Composition milieu Moeller : décarboxylases (annexe 3)

Tableau IV : Composition milieu nitrate (annexe 4)

Tableau V : Composition milieu ONPG (annexe 5)

Tableau VI : Composition milieu esculine (annexe 6)

Tableau VII : Composition milieu bouillon hypersalé (annexe 7)

Tableau VIII : Composition milieu MEVAG Staph/Strepto (annexe 8)

Tableau IX : Méthodes de stérilisation des sucres (annexe 9)

Tableau X : Souches de contrôle utilisées pour le test d'efficacité des microplaques CSB® (page 30)

Tableau XI : Lecture et Identification des caractères sur micro-galerie CSB Staph® (page 33)

Tableau XII : Lecture et Identification des caractères sur micro-galerie CSB Strepto® (page 34)

Tableau XIII : Profil bactériologique de la souche X1 probable S. aureus (page 40)

Tableau XIV : Probabilités d'appartenance de la souche X1aux espèces apparentées (page 40)

Tableau XV : Profil bactériologique de la souche X2 probable S. saprophyticus (page 41)

Tableau XVI : Probabilités d'appartenance de la souche X2 aux espèces apparentées (page 41)

Tableau XVII : Profil bactériologique de la souche X3 probable *S. pneumoniae* (page 42)

Tableau XVIII : Probabilités d'appartenance de la souche X3 aux espèces apparentées (page 42)

Tableau XIX : Profil bactériologique de la souche X4 probable *E. faecalis* (page 43)

Tableau XX : Probabilités d'appartenance de la souche X4 aux espèces apparentées (page 43)

Tableau XXI : Profil bactériologique de la souche X5 probable *S. pyogenes* (page 44)

Tableau XXII : probabilités d'appartenance de la souche X5 aux espèces apparentées (page 44)

Tableau XXIII: profil bactériologique de la souche X6 probable *S. agalactiae* (page 45)

Tableau XXIV : probabilités d'appartenance de la souche X6 aux espèces apparentées (page 45)

SOMMAIRE

Introduction	1
I. Généralités sur les staphylocoques	3
I.1. Phylogénie, taxonomie et classification	3
I.2. Caractères bactériologiques	4
I.2.1. Caractères morphologiques	4
I.2.2. Caractères culturaux	5
I.2.3. Caractères biochimiques	5
I.3. Habitat et pouvoir pathogène	14
II. Généralités sur les streptocoques	15
II.1. Phylogénie, taxonomie et classification	15
II.2. Caractères bactériologiques	17
II.2.1. Caractères morphologiques	17
II.2.2. Caractères culturaux	18
II.2.3. Caractères biochimiques	19
II.2.3.1. Utilisation des hydrates de carbone	19
II.3. Habitat et pouvoir pathogène	21
I. Cadre d'étude	23
II. Souches bactériennes	23
III. Matériel et réactifs	24
III.1. Matériel pour l'identification	24
III.2. Matériel pour la préparation de l'inoculum	24
III.3. Matériel pour la conservation des souches	25
III.4. Milieux pour l'isolement, l'enrichissement et la conservation des souches	25
III.5. Milieux pour l'identification	25
III.6. Réactifs pour l'identification des souches	26
IV. Méthodologie	26
IV.1. Réisolement et réidentification des souches bactériennes	26
IV.2. Préparation milieux de culture liquides	27

IV.2.1. Contrôle de qualité des milieux liquides	27
IV.2.2. Préparation et conditionnement des plaques déshydratées	28
IV.2.3. Contrôle de qualité des microplaques d'identification déshydratées	29
IV.3. Mode opératoire de l'étude sur les microplaques Micro-CSB®	31
IV.3.1. Préparation inoculum bactérien	31
IV.3.2. Ensemencement et incubation des microplaques	31
IV.4. Calcul des probabilités et élaboration des algorithmes des staphylocoques et des streptocoques.....	35
IV.5. Validation de la méthode	36
IV.5.1. La répétabilité	37
IV.5.2. la reproductibilité	37
V. RESULTATS	39
V.1. Identification de <i>S. aureus</i>	40
V.2. Identification de <i>S. saprophyticus</i>	41
V.3. Identification de <i>S. pneumoniae</i>	42
V.4. Identification d' <i>Enterococcus faecalis</i>	43
V.5. Identification de <i>S. pyogenes</i>	44
V.6. Identification de <i>Streptococcus agalactiae</i>	45
V.7. Les résultats de la réduction du délai de lecture des tests de VP et des décarboxylases	46
VI.DISCUSSION	50
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	59

INTRODUCTION

Les staphylocoques et les streptocoques sont des germes très fréquents dans le milieu hospitalier et sont souvent responsables d'infections graves ; démontrent souvent un haut niveau de résistance à divers antibiotiques [1,2 ,3].

Le diagnostic microbien et le traitement de ces infections imposent une identification correcte de l'agent étiologique en vue d'une bonne prise en charge thérapeutique des patients.

C'est ainsi que plusieurs méthodes d'identification telles que les galeries API, l'hybridation moléculaire de l'ADN et les automates ont vu le jour.

Depuis quelques années, l'identification des cocci à Gram positif au laboratoire est rendue plus aisée grâce à l'utilisation de ces méthodes d'identification rapides et fiables disponibles sur le marché. Néanmoins, leur coût reste élevé pour les populations déminées.

C'est pour cette raison qu'il a été mis au point la microméthode d'identification par microplaques (Micro-CSB®) à l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne de l'Université Cheikh Anta DIOP de Dakar. Il s'agit d'une méthode miniaturisée permettant la mise en évidence d'activités enzymatiques et de fermentations des sucres. Elle permet de recourir à l'identification des staphylocoques et des streptocoques afin de rendre le travail de routine plus rapide et plus sensible. L'avantage de cette méthode est son accessibilité dans les laboratoires des pays en développement du fait de son coût moins élevé.

Des études antérieures (SARR ; 2004 et SOW ; 2007) ont montré et validé l'efficacité et la fiabilité de ces galeries d'identification bactériennes (Micro-CSB®). Cependant, le temps d'incubation pour identifier les germes était assez long (12 heures) [4].

L'objectif de notre travail était l'optimisation et la validation de l'identification des staphylocoques et des streptocoques par la microméthode Micro-CSB® (de 12h à 6h) pour plus d'efficacité.

Les objectifs spécifiques de cette étude étaient :

- ✓ La détermination du temps minimum nécessaire à l'identification des staphylocoques et des streptocoques en fonction du substrat utilisé ;
- ✓ La validation des méthodes d'identification utilisées ;
- ✓ L'élaboration d'algorithmes d'identification.

Pour cela, nous avons ajouté du pyruvate dans divers milieux d'identification où le glucose est utilisé comme substrat.

PREMIERE PARTIE :

revue de la littérature

Les cocci à Gram positif sont des bactéries de forme sphérique, appartenant à la famille des micrococcaceae. Ces bactéries regroupent des germes pathogènes parmi lesquels, les staphylocoques et les streptocoques, responsables de plusieurs types d'infections [4].

I. Généralités sur les staphylocoques

I.1. Phylogénie, taxonomie et classification

Les staphylocoques, cocci à Gram positif [5], ont été découverts par : Koch, Pasteur, Ogston, Rosenbach [4].

Les staphylocoques appartiennent à la famille des micrococcaceae qui comprend quatre genres : *Micrococcus*, *Stomatococcus*, *Planococcus* et *Staphylococcus* [6].

La nouvelle classification exclut le genre *staphylococcus* de la famille [7] et distingue 36 espèces et 9 sous-espèces [8] selon les critères suivants :

- ✓ le taux d'hybridation ADN/ADN ;
- ✓ la stabilité des hybrides ;
- ✓ les caractères phénotypiques [9].

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

- ✓ groupe *S. epidermidis* ;
- ✓ groupe *S. saprophyticus* ;
- ✓ groupe *S. simulans* ;
- ✓ groupe *S. sciuri* ;
- ✓ groupe *S. hyicus* ;
- ✓ groupe *S. intermedius* [4]

Les staphylocoques peuvent être classés selon plusieurs caractères : biochimiques, antigéniques, pathogéniques, enzymatiques [9], etc., mais aussi

par le pourcentage (G+C) [10]. Il n'existe pas une classification unique universelle mais plusieurs classifications [11].

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

La classification de Kloos et Schleifer ne reconnaît que dix espèces dans le genre staphylocoque et avec 15% des espèces de staphylocoques non classées [12].

I.2. Caractères bactériologiques

I.2.1. Caractères morphologiques

Ce sont des cocci à Gram positif de 0,8 à 1 μm de diamètre, de forme sphéroïde isolés ou groupés en diplocoques, en courtes chaînettes ou en amas, ayant la forme de grappe de raisin. Ils sont immobiles, non sporulés mais parfois encapsulés [13, 14].

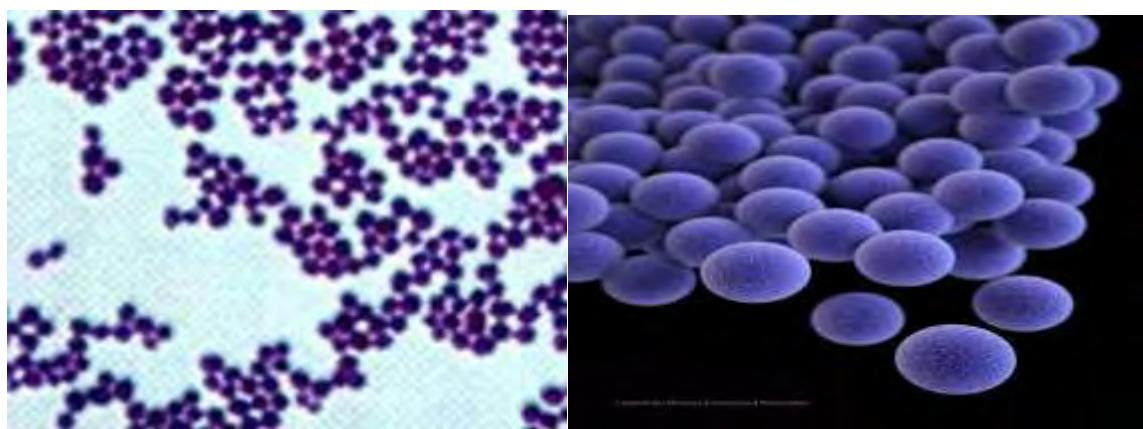


Figure 1 : Caractères morphologiques des staphylocoques
(www.tpehe.eklablog.com; site consulté le 22/03/2016)

I.2.2. Caractères culturaux

La culture des staphylocoques se fait dans une atmosphère aérobie et humide [15]. *Staphylococcus aureus* est un germe aéro-anaérobie facultatif. Il croît abondamment sur milieu gélosé ; sur milieux ordinaires, la culture est obtenue en 18 à 24h. *S. aureus* pousse en présence de fortes concentrations salines (milieu sélectif Chapman).

En bouillon ordinaire, les staphylocoques se multiplient en quelques heures, formant un trouble homogène ou un dépôt [10].

Sur gélose les colonies sont lisses, bombées, brillantes et régulières avec un diamètre de 1-3 mm [15].

La plupart des souches de *S. aureus* élaborent un pigment qui donne une couleur jaune-orangée aux colonies, les colonies de *staphylococcus epidermidis* donnent un pigment « blanc porcelaine » [16].

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

I.2.3. Caractères biochimiques

La détermination de l'espèce peut être réalisée à l'aide de galeries biochimiques d'identification. Ces systèmes utilisent des tests d'acidification ou d'assimilation des sucres et des tests enzymatiques [16].

I.2.3.1. Métabolisme glucidique

Le catabolisme glucidique correspond à la dégradation des molécules de glucose permettant la formation de molécules riches en énergie ou dans un but de synthèse de constituants cellulaires [17].

✓ Utilisation des hydrates de carbone

Les glucides sont utilisés de trois manières différentes par les staphylocoques : soit après conversion par l'action d'isomérasées, soit après hydrolyse en sucre simple, soit encore, directement s'ils sont fournis sous forme simple (glucose, fructose, etc.) (fig. 1).

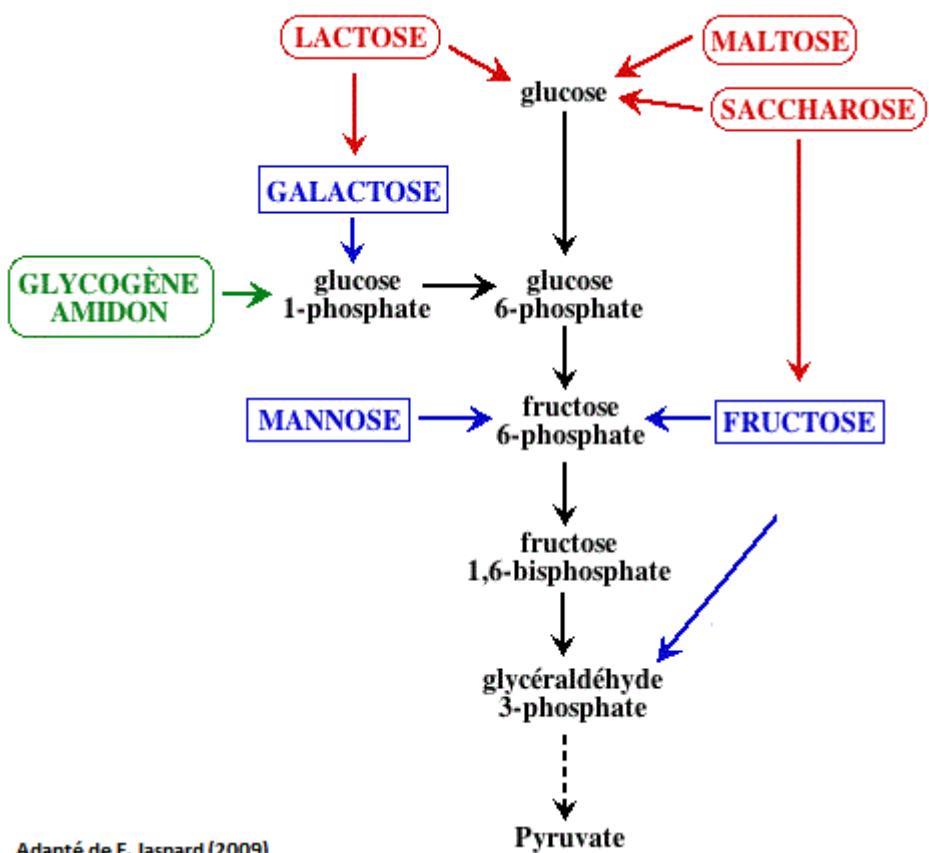


Figure 2: Différentes manières d'utilisation des glucides (<http://www.biochimej.univ-angers.fr>; site consulté le 19/11/2015)

L'assimilation étudiée par voie fermentaire, mais également par voie oxydative se traduit presque toujours par l'accumulation de dérivés acides quelle que soit la voie de dégradation. Ces acides sont responsables d'une variation de pH détectée par le virage de la coloration du milieu grâce à un indicateur coloré qui peut être le bromocrésol pourpre (BCP), le rouge de phénol (RP)[18].

Ils existent différentes voies de dégradation du glucide :

- La glycolyse (ou voie d'Embden-Meyerhof) : c'est la première chaîne du catabolisme des glucides, elle s'effectue en anaérobiose et aboutit à la formation du pyruvate et de molécules riches en énergie [17]. La glycolyse est la principale voie de dégradation du glucide (fig. 2).

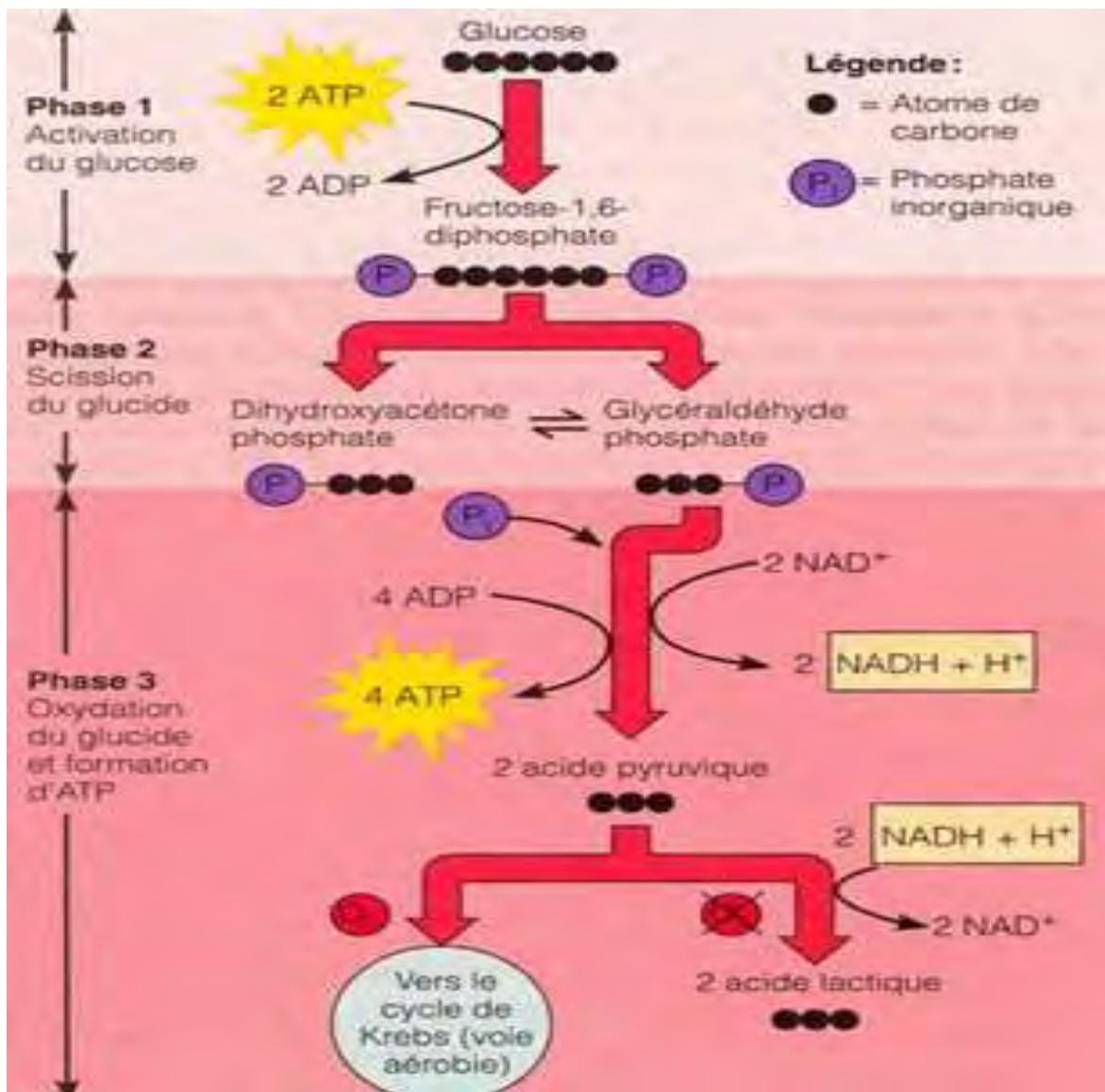


Figure 3: Représentation graphique de la glycolyse (<http://www.theses.ulaval.ca>; site consulté le 14/08/2015)

- La voie d'Entner-Douroroff : bien que la glycolyse soit la voie la plus commune pour la conversion des hexoses en pyruvate, la voie d'Entner-Douroroff joue un rôle similaire [19] (fig. 3).

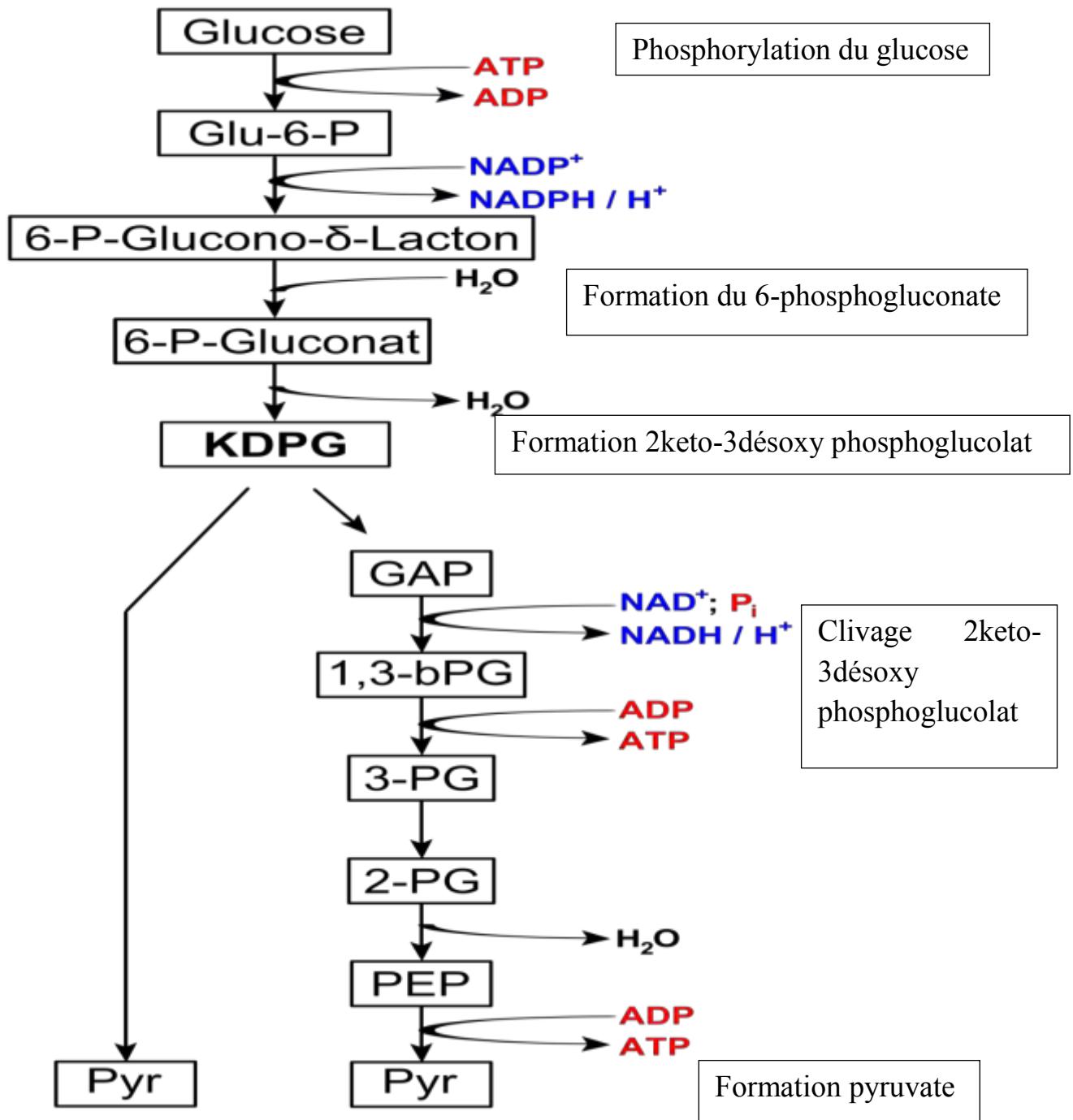


Figure 4: Voie d'Entner-Douroroff (<http://fr.wikipedia.org>; site consulté le 16/11/2015)

- La voie des pentoses-phosphates : La voie des pentoses-phosphates se réalise en parallèle à la glycolyse et permet la formation de pentose-phosphates indispensables à la biosynthèse d'acides nucléiques (ADN et

ARN) et la formation de NADPH, H^+ pour les réactions de biosynthèse [17] (fig. 4).

Embden-Meyerhof Pentoses phosphates

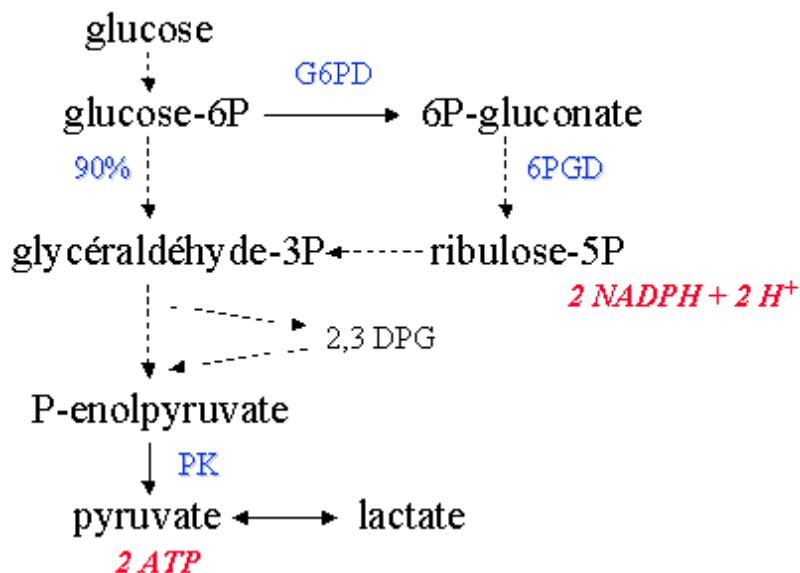


Figure 5: Voie des pentose-phosphates (en parallèle avec la glycolyse) (www.erasmeinfo.ulb.ac.be; site consulté le 19/11/2015)

✓ Recherche de la production d'acétoïne

L'acétoïne est un produit de dégradation du glucose au cours de la fermentation du 2-3 butylène glycolique en passant par l'acétolactate et le diacétyl. Elle peut également être obtenue par condensation de deux molécules de pyruvate [20].

En présence d'une base forte, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné (oxydation en diacétyl) [21] (fig. 5).

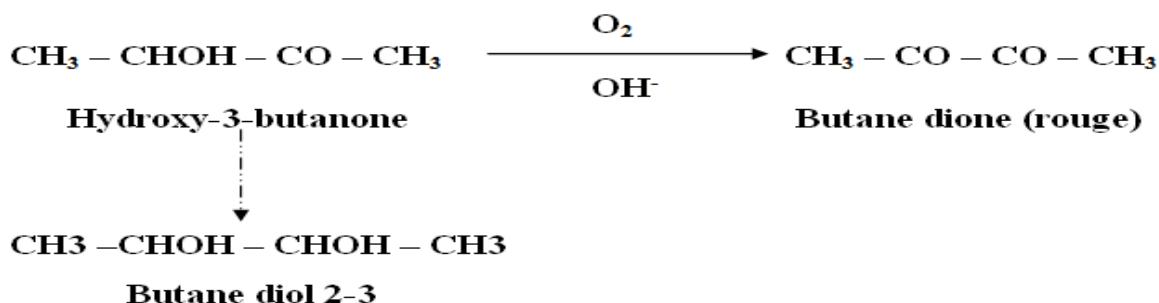


Figure 6 : Mise en évidence de la production d'acétoïne

✓ **Recherche de la production de la bêta-galactosidase [18, 22]**

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

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

L'ONPG, dérivé β -galactoside incolore, est scindé par des ONPG-hydrolases dont les β -galactosidases. Cette réaction libère de l'orthonitrophénol, composé soluble jaune, inductible de la réaction et une molécule de galactose [22] (fig. 6).

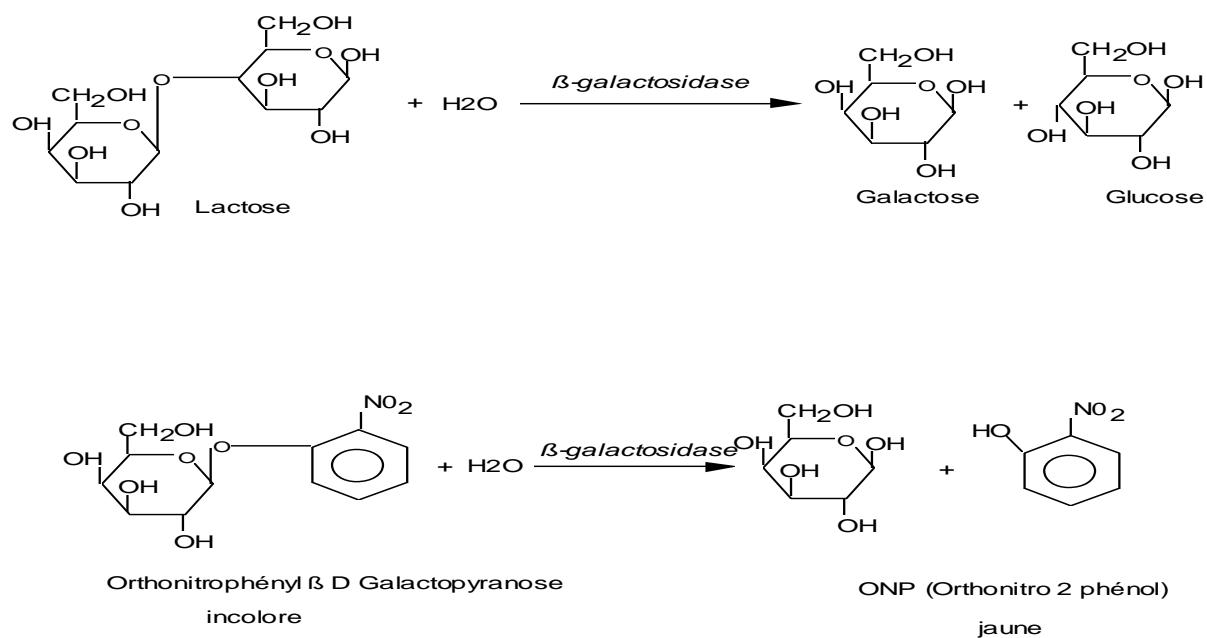


Figure 7 : Mise en évidence de l'action de la β -galactosidase

I.2.3.2. Métabolisme protidique

✓ Recherche de décarboxylases

Les décarboxylases sont des enzymes actives à pH acide. Le milieu d'étude sera donc acidifié par la fermentation du glucose puis réalcalinisé par l'action des décarboxylases sur le substrat qui est un acide aminé. Elles scindent les acides aminés au niveau du groupement carboxylique entraînant ainsi la formation de l'amine correspondante avec libération de dioxyde de carbone selon la réaction suivante [12, 23]: (fig. 7)

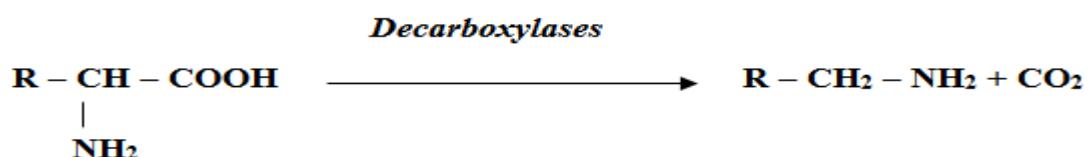


Figure 8 : Réaction de décarboxylation des acides aminés

✓ Recherche de l'uréase

L'uréase est une enzyme inducible et son action aboutit à la formation d'ions ammoniums [18], entraînant le virage du rouge de phénol du jaune au rose framboise [10] (fig. 8).

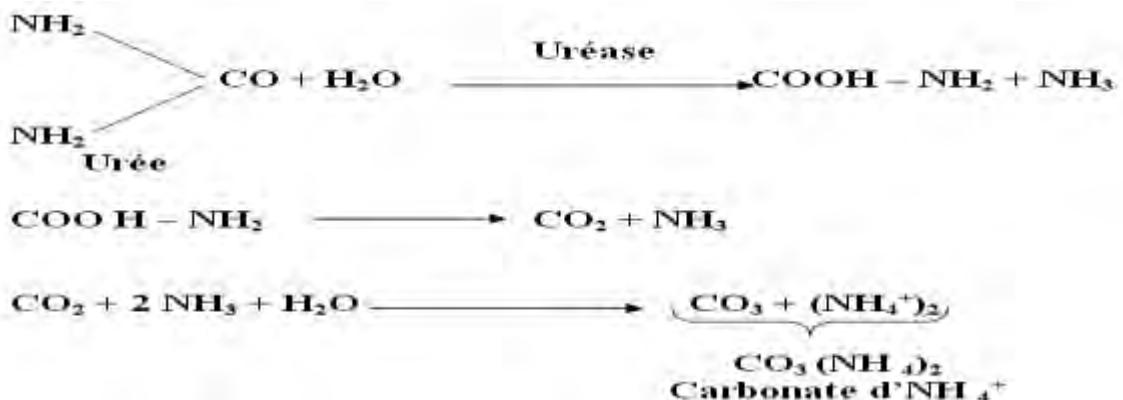


Figure 9 : Réactions d'hydrolyse de l'urée

I.2.3.3. Métabolisme respiratoire : production de la nitrate réductase

Les bactéries, lorsqu'elles possèdent une nitrate réductase, sont capables de transformer les nitrates (NO_3^-) en nitrites (NO_2^-) et éventuellement en azote (N_2) [24], donnant une coloration rouge en présence d'acide sulfanilique et d' α naphthylamine (Réaction de Griess) [25].

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

Staphylococcus aureus a un système respiratoire associé à la nitrate réductase, celle-ci utilise le L-lactate comme donneur d'hydrogène. L'essentiel de l'activité nitrate réductase utilisant le L-lactate a été localisée au niveau de la membrane plasmique où elle est souvent couplée à des déshydrogénases. Cependant, elle peut être rencontrée au niveau du cytoplasme [4] (fig. 9).

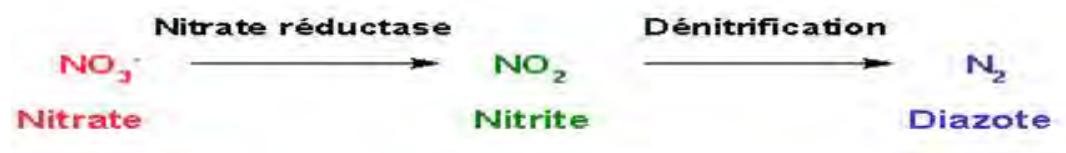


Figure 10 : Mise en évidence de la nitrate réductase

I.2.3.4. La résistance à la novobiocine

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

La novobiocine est un antibiotique bactériostatique peu utilisé en thérapie, pouvant s'avérer très actif sur les bactéries à Gram positif, en particulier les staphylocoques. Ce sont généralement les souches de *Staphylococcus*

saprophyticus, *Staphylococcus cohnii cohnii*, *Staphylococcus cohnii urealyticum* et *Staphylococcus xylosus* qui sont résistantes à la novobiocine [26].

I.3. Habitat et pouvoir pathogène

Le réservoir naturel des staphylocoques est l'homme et les animaux à sang chaud.

Cependant, éliminées dans le milieu extérieur, ces bactéries très résistantes sont fréquemment retrouvées dans l'environnement [16].

La plupart des staphylocoques sont inoffensifs et résident normalement sur la peau et les muqueuses de l'homme et d'autres organismes [27].

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

L'un des principaux défis du travail de diagnostic quotidien est donc d'identifier les espèces de staphylocoques [27].

Les SCoN peuvent contaminer les prélèvements [28] ; ils sont en règle générale des bactéries opportunistes essentiellement responsables d'infections nosocomiales [29]. Il est important de distinguer *S. aureus* des CoNS. *S. aureus* a un potentiel de pathogénicité très important et est responsable aussi bien d'infections nosocomiales que communautaires [30]. *S. aureus* est responsable d'infections suppuratives superficielles et profondes ainsi que de syndromes liés à l'action de toxines [16]. Il est devenu un problème majeur de santé publique en raison de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques [31].

II. Généralités sur les streptocoques

II.1. Phylogénie, taxonomie et classification

Les streptocoques appartiennent au phylum *Clostridia* et apparentés. Ce sont des bactéries de faible % en guanine et cytosine [15,32].

Les streptocoques ont été les premières espèces provoquant des maladies contagieuses à être étudiées [33].

En 1877, BILROTH et EHRLICH ont donné le nom de *Streptococcus* à des cocci formant des chaînettes, observées dans les blessures infectées [3]. D'autres savants tels que ANDREWES et HORDER, CLARKE, ABERCOMBRE, SCOTT, GUTHOF, se sont intéressés à d'autres espèces de streptocoques [26, 34].

Lancefield, en 1933 décrit les groupes sérologiques de A à F [35].

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

Les infections à streptocoques qui autrefois étaient considérées comme propres aux pays froids et humides sont maintenant fréquentes en zone tropicale particulièrement en Afrique de l'Ouest [36].

La famille des *Streptococcaceae* comprend 15 genres, parmi eux les *Streptococcus* et les *Enterococcus*, responsables d'infections graves [3].

Historiquement, la classification des streptocoques est basée sur leurs propriétés sérologiques de paroi décrit par Rebecca Lancefield. Il existe actuellement plus de 100 espèces de streptocoques connues et les classifications continuent d'évoluer [33].

Les streptocoques ne sont pas classés sur des critères cliniques ou de pathogénicité, car la plupart des espèces (commensales ou pathogènes) peuvent

être responsables d'infections occasionnant des tableaux cliniques très différents [37].

Ils peuvent être classés et identifiés d'après les 5 types de caractères suivants [38] :

- ✓ la morphologie et le groupement des cocci, la présence d'une capsule et l'aspect des colonies ;
- ✓ le type d'hémolyse produite sur gélose au sang : β -hémolyse, α -hémolyse ou absence d'hémolyse ;
- ✓ la présence ou non d'un antigène lié à un polysaccharide de paroi et spécifique de groupe ;

L'identification des espèces de streptocoques est traditionnellement fondée sur le groupement sérologique de Lancefield et sur les réactions hémolytiques [39].

Parmi les groupes antigéniques désignés par Rebecca Lancefield par des lettres (de A à H, et de K à V), les groupes A, B, C ou G caractérisent les espèces de streptocoques β -hémolytiques les plus pathogènes. Les streptocoques α -hémolytiques ou non hémolytiques appartiennent à d'autres groupes ou sont non-groupables, et sont habituellement commensaux.

- ✓ Un ensemble de caractères biochimiques ;

Quelques tests suffisent à compléter l'identification des espèces β -hémolytiques des groupes A, B, C ou G, et celle des pneumocoques. Une galerie complète de tests est nécessaire pour identifier les autres espèces.

- ✓ La sensibilité aux antibiotiques

La pénicilline G est active sur les streptocoques, mais à des degrés divers selon les espèces. Certaines souches de pneumocoques ont acquis une résistance relative aux pénicillines [38].

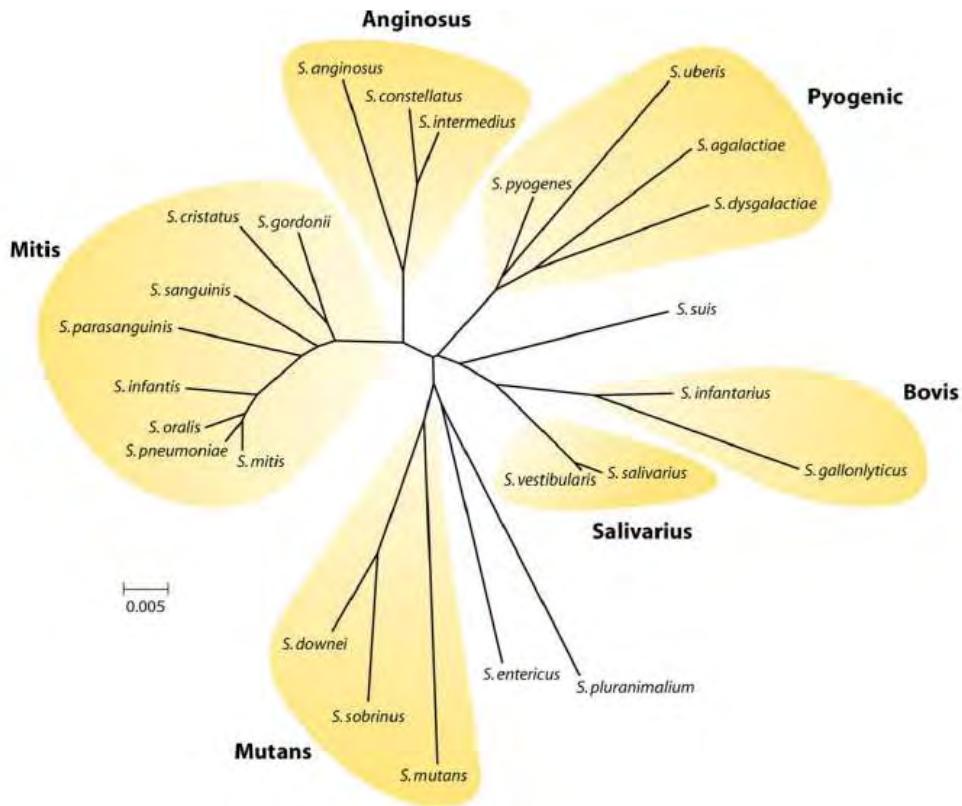


Figure 11 : Arbre phylogénique des streptocoques basé sur la comparaison des séquences du gène codant l'ARN ribosomique 16 S [33]

II.2. Caractères bactériologiques

Les streptocoques, cocci en chainettes, sont immobiles, dépourvus de catalase et d'oxydase. Ils sont positivement colorés au Gram [4]. La plupart des souches de streptocoques sont anaérobies aéro tolérants [32, 40], cependant, certaines sont anaérobies strictes [40]. Cependant certaines souches requièrent un milieu enrichi en CO₂ pour croître, alors que d'autres sont anaérobies strictes [4].

II.2.1. Caractères morphologiques

Les streptocoques se présentent sous forme de cocci à Gram positif ovoïdes, sphériques ou lancéolés de 0,5 à 1 mm de diamètre non mobiles et non sporulés.

Ils forment des paires (diplocoques : *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*) ou le plus souvent des chaînettes de longueur variable se présentant comme une suite de diplocoques liés par du matériel de la paroi cellulaire. Les streptocoques ne possèdent pas de capsule externe autour de la paroi, sauf chez les formes S (smooth) des pneumocoques, irrégulièrement et transitoirement (cultures jeunes) chez certaines souches des groupes A et C [26, 41, 42].

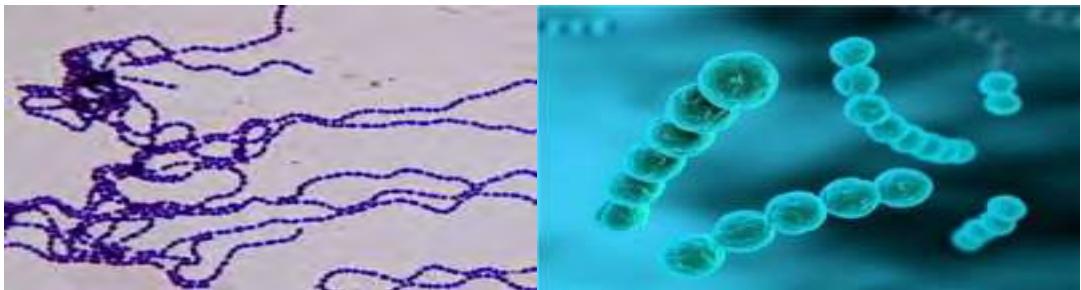


Figure 12 : Caractères morphologiques des streptocoques (www.geniebio.ac-aix-marseille.fr; www.revuedesante.com; site consulté le 22/03/2016)

II.2.2. Caractères culturaux

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

La température optimale de croissance est de 35 à 37°C [26]. La croissance est optimale en anaérobiose ou en présence de 10 % de CO₂.

Les entérocoques ont la particularité de se multiplier dans des milieux usuels à base de peptone ou en l'absence de facteurs de supplémentation et de croître aussi sur milieu hyper salé contenant 6,5 g/l de NaCl [34].

II.2.3. Caractères biochimiques

II.2.3.1. Utilisation des hydrates de carbones

L'acide pyruvique issu de la glycolyse sert d'accepteur d'électrons. Sous l'action de la lactate déshydrogénase, il est réduit en acide lactique par le NADH, H^+ dans l'étape glycéraldhyde-3-P/ 1, 3-bisphosphoglycerate. Les espèces des genres *Streptococcus* et *Enterococcus* réalisent cette voie homofermentaire [42] (fig. 11).

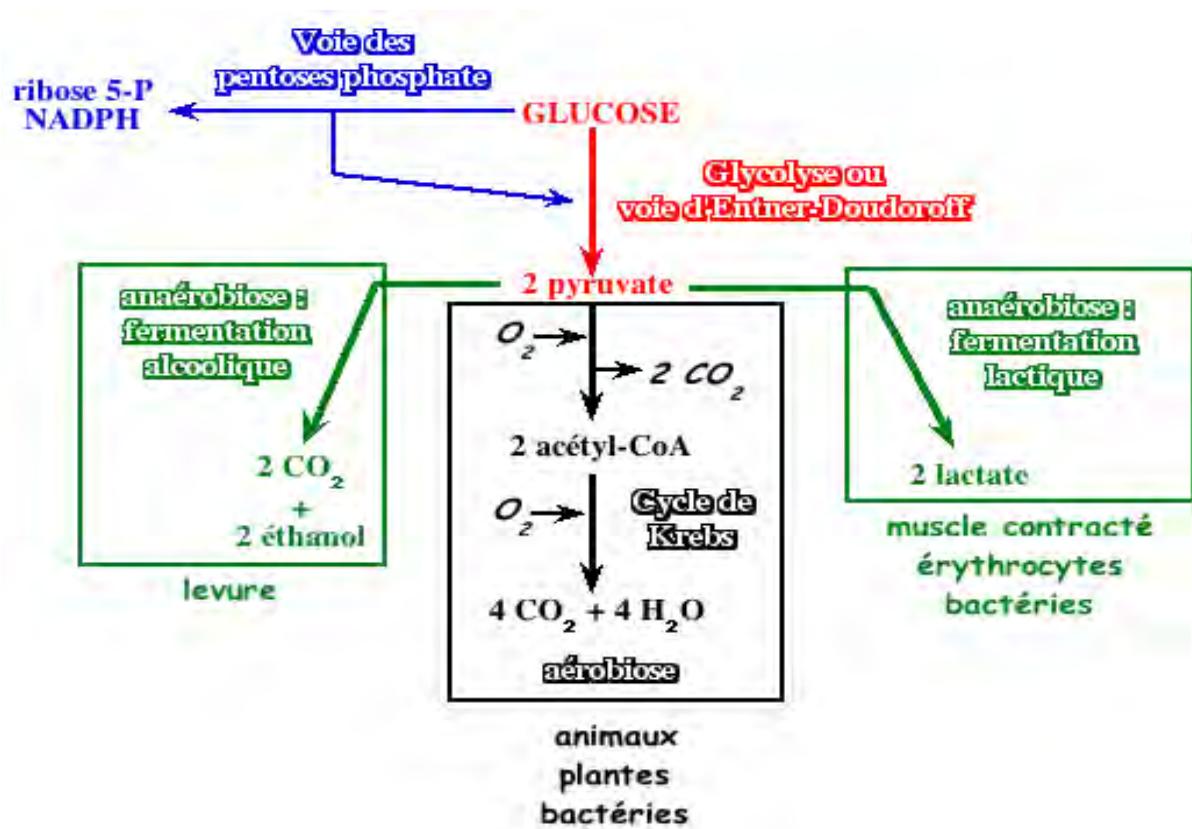


Figure 13 : représentation graphique de la fermentation homolactique
www.biochimej.univ-angers.fr; site consulté le 16/11/2015)

II.2.3.2. Hydrolyse de l'esculine

L'esculine est un glucoside dérivé de la coumarine (dioxycoumarine et glucose).

Les streptocoques du groupe D hydrolysent l'esculine en aglycone qui, en présence de sels de fer, donne une coloration noire [4].

Les entérocoques se différencient des autres streptocoques par leur capacité d'hydrolyser l'esculine [43] (fig. 12).

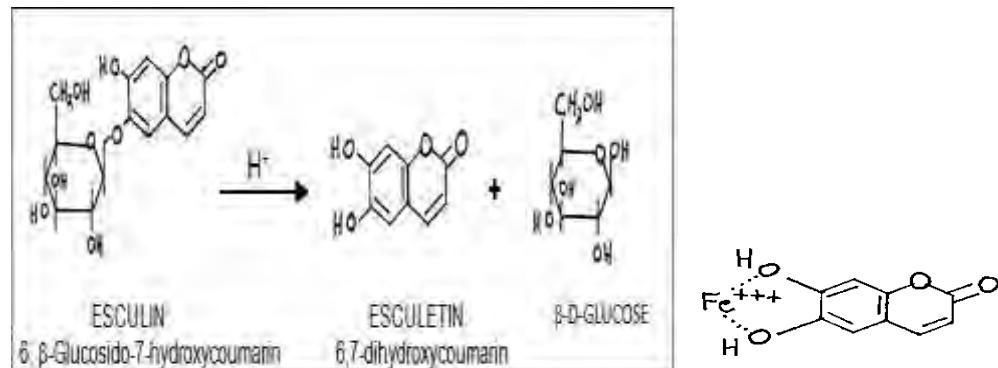


Figure 14 : Réaction d'hydrolyse de l'esculine

II.2.3.3. groupage antigénique

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

- ✓ la technique de LANCEFIELD, (cf. classification),
- ✓ la précipitation en milieu gélosé par contre immunoélectrophorèse,
- ✓ l'immunofluorescence directe [4].

II.2.3.4. sensibilité à l'optochine

L'optochine est un dérivé proche de la quinine. Les autres streptocoques sont résistants à l'optochine et se multiplient jusqu'au contact du disque.

Cependant, 0,5 à 5% des pneumocoques sont résistants à l'optochine et quelques streptocoques viridans sont sensibles à l'optochine [37].

II.3. Habitat et pouvoir pathogène

Les streptocoques sont commensaux de la cavité buccale, de l'intestin, de la peau et des voies génitales [26].

Les principales espèces pathogènes sont :

- ✓ *S. pyogenes* ou streptocoques β-hémolytiques du groupe A,
- ✓ *S. agalactiae* ou streptocoques β-hémolytiques du groupe B,
- ✓ *S. pneumoniae* ou pneumocoques,
- ✓ Streptocoque C : *S. equi*, *S. dysgalactiae*,
- ✓ Commensaux opportunistes : *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. salivarius*,
- ✓ Entérocoques : *E. faecalis*, *E. faecium* [38].

Lorsque ces bactéries pathogènes sont présentes transitoirement et en faible quantité sur les muqueuses ou les téguments, on parle de "portage" et de porteurs sains. Parmi les streptocoques, les espèces commensales appartiennent à la flore normale des muqueuses de l'homme. Ce sont les streptocoques oraux (commensaux de l'oropharynx) et les streptocoques du groupe D (commensaux de l'intestin). Dans certaines circonstances ces bactéries commensales deviennent pathogènes opportunistes et peuvent être responsables d'infections, notamment de septicémies ou d'endocardites [38, 3].

- ✓ Le streptocoque β-hémolytique du groupe A a une grande importance en bactériologie médicale car ce germe est responsable de la majorité des infections humaines à streptocoque [40]. Les angines à streptocoques sont fréquentes chez les enfants avec une prédisposition entre 5 – 10 ans. Les

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

- Rhumatisme articulaire aigu (RAA) avec atteinte cutanée et surtout cardiaque (endocardite, myocardite, péricardite et risque de séquelles valvulaires),
- Glomérulonéphrite aiguë post-streptococcique, pouvant provoquer une insuffisance rénale chronique [44].

Les infections à streptocoques hémolytiques du groupe A occupent la 2^e place des statistiques cardiaques dans les villes africaines [3].

- ✓ *S. agalactiae* est un hôte normal du tube digestif, des voies respiratoires supérieures et des voies génitales féminines [45]. *S. agalactiae* peut causer la méningite, la septicémie néonatale et la pneumonie chez les nouveau-nés, les adultes peuvent éprouver la vaginite, la fièvre puerpérale, infection des voies urinaires, infection de la peau et l'endocardite [40]. Le streptocoque B est responsable, chez les sujets immunodéprimés ou atteints d'affections fragilisantes d'infections opportunistes (pneumopathies, arthrites, méningites, cellulites, endocardites) [45].
- ✓ *S. pneumoniae* est une des premières causes bactériennes dans le monde de sepsis, de pneumonies, de méningites, d'otites moyennes aigues (OMA), et de sinusites [27]. Elle est responsable d'une morbi-mortalité importante en particulier dans les infections pulmonaires et les méningites [46,47, 48].
- ✓ *E. faecalis* peut être isolé seul ou en association avec d'autres bactéries dans les infections suivantes : otites, sinusites, péritonites, suppurations de plaies chirurgicales d'origine abdominale, septicémies ayant comme points de départ des infections urinaires ou génitales ; les infections urinaires représentent aussi la porte d'entrée d'endocardites surtout chez les personnes âgées [4, 3].

DEUXIEME PARTIE :

travail expérimental

I. Cadre d'étude

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

II. Souches bactériennes

Nous avons travaillé sur 6 souches qui ont déjà été identifiées et conservées et 2 souches de référence. Ces germes appartiennent aux genres *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Enterococcus* dont :

- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- ✓ *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- ✓ *S. aureus* (isolé d'un prélèvement chez un bébé à l'institut pasteur de Dakar)
- ✓ *S. saprophyticus* (souche isolée à l'institut pasteur de Dakar)
- ✓ *E. faecalis* (souche de contrôle microméthode Micro-CSB)
- ✓ *S. pyogenes* (souche de contrôle microméthode Micro-CSB)
- ✓ *S. agalactiae* (souche de contrôle microméthode Micro-CSB)
- ✓ *S. pneumoniae* (souche de contrôle microméthode Micro-CSB)

III. Matériel et réactifs

III.1. Matériel pour l'identification

- ✓ Bec bunsen
- ✓ Etuve
- ✓ Four à micro-ondes
- ✓ Jarre d'incubation + bougie
- ✓ Micropipettes
- ✓ Filtre millipores
- ✓ Violet de gentiane
- ✓ Lugol
- ✓ Alcool 95°
- ✓ Fuschine
- ✓ Microscope optique
- ✓ Microplaques
- ✓ Embouts stériles
- ✓ Becher rempli d'eau de javel
- ✓ Plateau
- ✓ Anse de platine ou pipette pasteur
- ✓ Lame porte-objet
- ✓ Lamelles

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

- ✓ Autoclave
- ✓ Boîtes de pétri
- ✓ Tubes à vis stériles
- ✓ Micropipettes
- ✓ Densitomètre

III.3. Matériel pour la conservation des souches

- ✓ Tubes Nunc
- ✓ Tubes stériles à vis

III.4. Milieux pour l'isolement, l'enrichissement et la conservation des souches

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

III.5. Milieux pour l'identification

- ✓ Milieu Urée Tryptophane
- ✓ Milieu Clark et Lubs
- ✓ Milieu Moeller
- ✓ Milieu Nitrate
- ✓ Milieu pour la recherche de la β -galactosidase
- ✓ Milieu pour l'hydrolyse de l'esculine
- ✓ Bouillon Hypersalé
- ✓ Milieu MEVAG/ staph/ strepto
- ✓ Les sucres : glucose, mannitol, xylose, saccharose, glycérol, mannose, lactose, raffinose, tréhalose, arabinose, sorbitol, tréhalose, sorbose, inuline, lactose, ribose, amidon, mannitol, glycérol, raffinose.
- Huile de paraffine

III.6. Réactifs pour l'identification des souches

- ✓ Eau oxygénée
- ✓ Plasma de lapin
- ✓ Alpha-naphtol
- ✓ KOH
- ✓ Crétatine
- ✓ Alpha-naphthylamine
- ✓ Acide sulfanilique
- ✓ Gélose à la DNase
- ✓ Kit de latex strepto (Bio Mérieux)

IV. Méthodologie

IV.1. Réisolement et réidentification des souches bactériennes

Nous avons utilisé des souches de staphylocoques et de streptocoques déjà identifiées et conservées à -20°C. Nous avons procédé à une réidentification de ces souches bactériennes en repiquant les staphylocoques sur gélose Chapman et les streptocoques sur gélose au sang en milieu enrichi en CO₂ après les avoir régénérées dans du BGT. L'incubation a été faite à l'étuve à 37°C en 24h.

Après les 24h d'incubation des tests de pré-identification de ces espèces bactériennes ont été réalisés afin de vérifier la stabilité de leurs caractères.

Il s'agissait des tests de Catalase ; Coloration de Gram ; DNase ; Coagulase ; Latex staph et du Test d'agglutination des streptocoques.

IV.2. Préparation milieux de culture liquides

Pour étudier la réduction du temps d'incubation des microplaques par la microméthode Micro-CSB® nous avons préparé pour certains milieux de culture (VP, BHS et décarboxylases):

- ✓ Un milieu standard ;
- ✓ Un milieu où nous avons substitué le glucose par du pyruvate ;
- ✓ Un milieu où nous avons additionné le pyruvate en plus du glucose.

Cela afin d'optimiser la recherche des décarboxylases et de la mise en évidence de la production l'acétoïne, des tests qui se font en routine en 24h voire des jours.

- ✓ Milieu Urée-tryptophane (annexe 1)
- ✓ Milieu Clark et Lubs (annexe 2)
- ✓ Milieu Moeller décarboxylases (annexe 3)
- ✓ Milieu Nitrate (annexe 4)
- ✓ Milieu pour la recherche de la β -gal (annexe 5)
- ✓ Milieu esculine (annexe 6)
- ✓ Milieu BHS (annexe 7)
- ✓ Milieu MEVAG Staph/Strepto (annexe 8)
- ✓ Les sucres (annexe 9)

IV.2.1. Contrôle de qualité des milieux liquides

Les milieux préparés ont été soumis à un contrôle de stérilité et d'efficacité.

IV.2.1.1. Contrôle de stérilité

Pour chaque milieu préparé, un ml de solution était introduit dans un tube à hémolyse stérile et incubé à 37° C à l'étuve pendant 24h. Les milieux étaient

considérés comme stériles en l'absence de trouble ou de virage de l'indicateur coloré.

IV.2.1.2. Contrôle d'efficacité

Chaque milieu préparé été testé avec une souche de contrôle. La positivité du test se traduisait par une pousse de la souche dans le milieu de culture.

IV.2.2. Préparation et conditionnement des plaques déshydratées

Les milieux de culture ont été distribués dans les micro-cupules : 100µl de milieu dans les puits correspondants (ADH à VP), 10µL de sucre à 10% dans les puits correspondants (figure 13).

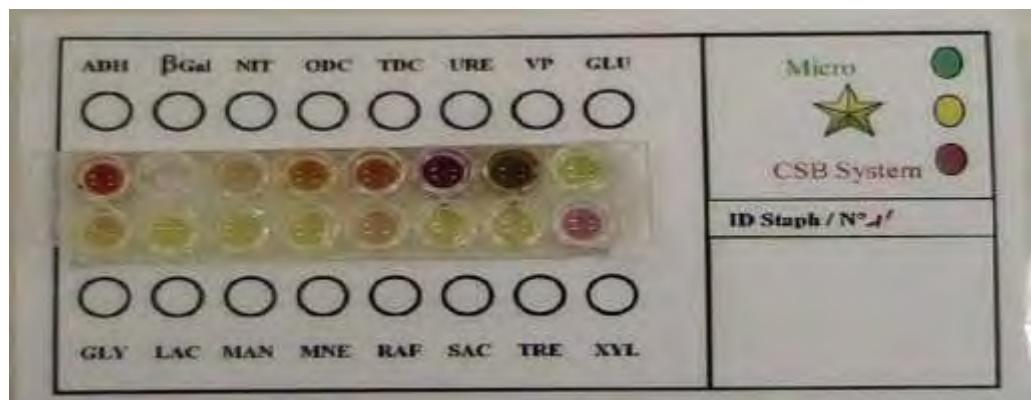


Figure 15 : Disposition des plaques d'identification micro-CSB

Les plaques étaient ensuite mises dans l'étuve portée à 43°C pendant 48h pour permettre une déshydratation des substrats.

IV.2.3. Contrôle de qualité des microplaques d'identification déshydratées

Pour tous les milieux déshydratés préparés, nous avons effectué des tests de stérilité et d'efficacité.

✓ Le Contrôle de stérilité des microplaques

Consistait à mettre en évidence l'absence de contamination du milieu. Les cupules renfermant ADH à VP ont été inoculées avec de l'eau physiologique et celles contenant les sucres avec du MEVAG staph/strepto. Les plaques ont été recouvertes de paraffine et incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 h.

✓ Contrôle d'efficacité des microplaques

Ce test était réalisé pour s'assurer que les milieux n'ont pas été dénaturés lors de la déshydratation. Ainsi, pour chaque milieu une souche était utilisée pour le contrôle positif et une autre pour le contrôle négatif.

Tableau X: *Souches de contrôle (Micro-CSB®) utilisées pour le test d'efficacité des microplaques*

Tests	Témoins positifs	Témoins négatifs
ADH	<i>S. agalactiae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
ODC	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>S. aureus</i>
URE	<i>S. saprophyticus</i>	<i>E. coli</i>
β-gal	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. aureus</i>
NIT	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. aureus</i>
VP	<i>E. faecalis</i>	<i>S. pneumoniae</i>
BHS	<i>E. faecalis</i>	<i>S. pyogenes</i>
ESC	<i>E. faecalis</i>	<i>S. pyogenes</i>
GLU	<i>S. aureus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
GLY	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>
LAC	<i>S. aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
MAN	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>
MNE	<i>S. aureus</i>	<i>S. saprophyticus</i>
RAF	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>
SAC	<i>S. aureus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
TRE	<i>S. aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
XYL	<i>S. xylosus</i>	<i>S. aureus</i>
AMD	<i>E. faecalis</i>	<i>S. agalactiae</i>
RIB	<i>E. faecalis</i>	<i>S. pyogenes</i>
SOS	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
SOR	<i>E. faecalis</i>	<i>S. agalactiae</i>
ARA	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>
INU	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. agalactiae</i>

IV.3. Mode opératoire de l'étude sur les microplaques Micro-CSB®

Les galeries CSB staph/strepto® sont constituées de 16 tests biochimiques qui mettent en évidence des activités enzymatiques et l'assimilation de substrats carbonés.

IV.3.1. Préparation inoculum bactérien

L'identification des bactéries avec la microméthode Micro-CSB® a été réalisée en utilisant des inocula de densité égale à 4 sur l'échelle de Mac Farland. Ces inocula ont été préparés en délayant dans de l'eau physiologique les colonies obtenues sur gélose par culture de moins de 24 heures.

L'inoculum utilisé pour la microméthode Micro-CSB® a été standardisé à 10^6 UFC/ml [12].

IV.3.2. Ensemencement et incubation des microplaques

Distribution des plaques

- ✓ Pour les staphylocoques

Un volume de 100µl d'inoculum bactérien était distribué par cupule de ADH à VP. Pour les cupules contenant des sucres, 100µl de la suspension bactérienne ont été mélangés avec 1 ml de MEVAG/staph puis ensemencé dans ces cupules de GLU à XYL.

Deux gouttes de paraffine étaient rajoutées dans les puits pour la recherche de décarboxylases, d'uréase et la fermentation des sucres afin de maintenir l'anaérobiose nécessaire pour ces réactions.

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

✓ Pour les streptocoques

Un volume de 100µl d'inoculum bactérien était distribué par cupule de ADH à VP. Pour les cupules contenant de sucres, 100µl de la suspension bactérienne a été mélangé avec 1 ml de MEVAG/strepto puis ensemencé dans ces cupules de AMD à TRE.

Deux gouttes de paraffine étaient rajoutées dans les puits pour la recherche de décarboxylases, d'uréase et la fermentation des sucres afin de maintenir l'anaérobiose nécessaire pour ces réactions.

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

Lecture et interprétation des résultats

La lecture (de la positivité ou de la négativité) des tests reposait sur le changement de la coloration initiale des différents milieux. Pour la plupart des milieux, la lecture a été effectuée directement, pour d'autres (VP et NIT) elle a nécessité l'ajout de réactifs de révélation.

Lecture VP : ajouter 1 goutte de créatine puis 1 goutte d'alpha naphtol à 6%

(VP1) et 1 goutte d'hydroxyde de potassium KOH à 40% (VP2).

Lecture NIT : ajouter respectivement 1 goutte d'acide sulfanilique (GRIESS I) et 1 goutte d' α -naphtylamine (GRIESS II).

Après 6 h d'incubation la lecture a été effectuée directement grâce aux tableaux suivants (tableaux XIII et XIV).

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

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

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

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

IV.4. Calcul des probabilités et élaboration des algorithmes des staphylocoques et des streptocoques

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

Nous avons alors utilisé les résultats de la galerie Api staph / strepto [réf 20590 ; réf 20690] ; mais également les données du livre Précis de bactériologie –Frenet *et al.* « Tableaux : Activités enzymatiques utiles à la discrimination des principales bactéries en fonction des groupes taxonomiques ; Recherche de l'assimilation ou de la fermentation de sucres polyalcohols ; Recherche des métabolites intermédiaires » [49] comme références pour pouvoir calculer ces probabilités d'identification des souches.

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

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

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

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

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

Probabilité absolue = produit des valeurs obtenues pour chaque espèce =
f x (1-f)

Probabilité absolue

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

On considère généralement les seuils suivants :

> 99,9 % : excellente identification

> 99 % : très bonne identification

> 90 % : bonne identification

> 80 % : identification acceptable

< 80 % : identification inacceptable

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

IV.5. Validation de la méthode

Le but de la validation d'une méthode d'analyse est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue. La validation est l'ensemble des opérations nécessaires pour prouver que le protocole est suffisamment exact et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé [50].

Ainsi la validation d'une méthode permet de connaître ses caractéristiques pour définir et juger la qualité du processus analytique, et en préciser les limites de validité.

Les critères de validation sont : la spécificité, la linéarité, la limite de détection, la précision, la répétabilité et la reproductibilité, la sensibilité, l'exactitude [51].

Dans notre étude nous avons procédé par la répétabilité et la reproductibilité pour valider notre méthode.

IV.5.1. La répétabilité

La répétabilité exprime la fidélité évaluée dans des conditions opératoires identiques (mêmes souches de contrôle avec mêmes lots de milieux) n fois avec la microméthode [52].

Technique :

Répétabilité de la mesure (substrat) : $n \geq 3$

Répétabilité de la même méthode : $n \geq 3$

IV.5.2. la reproductibilité

La reproductibilité exprime la variabilité inter-laboratoires (études collaboratives) habituellement appliquées à la standardisation de la méthodologie [50].

On donnera aussi parfois un sens restreint à cette notion de reproductibilité, en considérant par exemple, dans un même laboratoire, différents opérateurs utilisant le même matériel ou un même opérateur qui exécute la même analyse mais à des dates très éloignées les unes des autres [53].

De ce fait, nous avons effectué le test d'identification Micro-CSB® des mêmes souches de contrôle pour chaque lot de milieux préparés.

Technique :

- ✓ Se munir de 2, 3 ou 4 lots de milieux pour identification par la microméthode Micro-CSB® ;

Préparer pour chaque lot de milieu :

- ✓ Un milieu standard ;
- ✓ Un milieu avec pyruvate ;
- ✓ Procéder à l'identification par la microméthode Micro-CSB® pour chaque souche de contrôle avec les lots de milieux.

Les souches doivent présenter le même profil biochimique lors de l'identification pour tous les lots de milieux testés par différentes personnes du laboratoire [51].

V. RESULTATS

Dans ce chapitre nous avons exploité les résultats obtenus de l'identification des souches étudiées. Nous nous sommes également basés sur les algorithmes d'identification pour pouvoir identifier correctement les différents germes de staphylocoques et streptocoques (cf. figures 8 ; 9).

V.1. Identification de *S. aureus*

Tableau XIII: Profil bactériologique de la souche X1 probable *S. aureus*

Caractères	Espèces			
	<i>S. aureus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Espèce X</i>
Gram	100%	100%	100%	+
Catalase	100%	100%	100%	+
Coagulase	100%	0%	0%	+
DNase	100%	0%	0%	+
Urée	83%	65%	88%	+
ADH	80%	25%	73%	+
Man	89%	92%	3%	+
Mne	99%	1%	81%	+
Lac	88%	90%	81%	+
Glu	100%	100%	100%	+
Tre	94%	99%	1%	+
Sac	97%	98%	97%	+
Xyl	0%	0%	0%	-
Raf	0%	1%	0%	-
VP	87%	79%	78%	+

Tableau XIV: Probabilités d'appartenance de la souche X1 aux espèces apparentées

Espaces probables	Espèce X1	
	Probabilité absolue	Probabilité relative
<i>S. epidermidis</i>	0,000	0%
<i>S. saprophyticus</i>	0,001	0,24%
<i>S. aureus</i>	0,408	99%

La souche X1 étudiée a été bien identifiée à l'espèce *S. aureus* avec une probabilité relative de 99%.

V.2. Identification de *S. saprophyticus*

Tableau XV: Profil bactériologique de la souche X2 probable *S. saprophyticus*

Caractères	Espèces			
	<i>S. aureus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Espèce X</i>
Gram	100%	100%	100%	+
Catalase	100%	100%	100%	+
Coagulase	100%	0%	0%	-
DNase	100%	0%	0%	-
Urée	80%	65%	88%	+
ADH	80%	25%	73%	-
Man	89%	92%	3%	+
NIT	89%	35%	80%	-
Lac	88%	90%	81%	+
Glu	100%	100%	100%	+
Tre	94%	99%	1%	+
Sac	97%	98%	97%	+
Xyl	0%	0%	0%	-
Raf	0%	1%	0%	-
VP	87%	79%	78%	+

Tableau XVI: Probabilités d'appartenance de la souche X2 aux espèces apparentées

Espèces probables	Espèce X2	
	Probabilité absolue	Probabilité relative
<i>S. epidermidis</i>	0,000	0%
<i>S. aureus</i>	0	0%
<i>S. saprophyticus</i>	0,201	100%

Notre méthode nous a permis une excellente identification de la souche X2 comme appartenant à l'espèce *S. saprophyticus* avec une probabilité de 100%.

V.3. Identification de *S. pneumoniae*

Tableau XVII : Profil bactériologique de la souche X3 probable *S. pneumoniae*

Caractères	Espèces				
	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>Espèce X</i>
Gram	100%	100%	100%	100%	+
Catalase	0%	0%	2%	0%	-
ESC	5%	1%	99%	39%	-
BHS	0%	0%	99%	0%	-
β-Hém	98%	75%	0%	1%	-
VP	0%	100%	99%	0%	-
Man	8%	1%	98%	0%	-
Ara	0%	0%	0%	0%	-
Raf	1%	1%	0%	92%	-
Tre	98%	87%	100%	99%	+
Rib	0%	98%	98%	3%	-
Inu	64%	0%	0%	64%	-
Amb	61%	35%	96%	89%	-
Lac	99%	50%	94%	100%	+
ADH	99%	99%	97%	57%	-

Tableau XVIII: probabilités d'appartenance de la souche X3 aux espèces apparentées

Espèces probables	Espèce X3	
	Probabilité absolue	Probabilité relative
<i>S. agalactiae</i>	0	0%
<i>E. faecalis</i>	0	0%
<i>S. pyogenes</i>	0,00002	0,25%
<i>S. pneumoniae</i>	0,00078	97,5%

La souche X3 étudiée était bien identifiée à l'espèce *S. pneumoniae* avec une probabilité relative de 97,5%.

V.4. Identification d'*Enterococcus faecalis*

Tableau XIX : Profil bactériologique de la souche X4 probable E. faecalis

Caractères	Espèces				
	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>Espèce X</i>
Gram	100%	100%	100%	100%	+
Catalase	0%	0%	2%	0%	-
ESC	5%	1%	99%	39%	+
BHS	0%	0%	99%	0%	+
β-Hém	98%	75%	0%	1%	-
Sor	1%	1%	92%	0%	+
VP	0%	100%	99%	0%	+
Man	8%	1%	98%	0%	+
Ara	0%	0%	0%	0%	-
Raf	1%	1%	0%	92%	-
Tre	98%	87%	100%	99%	+
Rib	0%	98%	98%	3%	+
Inu	64%	0%	0%	64%	-
Amd	61%	35%	96%	89%	-
Lac	99%	50%	94%	100%	+
ADH	99%	99%	97%	57%	+

Tableau XX: Probabilités d'appartenance de la souche X4 aux espèces apparentées

Espèces probables	Espèce X4	
	Probabilité absolue	Probabilité relative
<i>S. pyogenes</i>	0,0000	0
<i>S. agalactiae</i>	0	0
<i>S. pneumoniae</i>	0,00002	0,06%
<i>E. faecalis</i>	0,0306	100%

L'identification d'*Enterococcus faecalis* a pu être faite grâce à cette méthode avec une probabilité de 100%.

V.5. Identification de *S. pyogenes*

Tableau XXI: Profil bactériologique de la souche X5 probable *S. pyogenes*

Caractères	Espèces				
	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>Espèce X</i>
Gram	100%	100%	100%	100%	+
Catalase	0%	0%	2%	0%	-
ESC	5%	1%	99%	39%	-
BHS	0%	0%	99%	0%	-
β-Hém	98%	75%	0%	1%	+
VP	0%	100%	99%	0%	-
Man	8%	1%	98%	0%	+
Ara	0%	0%	0%	0%	+
Raf	1%	1%	0%	92%	-
Tre	98%	87%	100%	99%	+
Rib	0%	98%	98%	3%	-
Inu	64%	0%	0%	64%	-
Amd	61%	35%	96%	89%	-
Lac	99%	50%	94%	100%	+
ADH	99%	99%	97%	57%	+

Tableau XXII: Probabilités d'appartenance de la souche X5 aux espèces apparentées

Espèces probables	Espèce X5	
	Probabilité absolue	Probabilité relative
<i>S. pneumoniae</i>	0	0%
<i>E. faecalis</i>	0	0%
<i>S. agalactiae</i>	0	0%
<i>S. pyogenes</i>	0,0276	100%

La probabilité relative pour que l'espèce X5 soit *Streptococcus pyogenes* était 100%.

V.6. Identification de *Streptococcus agalactiae*

Tableau XXIII: Profil bactériologique de la souche X6 probable *S. agalactiae*

Caractères	Espèces				
	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>Espèce X</i>
Gram	100%	100%	100%	100%	+
Catalase	0%	0%	2%	0%	-
ESC	5%	1%	99%	39%	-
BHS	0%	0%	99%	0%	-
β-Hém	98%	75%	0%	1%	+
VP	0%	100%	99%	0%	+
Man	8%	1%	98%	0%	-
Ara	0%	0%	0%	0%	+
Raf	1%	1%	0%	92%	-
Tre	98%	87%	100%	99%	+
Rib	0%	98%	98%	3%	+
Inu	64%	0%	0%	64%	-
Amd	61%	35%	96%	89%	-
Lac	99%	50%	94%	100%	-
ADH	99%	99%	97%	57%	+

Tableau XXIV: probabilités d'appartenance de la souche X6 aux espèces apparentées

Espèces probables	Espèce X6	
	Probabilité absolue	Probabilité relative
<i>S. pneumoniae</i>	0	0%
<i>S. faecalis</i>	0	0%
<i>S. pyogenes</i>	0,0018	1,64%
<i>S. agalactiae</i>	0,1074	98,35%

La probabilité relative pour que X6 appartienne à *Streptococcus agalactiae* est de 98,35% ; la méthode a permis une identification de *Streptococcus agalactiae*.

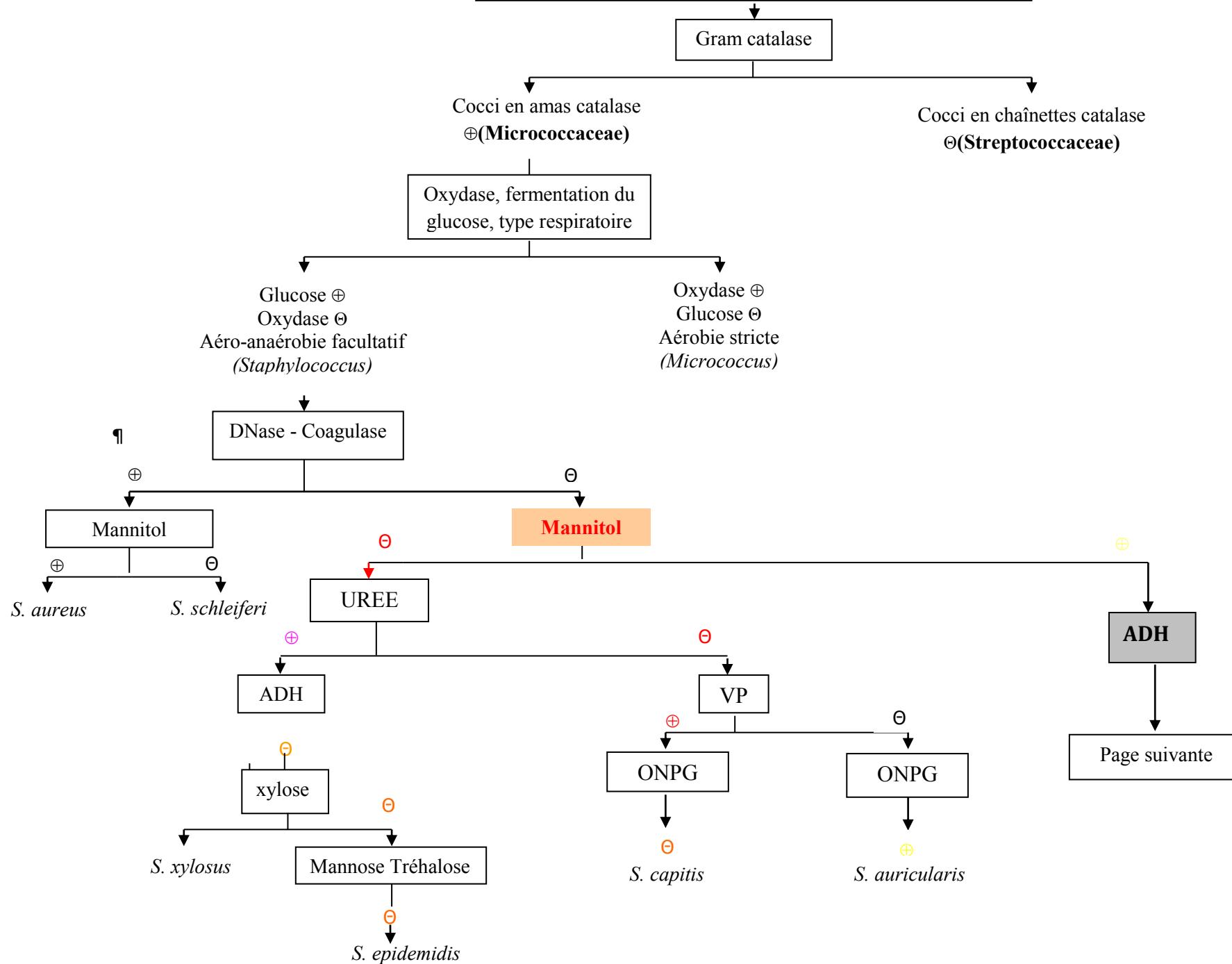
V.7. Les résultats de la réduction du délai de lecture des tests de VP et des décarboxylases

Les souches testées avec le milieu standard avaient donné un résultat négatif après une incubation de 6 heures (pour VP et décarboxylases).

Par contre, avec les milieux dans lesquels le glucose était substitué avec le pyruvate et ceux renfermant pyruvate et glucose, les résultats étaient positifs après un délai d'incubation de 6 heures (pour VP et décarboxylases).

Les tests tels que la recherche d'uréase et l'hydrolyse de l'esculine étaient positifs à la première d'incubation. Pour les autres caractères biochimiques des souches, la lecture a été faite après 4 à 6 heures d'incubation.

Souches pures
(Isolement sur gélose au sang ordinaire / gélose trypticase-soja)



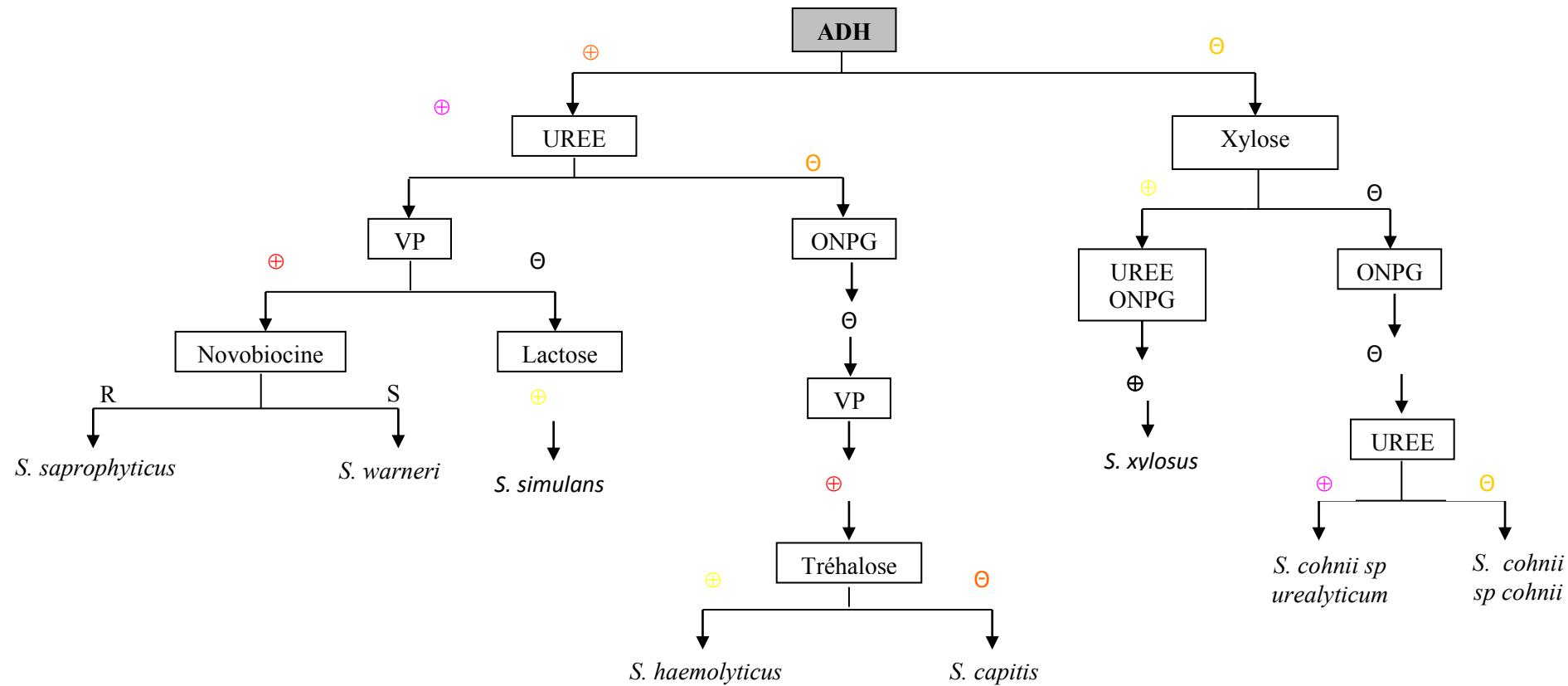


Figure 16 : Algorithme d'identification des principales espèces de staphylocoques à coagulase négative

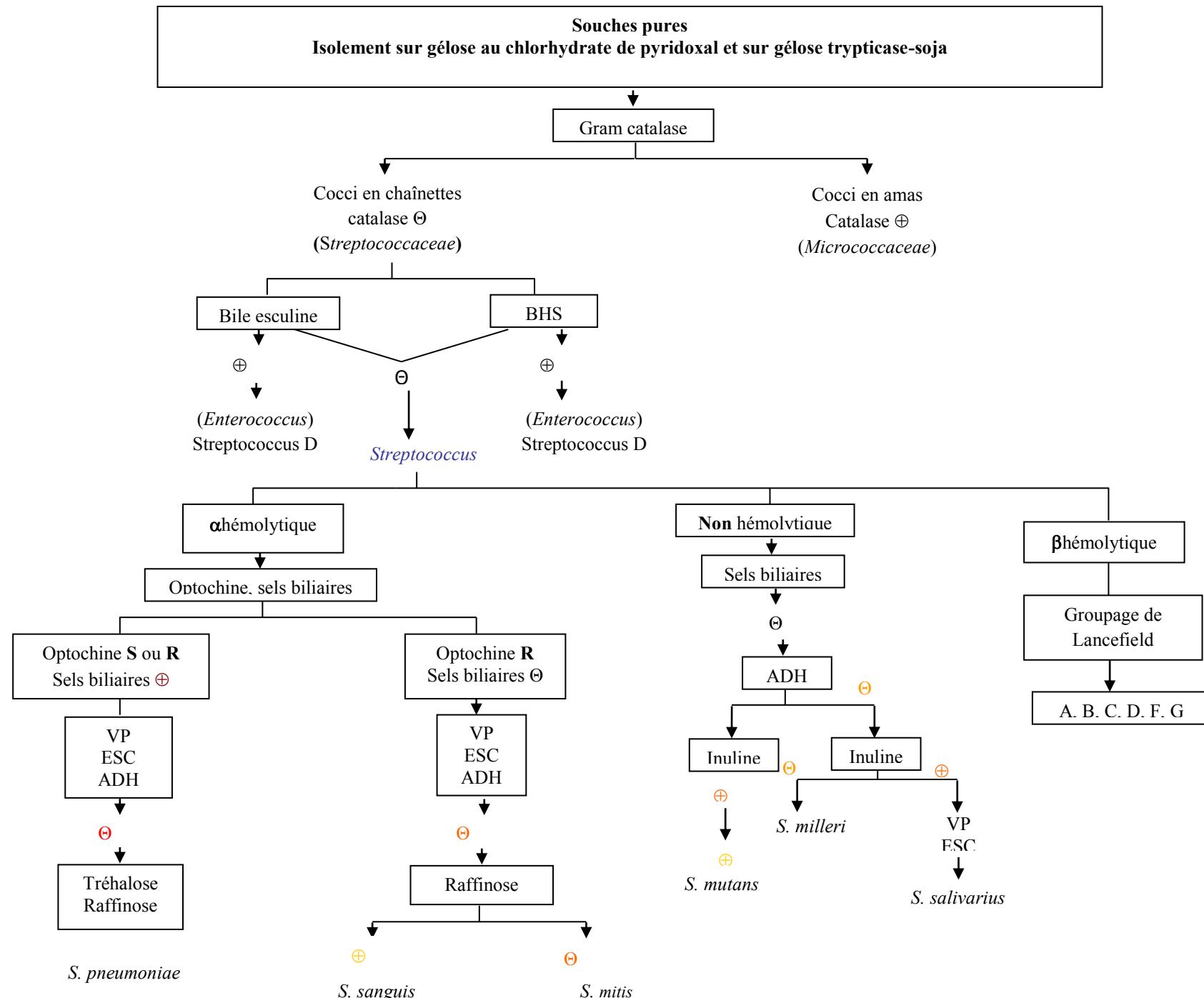


Figure 17 : Algorithme d'identification des principales espèces de streptocoques non groupables

VI. DISCUSSION

✓ Souches bactériennes

L'étude de l'optimisation de l'identification des staphylocoques et des streptocoques par la microméthode Micro-CSB® en 6 heures, avait porté sur 6 souches bactériennes (2 staphylocoques : *S. aureus* et *S. saprophyticus* -isolés à l'institut Pasteur de Dakar- ; 3 streptocoques (souches de contrôle micro-CSB®) : *S. pyogenes*, *S. agalactiae* et *S. pneumoniae* ; 1 entérocoque : *E. faecalis*) dont le choix se justifie par leur importance en pathologie infectieuse humaine [3, 29].

Les souches de contrôle (*S. aureus* ATCC 29213 et *E. faecalis* ATCC 29212) nous ont permis de valider notre méthode d'étude.

Nous avons procédé à une réidentification de ces couches afin de bien s'assurer qu'il s'agissait des souches en question.

✓ Isolement des souches

La culture des staphylocoques était faite sur gélose CHAPMAN, milieu de culture sélectif hypersalé. Les staphylocoques ont la capacité de pousser sur milieu hostile, notamment *S. aureus*. Ce milieu CHAPMAN permet d'isoler le staphylocoque d'un prélèvement polymicrobien [10, 18].

Les *Streptococcus A*, *pneumoniae*, non groupables et bien d'autres se cultivent difficilement sur gélose ordinaire voire pas du tout, à la fois pour des raisons nutritionnelles et de conditions de culture. Le milieu d'isolement doit donc être riche : une gélose au sang frais ou au chocolat enrichie (au sang cuit) sera le milieu de choix. Les *Streptococcus-Enterococcus*, catalase négative, apprécieront particulièrement la gélose au sang frais parce qu'elle apporte la catalase grâce à

l'hémoglobine, catalase qui facilitera la culture en éliminant le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 produit en aérobiose.

Les coques Gram + catalase - sont des bactéries uniquement fermentaires : l'anaérobiose leur convient parfaitement, même si leur culture aérobiose est possible. On utilisera donc une étuve à CO_2 ou une jarre avec le générateur adéquat [3, 40, 48].

✓ Choix du substrat

Le but de ce travail a été de raccourcir le temps d'incubation des plaques d'identification de la microméthode Micro-CSB® c'est dans cette optique que nous avons ajouté du pyruvate dans certains milieux de culture. Le pyruvate est le métabolite intermédiaire de la glycolyse. Ainsi, son addition dans les milieux de culture fournit à la fois une source d'énergie et de carbone un squelette carboné pour les processus métaboliques [54]. Le pyruvate est accepteur d'électrons organiques lors de la fermentation. Il est réduit en lactate dans la fermentation lactique [55]. Et cela dans le but de réduire la durée de la glycolyse des métabolismes où le glucose est utilisé comme source de carbone.

L'ajout de pyruvate dans les milieux de culture (Décarboxylases, VP et BHS) permet de fournir aux bactéries ce métabolite intermédiaire afin qu'elles puissent l'utiliser directement sans avoir à parcourir tout le processus de la dégradation du glucose.

✓ Résultats identification

L'objectif de cette étude qui était de raccourcir le délai de lecture des plaques d'identification de la microméthode Micro-CSB® a été atteint permettant ainsi d'identifier en 6 heures les espèces de staphylocoques et de streptocoques isolées en routine des produits pathologiques.

La mise au point de la microméthode Micro-CSB® avait pour but l'identification rapide et fiable des SCoN et des SNG ; vu que certains tests comme la coagulase et l'agglutination sur particules de latex (*S. aureus*) [56], le groupage antigénique des streptocoques groupables pouvaient donner des orientations sur ces espèces bactériennes en quelques minutes.

Cependant, par manque de souches, nous nous sommes contentés de ces souches pour faire l'étude.

Lors de ce travail, nous nous sommes basés sur le calcul des probabilités absolues et relatives mais également de l'algorithme issu des travaux de SARR en 2004 [26] pour l'identification des espèces de staphylocoques et de streptocoques. Les caractères indispensables de ces germes ont été retenus permettent ainsi l'identification de l'espèce bactérienne.

L'identification des souches avec la microméthode Micro-CSB® se fait grâce aux 15 tests biochimiques de mise en évidence d'activités enzymatiques et de fermentation des sucres.

L'étude des caractères majeurs des espèces bactériennes a été faite sans discordance, aussi bien pour les staphylocoques que pour les streptocoques. Quelques variations ont été notées au niveau de la fermentation des sucres ; notamment avec :

- *S. pyogenes*

La galerie Micro-CSB® nous a permis une excellente identification de *S. pyogenes* avec une probabilité de 100%, même si des discordances ont été observées pour le caractère arabinose (Ara). Le test d'assimilation de l'amidon (61% API, caractère variable) a donné un résultat négatif.

Dans le groupe A des Streptocoques, il est nécessaire de distinguer *S. pyogenes* (VP-, ESC-, ADH + et bacitracine sensible) de *S. anginosus* (VP+, ESC+, ADH

+ et bacitracine résistant) du fait que des souches *S. anginosus* peuvent être retrouvées aussi bien dans les groupes A, C, et G de Lancefield [57].

- *S. agalactiae*

Avec une probabilité de 98,35%, la souche a donné un bon profil d'identification malgré cette discordance notée avec le test d'arabinose (positif alors que ça devrait être négatif ; selon API la souche a un pourcentage de 0% pour ce caractère).

- *S. pneumoniae*

La méthode de l'identification de *S. pneumoniae* a été jugée bonne avec une probabilité relative de 97,5%. L'étude n'a pas été exhaustive car les 100% n'ont pas été atteint et cela pourrait être dû aux variations notées avec le raffinose et l'amidon qui ont donné des résultats négatifs ; mais également aux caractères variables tels que l'inuline et l'ADH.

Les discordances enregistrées au niveau de l'assimilation des sucres ont été également notées dans les travaux de FALL. S 2008 et de SOW. M F 2004.

Les souches de *S. aureus* (99,57%), *S. saprophyticus* (100%) et *E. faecalis* (100%) ont été très bien identifiées.

Le test de sensibilité à la novobiocine pour les souches de *S. saprophyticus* a été d'une importance capitale pour plus de fiabilité ; vu que ce germe est le 2^e agent responsable d'infections urinaires chez les jeunes femmes (10-29 ans) et 5 à 10% des cystites simples [54,58]. *S. aureus* et la plupart des SCoN sont sensibles à la novobiocine, *S. saprophyticus* développe une résistance naturelle à cet antibiotique [59].

Donc pour une confirmation de l'identification de cette espèce, il est important de faire le test de sensibilité de *S. saprophyticus* à cet antibiotique. Dans notre

algorithme, c'est le seul caractère qui différencie *S. saprophyticus* de *S. warneri*. Le test d'identification d'espèce à la novobiocine a une valeur prédictive de 93% avec 3,4% d'erreurs de diagnostic [59].

✓ **Effet de l'inoculum dans l'identification de ces souches bactériennes**

Pour toutes les souches bactériennes, nous avons utilisé le même inoculum (4 Mac Ferland). La densité de cet inoculum a une très grande importance dans la culture, vu son impact dans le métabolisme des bactéries.

Une concentration élevée de l'inoculum entraîne un épuisement rapide du milieu tandis qu'une faible concentration entraîne un temps de virage très long de l'indicateur coloré. Cela du fait de la petite quantité de substrat utilisé [12].

Avec des inocula de 10^6 UFC/ml, les staphylocoques et les streptocoques sont déjà bien identifiés avec une concordance de 87 à 94 % [12].

Dans son étude, [4] démontre l'effet de l'inoculum dans l'identification des souches bactériennes. Elle a fait savoir que l'évolution du pourcentage de concordance des caractères était variable en fonction de la concentration de la suspension bactérienne.

✓ **Effet du pyruvate dans la réduction du délai de lecture lors de l'identification bactérienne par la Micro-CSB®**

Nous avons constaté que le pyruvate ajouté dans le milieu donnait une coloration plus nette et une orientation claire sur la positivité de la réaction. La durée des métabolismes glucidiques et protéiques a été raccourcie comparée à celle dans les conditions standards de mise en culture des bactéries. Selon les études antérieures, il faut au moins 12 H pour pouvoir faire une bonne identification des staphylocoques et des streptocoques.

Cependant, le pyruvate n'influence pas trop le raccourcissement du temps d'incubation. Alors, cela mérite une étude plus approfondie, car certaines enzymes sont inductibles et quel que soit le métabolite intermédiaire ajouté dans le milieu la réaction se déroule en chaîne selon la succession de ces différentes étapes.

✓ **Etude comparative de la microméthode Micro-CSB® avec d'autres méthodes d'identification bactérienne**

Comparé aux études antérieures avec la microméthode micro-CSB® dont la bonne identification des espèces était faite à la 12^{eme} voir la 24^{eme} heure d'incubation [4,12, 26], nous avons pu identifier les souches bactériennes après 6H dans l'étuve.

Toute fois une optimisation plus poussée de l'identification est capitale avec l'émergence des systèmes d'identification automatisés qui en 3H, 2H ou quelques minutes permettent une identification efficace et fiable. Parmi ces méthodes :

- **Système Vitek 2** identifie correctement les cocci à Gram positif à l'intervalle de 3H ; *S. agalactiae* et *S. pneumoniae* en 2H [48].
- **MALDI-TOF** : identification correcte des espèces avec 99,3% de souches de staphylocoques en quelques minutes [61].

✓ **Validation des résultats**

Afin d'apprécier la validité de la démarche, les résultats de calcul des probabilités absolues et relatives ont été retenus ; ainsi que les résultats des tests de répétabilité et de reproductibilité.

La méthode d'identification a été validée par la répétabilité (nous avons refait l'expérience plusieurs fois) et la reproductibilité (changement de variable personne) pour enfin valider.

Lors de la validation de cette méthode il nous est arrivé de préparer plusieurs fois les milieux de culture. Cela du fait que des variations ont été notées chez les mêmes espèces pour un caractère biochimique donné. Ces répétitions nous ont permis de voir différents facteurs pouvant influencer l'étude tels que le pH et la température. Egalelement nous avons reproduit la méthode avec pratiquement tout le personnel du laboratoire. En fin, par la répétabilité et la reproductibilité nous avons validé la méthode Micro-CSB®.

Avantages de la microméthode Micro-CSB®

Cette méthode a l'avantage d'une mise en œuvre abordable pour tout laboratoire de microbiologie. Tous les laboratoires peuvent avoir recours à cette méthode du fait de son coût bas, mais également du fait qu'elle n'exige aucun investissement matériel particulier. C'est une méthode facile à réaliser et ne prend pas beaucoup de temps (5 minutes en moyenne).

CONCLUSION

L'objectif de ce travail était de raccourcir le délai de lecture des microplaques Micro-CSB staph/strepto® de 12H à 6H de temps d'incubation.

Cet objectif trouve tout son intérêt et son importance dans le fait qu'aujourd'hui l'identification bactérienne ne pose plus de problème du fait de l'automatisation et des méthodes d'identification rapides, fiables et efficaces ; mais qui sont coûteuses et ne profitent pas à tous les laboratoires surtout dans les pays en développement où la routine nécessitant au moins 12 heures pour pouvoir identifier un germe.

Notre étude qui s'est déroulé au laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHU de Dakar, avait porté sur 6 souches bactériennes dont 2 de staphylocoques et 4 de streptocoques ;

L'identification de l'ensemble des espèces des genres *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Enterococcus* testées a pu être faite à la 6^eheure d'incubation des microplaques Micro-CSB®.

Nous pouvons en déduire que l'ajout de pyruvate dans certains milieux de culture et une densité élevée de l'inoculum peuvent permettre une identification plus rapide de ces germes comparée à la méthode classique standard de la microméthode Micro-CSB®.

Toutes les souches bactériennes étudiées ont pu être identifiées après 6 heures d'incubation et avec certitude. Cette identification rapide et spécifique s'avère indispensable au diagnostic microbiologique et aux choix thérapeutiques souvent décidés en urgence.

Cette méthode d'ajout de pyruvate dans certains milieux de culture nous a permis d'identifier correctement les staphylocoques et les streptocoques même si quelques discordances ont été notées avec les sucres.

L'étude aurait pu être plus intéressante si elle avait été faite sur une large gamme d'espèces bactériennes. Et cela afin de faire la discrimination des espèces de profil biochimique similaire, appartenant ou non au même groupe.

La microméthode Micro-CSB® est une méthode alternative dans l'identification bactérienne, elle permette une identification fiable, efficace et au moindre coût que tout pays en développement pourrait se procurer.

Recommandations

L'analyse de nos résultats nous a incité à proposer quelques recommandations.

- ✓ Surveillance des souches de contrôle afin de s'assurer de la stabilité des leurs caractères biochimiques.
- ✓ Chercher un autre moyen de préparer les sucres ; la distribution des sucres dans les cupules requiert beaucoup d'attention du fait de la petite quantité et de leur aspect incolore.
- ✓ Etudier de façon plus ample et détaillée le rôle du pyruvate dans le métabolisme glucidique et tous les facteurs qui y interviennent.
- ✓ Etudier l'effet combiné du glucose et du pyruvate dans le métabolisme bactérien.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Kloss WE, Wolfshohl JF.** Identification of *Staphylococcus* species with the API STAPH-IDENT system. *Journal of Clinical Microbiology*. 1982 Sept; 16 (3): 509-516.
2. **Whiley RA, Fraser H, Hardi JM, Beighton.** Phenotypic differentiation of *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* strains within the "*Streptococcus milleri* group". *Journal of Clinical Microbiology*. 1990 Jul; 28 (7): 1497-1501.
3. **Sarr A.** Algorithme d'identification des staphylocoques à coagulase négative et des streptocoques non groupables. [Thèse de Doctorat en Pharmacie]. Dakar : Université Cheikh Anta DIOP Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie ; 2004.
4. **Fall S.** Etude de l'effet de l'inoculum et du temps d'incubation sur l'identification des cocci à Gram positif. [Thèse de Doctorat en Pharmacie]. Dakar : Université Cheikh Anta DIOP Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie ; 2008.
5. **Foster T.** *Staphylococcus*. *Medical Micobiology*, 4e edition, 1996 [PubMed]
6. **Pribram E.** A contribution of the classification of microorganisms. *J Bacteriol*. 1928 Dec; 18 (6): 361-394.
7. **Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL.** Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacterio classis Nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1997 Apr; 47(2): 479-491.
8. **Drancourt M, Raoult D.** rpoB Gene Sequence-Based Identification of *Staphylococcus* Species. *JCM*. 2002 Apr; 40(4): 1333-1338.
9. **Kwok AYC, Chow AW.** Phylogenetic Study of *Staphylococcus* and *Macrococcus* species based on partial hsp 60 gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003; 53 : 87-92.

- 10. Diatta E.** Etude de l'effet de l'inoculum et du temps d'incubation sur la sensibilité in vitro des cocci à gram positif aux antibiotiques. [Thèse de Doctorat en Pharmacie]. Dakar : Université Cheikh Anta DIOP Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie ; 2008, N° 101.
- 11. Pina G, Raynaud D.** Critères de choix d'une méthode d'identification. DES bactériologie-virologie Lyon : Université Claude Bernard; 2003.
- 12. Sow MF.** Utilisation des méthodes biométriques pour la validation et l'identification des cocci à Gram positif. [Thèse de Doctorat en Pharmacie]. Dakar : Université Cheikh Anta DIOP Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie ; 2007, N° 48.
- 13. Moustadier G.** Bactériologie médicale. Paris : Maloine. 1972 : 551-557.
- 14. Louma TM.** Prévalence des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticiliné au CHU du Point G. [Thèse de Doctorat en Pharmacie]. Bamako : Université de Bamako ; 2007.
- 15. Cisse M F.** Staphylococcus DES-BC, Université Cheikh Anta DIOP de Dakar, Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie.
- 16. Verdier I, Vandenesh F, Pina G.** *Staphylococcus*. Microbiologie médicale [en ligne]. [consulté le 20/02/2014]. Disponible sur internet :<<http://www.microbes-edu.org>>
- 17. Simon M.** Métabolisme des glucides [en ligne],[consulté le 20/02/2014]. Disponible sur internet :<<http://www.actualites-pharmacie.com>>
- 18. Ndao K.** Mise au point d'une microméthode d'identification biochimique des Staphylocoques. [Thèse de Doctorat en Pharmacie]. Dakar : Université Cheikh Anta DIOP Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie ; 1999.
- 19. Sow A S.** Métabolisme bactérien dans l'isolement et l'identification de *Streptococcus pneumoniae*, d'*Haemophilus influenzae* et de *Moraxella catarrhalis*. [thèse de Doctorat en Pharmacie]. Dakar : Université Cheikh

Anta DIOP Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie ; 2005, N° 53.

20. **Bakhoum IM.** Contrôle de qualité et validation des différentes microméthodes d'identification bactérienne. [Thèse de Doctorat en pharmacie]. Dakar : U.C.A.D Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie ; 2004, N° 08.
21. **Goldman, Green LH,** Pratical handbook of Microbiology. 2nded. New York: CRC Press; 2009, 74.
22. **Renaud FNR, Borrel T, Marmonier A.** Identification conventionnelle. In: Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C, editors. Précis de bactériologie clinique. Editions ESKA 2000. p. 111.
23. **Konate B.** Microméthodes d'identification et étude de la sensibilité des staphylocoques, entérocoques et streptocoques : intérêt et application dans le diagnostic rapide des infections microbiennes. [Thèse de Doctorat en pharmacie]. Dakar : U.C.A.D Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie ; 2001, N°100.
24. **Lanotte P, Mereghetti, Quentin R.** Démarche de l'examen bactériologique. In: Denis F, Ploy MC, Bingen CME, Quentin R, editors. Bactériologie médicale. Elsevier Masson; 2007. p. 22.
25. **Ndir I.** Mise au point d'une microméthode d'identification des Entérobactéries. [Thèse de Doctorat en Pharmacie], Dakar : Université Cheikh Anta DIOP Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie, 1993, n°5.
26. **Sarr T.** Algorithme d'identification des staphylocoques à coagulase négative et des streptocoques non groupables. [Thèse de Doctorat en Pharmacie], Dakar : Université Cheikh Anta DIOP Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie ; 2004, N° 84

- 27. Dubois D, Leyssene D, Chacornac JP et al.** Identification of a variety of *Staphylococcus* species by Matrix-Assisted Laser Ionization- Time flight Mass Spectrometry. JCM. 2010 Mar; vol. 48 (3): 941-945.
- 28. Nabin KS, Marion JT, Gerri SH, Carlos MI, Gary WP.** Rapid Identification of *Staphylococcus aureus* and the *mecA* Gene from BacT/ ALERT Blood Culture Bottles by Using the Light Cyber system. JCM. 2002 Jul; 40(7): 2659-2661.
- 29. Kloos EW, Schleifer HK.** Simplified Scheme for Routine Identification of Human *Staphylococcus* Species. JCM. 1975 Jan; 1 (1): 82-88.
- 30. Reischl U, Linde H-J, Metz M, Leppmeier, Lehn N.** Rapid Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Simultaneous species Confirmation Using Real-Time Fluorescence PCR. JCM. 2000 Jun; 38 (6): 2429-2433.
- 31. Forsyth RA, Haselbeck RJ, Ohlsen KL et al.** A genome-wide strategy for the identification essential genes in *Staphylococcus* species. Molecular Microbiology. 2002; 43(6): 1387-1400.
- 32. Hardi JM, Whiley A.** Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. Journal of Applied Microbiology Supplement. 1997; 83: S1-11.
- 33. Chuzeville S.** Caractérisation des fonctions codées par les éléments intégratifs conjuguatifs (ICE) intégrés dans un gène codant un ARNt lysine chez *Streptococcus agalactiae* : rôle dans le maintien des ICE, l'adaptation et la virulence de l'hôte. [Thèse de Doctorat d'Université, Science et Technologie] Université de Lorraine Ecole doctoral RP2E; 2012.
- 34. Lô A.** Vancomycine Résistance et haut niveau de Résistance aux Aminosides de souches d'entérocoques isolées à DAKAR.[Thèse de doctorat en Pharmacie]. Dakar : Université CHEIKH ANTA DIOP Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie ; 1998, N° 10.

- 35. Esposito S, Noviello S, Ianniello.** In Vitro Activity of Moxifloxacin Compared to other Fluoroquinolones against Different Erythromycin-Resistant Phenotypes of Group A Beta-Hemolytic Streptococcus (GABHS). 38th ICAAC. San Diego; 1998.
- 36. Denis F et al.** Les infections à streptocoques en Afrique vues par le laboratoire (S. pneumoniae non compris). Bull. Soc. Med. Afr. Nre. Lang. Franc. 1978 ; 23 : 347-350.
- 37. Houkponou E.** Etude comparée de l'identification et de la sensibilité de Streptococcus pneumoniae et Streptococcus pyogenes isolés d'infections humaines (données prospectives à Dakar). [Thèse de Doctorat en Pharmacie]. Dakar : Université Cheikh Anta DIOP Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie ; 2003.
- 38. Pr Bouvet A.** Streptocoques – Entérocoques. [en ligne], [consulté le 20/02/2014]. Disponible sur www.microbes-edu.org.
- 39. Täpp J, Thollesson M, Herrmann B.** Phylogenetic relationships and genotyping of the genus *Staphylococcus* by sequence determination of the RNase P RNA gene, rnpB. Int. J of Syst and Evol Microbiology. 2003; 53: 1861-1871.
- 40. Patterson M J.** *Streptococcus* [*Streptococcus pyogenes*, other streptococci and *Enterococcus*]. Medical Microbiology. 4th edition; 1996 [PubMed].
- 41. Le Minor, Veron M.** Bactériologie Médicale. Flammarion, Médecine Sciences. Paris ; Edition 1989.
- 42. Rimbault A, Renaud NR.** Métabolisme des microorganismes d'intérêt médical. In : Frenet et al, editors. Précis de Bactériologie clinique ; Edition ESKA 2000. p. 65.
- 43. François NS, Manardi JL.** *Enterococcus faecalis*, aspects bactériologique, épidémiologique et thérapeutique, Feuil Biol. 1998. 39 (220) : 21-27.

- 44. Mauris A, Morandi PA, Deom A.** Test rapide pour la détection du streptocoque β -hémolytique du groupe A dans un prélèvement rhinopharyngé. Suisse : centre Suisse de contrôle qualité. Mars 2005. CH-1225 CHENE-BOURG.
- 45. Trieu-Cuot P.** Staphylocoque – symptômes, traitement et recherche de staphylocoque [en ligne], [consulté le 01/02/15]. Disponible sur internet : <<http://www.pasteur.fr>>
- 46. Warda K, Oufdou K, Bouskraoui M.** Portage rhinopharyngé de *Streptococcus pneumoniae* chez les enfants. Int J Biol Chem. February 2012 ; 6(1) : 427-437.
- 47. Dubois D, Segonds C, Prere MF et al.** Identification of clinical *Streptococcus pneumoniae* Isolates among other Alpha and Non-hemolytic Streptococci by use of the Vitex MS Matrix-Assisted Laser Desorption ionization-Time of Flight Mass Spectrometry System. JCM. 2013; 5: 1861-1867.
- 48. Samantha JK, Whatmore AM, Dowson CG.** Nan A, a Neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae*, shows High Levels of Sequence Diversity at least in Part through Recombination with *Streptococcus oralis*. Journal of Bacteriology. 2005 Aug; 187 (15): 5376-5386.
- 49. Marmonier A.** Le diagnostic phénotypique. In: Freney J, Renaud F, Hansen W et Bollet C, editors. Précis de bactériologie clinique. Editions ESKA 2000. p. 89-92.
- 50. Blanchin MD.** Validation des méthodes. Institut des Biomolécules Max Mousseron. Journées Qualité et Chimie 2010 : Une démarche qualité au service de la chimie. 14 Octobre 2010 ; Autrans. p.5 ; p. 21-22 ; p. 24.
- 51. Cabral M.** Validation du contrôle microbiologique des médicaments antituberculeux. [Thèse de Doctorat en Pharmacie]. Dakar : Université Cheikh Anta DIOP Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie ; 2005.

- 52. Recueil des méthodes internationales d'analyse – OIV.** Guide pratique pour la validation, le contrôle qualité et l'estimation de l'incertitude d'une méthode d'analyse alternative œnologique alternative ; Résolution oeno 10/2005.
- 53. Desenfant M, Priel M, Rivier C.** De la validation des méthodes d'analyse à l'évaluation de l'incertitude des résultats de mesure. Laboratoire Nation d'Essais BNM-LNE, Paris 75724.
- 54. Freshney RL.** Sodium pyruvate. Culture of Animal Cells. A Manual Basic technique 4th. New York: Wiley-Liss; 2000.
- 55. Schaechter M, Medoff G, Eisenstein BI.** Microbiologie et pathologie infectieuse. 2th ed. Bruxelles: De Boeck Université; 1995.
- 56. Essers L, Radebold K.** Rapid and Reliable Identification of *S. aureus* by a Latex Agglutination Test. Journal of Clinical Microbiology. 1980 Nov; 12 (5): 641-643.
- 57. Health Protection Agency.** Identification of *Staphylococcus* species, *Micrococcus* species and *Stomatococcus* species. Issue no: 1 Issue date: 21.07.03 Issued by Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory Page 2 of 14; Reference no: BSOP ID 7i1.
Identification of *Streptococcus* species, *Enterococcus* species and morphologically similar organisms. Issue no: 1 Issue date 21.07.2003 Issued by Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory Page 1 of 17; Reference no: BSOP ID 4i1.
- 58. Dr Darbas H, Dr Marchandin H, Dr Bourgeois N, Dr Michaux-Charachon S.** Diagnostic et suivi des infections urinaires : le bon usage de l'examen cytobactériologique des urines. Faculté de Montpellier-Nîmes. MIC néphrologie – Item 93 ; 2006/2007.
- 59. Dr Brun Y, Dr Bes M, Philippon.** *S. saprophyticus* [en ligne], [page consulté le 30/03/2015]. Disponible sur internet : <<http://www.micro-edu.org>>

60. Spanu T, De Carolis E, Fiori B et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to *rpoB* gene sequencing for species identification of bloodstream infection staphylococcal isolates. ; European Society of Clinical Microbiology and Infections Diseases. 2011 Jan; 17 (1): 44-9.

ANNEXES

Préparation de milieux

✓ Milieu urée-tryptophane (annexe 1)

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

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

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

Tableau I : composition milieu urée-tryptophane

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

pH final = 7

- **Préparation**

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

✓ **Milieu Clark et Lubs (annexe 2)**

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

Tableau II: composition milieu Clark et Lubs

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

pH final = $7 \pm 0,2$

- **Préparation**

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

- Le milieu fini présente une coloration jaune et limpide.

✓ Milieu Moeller (annexe 3)

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

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

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

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

Tableau III : composition milieu Moeller : décarboxylases

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

pH = 6,3

- **Préparation**

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

✓ **Milieu nitrate (annexe 4)**

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

Tableau IV : composition milieu nitrate

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

pH final = 7

- **Préparation :**

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

✓ **Milieu ONPG (annexe 5)**

- **Composition** 100 ml d'eau distillée

Tableau V : composition milieu ONPG

Composants	Quantités	Rôles
Poudre ONPG	0,3 g	Molécule analogue du lactose
Eau distillée stérile	100 ml	Solvant

- **Préparation :**

- Mesurer la poudre d'ONPG ;
- Dissoudre dans l'eau distillée stérile.

✓ **Milieu pour la mise en évidence de l'hydrolyse de l'esculine (annexe 6)**

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

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

Tableau VI : composition milieu esculine

Composants	Quantités	Rôles
Peptone	2g	Source de d'azote et de carbone et d'énergie
Citrate de fer ammoniacal	0.2g	Agent révélateur Apport de Fer III
Esculine	0.2g	Hétéroside Essentiel pour la mise en évidence de l'esculinase

pH final : 7,1

L'esculinase présent au sein de la bactérie dégrade l'esculine en glucose et esculétine. L'esculétine se lie au citrate ferrique présent dans le milieu pour former un complexe brun foncé ou noir indiquant une réaction positive.

- **Préparation**

- Mesurer les différents composants du milieu et les dissoudre un par un dans de l'eau distillée ;
- Compléter à 100 ml ;
- Tyndaliser à 60° C 1h pendant 3 jours successifs pour stériliser.

✓ **Milieu BHS (annexe 7)**

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

Tableau VII : Composition milieu bouillon hypersalé

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

pH = 7 – 7,2

• **Préparation**

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

✓ **Milieu MEVAG Staph / Strepto (annexe 8)**

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

Tableau VIII : composition milieu MEVAG Staph / Strepto

Composants	Quantités	Rôles
Extrait pancréatique de caséine	1	Source de C et N
NaCl	0,5	Source d'électrolytes Maintien équilibre osmotique du milieu
Rouge de phénol	0,0018 g	Indicateur coloré

pH = 7,6

- **Préparation**

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

- ✓ **Les glucides** : glucose, mannitol, xylose, saccharose, glycérol, mannose, lactose, raffinose, arabinose, sorbitol, tréhalose, sorbose, inuline, lactose, ribose, amidon.

Tableau XIX : méthode de stérilisation des sucres (annexe 9)

Glucides		Stérilisation	Température et durée
Arabinose	10 %	Tyndallisation ou filtration	60°C 30 minutes x 3 jours
Mannitol	10 %	Autoclavage	110°C 10 minutes
Sorbitol	10 %	Autoclavage	110°C 10 minutes
Tréhalose	10 %	Autoclavage	110°C 10 minutes
Raffinose	10 %	Autoclavage	110°C 10 minutes
Sorbose	10 %	Autoclavage	110°C 10 minutes
Inuline	5 %	Autoclavage	110°C 10 minutes
Lactose	10 %	Tyndallisation ou filtration	60°C 30 minutes x 3 jours
Amidon	2,5 %	Autoclavage	115°C 30 minutes
Glycérol	10 %	Autoclavage	115°C 30 minutes
Glucose	10 %	Autoclavage	110°C 10 minutes
Xylose	10 %	Filtration	
Saccharose	10 %	Tyndallisation ou filtration	60°C 30 minutes x 3 jours
Mannose	10 %	Autoclavage	110°C 10 minutes