

LISTE DES ABREVIATIONS

AFSS PS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

ATCC : American Type Culture Collection

ADH : Arginine dihydrolase

BCC : bouillon Cœur-Cervelle

βGal: Bêta galacto-D pyranoside

CC : Citrate de Christensen

°C : Degré Celsius

CS : Citrate de Simmons

DMSO : Diméthylsulfoxyde

Gel : Gélatinase

GLU : Glucose

GSO : Gélose au Sang Ordinaire

H₂S : Hydrogène sulfuré

IND : Indole

LAC : Lactose

LDC : Lysine décarboxylase

MAL : Malonate

MH : Mueller Hinton

NIT : Nitrate réductase

ODC : Ornithine décarboxylase

PDA : Phényle alanine désaminase

QCE : Contrôle Qualité Externe

QCI : Contrôle Qualité Interne

TDA : Tryptophane désaminase

UFC : Unité Formant Colonie

URE : Uréase

VP : Réaction de Voges Proskauer

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Caractères biochimiques <i>Escherichia coli</i>	6
Tableau II : Caractères biochimiques <i>Escherichia coli</i>	28
Tableau III : Nombre de colonies d' <i>Escherichia coli</i> par semaine.....	31
Tableau IV : Nombre de colonies d' <i>Enterococcus faecalis</i> par semaine	33
Tableau V : Nombre de colonies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par semaine	35

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Courbe de croissance d'une culture bactérienne pure, en milieu non renouvelé	16
Figure 2 : Evolution de la viabilité de la souche d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 à -20°C en fonction du temps de conservation	32
Figure 3 : Evolution de la viabilité de la souche d' <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29812	33
Figure 4 : Evolution de la viabilité de la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	35

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	4
I-1 <i>Escherichia coli</i>	5
I-2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
I-3- <i>Enterococcus faecalis</i>	7
II. RAPPELS SUR LA CROISSANCE BACTERIENNE.....	9
II-1- Définition	9
II-2- Nutrition bactérienne	9
II-3- Mesure de croissance	11
II-4 Les facteurs influençant la croissance :	18
III. CONSERVATION DES SOUCHES MICROBIENNES.....	20
III-1 Définition.....	20
III-2-Méthodes de conservation des souches.....	20
III-2-1 La congélation.....	20
III-2-2 La dessiccation.....	21
III-2-3 Lyophilisation	22
III-2-4 Les applications.....	22
IV. LE CONTROLE DE QUALITE.....	23
IV-1 Définition	23
IV-2 CONTROLE QUALITE EXTERNE (QCE).....	23
IV-3: Contrôle qualité interne (QCI)	24
DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	26
I. CADRE DE L'ETUDE : HOPITAL ARISTIDE LE DANTEC.....	27
II MATERIEL ET METHODES.....	27
II-1 Matériel et réactif d'isolement et d'identification	27
II-2 Matériel et réactifs de conservation des souches	28
III. SOUCHES BACTERIENNES	28
IV. LE CONTROLE DE QUALITE.....	28
Contrôle des milieux de culture.....	28
IV-1. Contrôle de la gélose et des bouillons.....	28
IV-2 Contrôle de la stérilité des milieux préparés	28
IV-3 Contrôle de l'efficacité des milieux et réactifs	29

V. ETUDE DE LA CONSERVATION.....	29
V-1 Isolement et identification d' <i>Escherichiacoli</i> ATCC 25922	29
V-1.1 Isolement	29
V-1.2 Identification.....	29
V-2 Isolement et identification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	30
V-2.1 Isolement	30
V-2.2 Identification.....	30
V-3 Identification d' <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29812	31
V-3.1 Identification.....	31
V-4 La conservation des souches	31
V-4-1 Décongélation des souches	32
V-4-2 Etude de la viabilité des souches conservées	32
VI- RESULTATS	34
VII- DISCUSSION	40
Conclusion	42
Bibliographie	45
Webographie.....	49
Annexes	

INTRODUCTION

Les infections bactériennes dues à *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Enterococcus faecalis*, diverses dans leurs manifestations cliniques, sont parmi les plus fréquentes en pathologie infectieuse.

Elles représentent aujourd'hui un problème de santé publique en Afrique du fait des difficultés d'identification et de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques.

En effet, *Escherichia coli* est responsable de 80 à 90% des infections urinaires communautaires, *Enterococcus faecalis* 5 à 15% des endocardites bactériennes et *Pseudomonas aeruginosa* constitue l'une des principales bactéries responsables d'infections nosocomiales [18 ; 24 ;26 ;28].

En plus de ce fort taux de prévalence, s'ajoute un accroissement de la résistance aux antibiotiques entraînant ainsi une difficulté de prise en charge de ces infections.

Cependant, l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques est de plus en plus liée à une antibiothérapie inadéquate qui peut être due à de mauvaises conditions de réalisation de l'antibiogramme mais également aux difficultés d'identification formelle des bactéries.

Ainsi il devient indispensable de disposer et de bien conserver des souches de référence dans le but de faire des contrôles de qualité interne des milieux de cultures, des disques d'antibiotiques afin d'obtenir des résultats fiables.

L'objectif de notre étude est de définir une méthode de conservation des souches de référence *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, et *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 qui soit adéquate et accessible à tous les laboratoires

C'est dans ce cadre que nous étudions leur viabilité après conservation dans du BCC à 10% de glycérol à une température de -20°C pendant 15 semaines afin de déterminer la date limite de conservation au cours du temps.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES SOUCHES ETUDIEES

I-1 *Escherichia coli*

I-1-1 Caractères morphologiques

Escherichia coli ou colibacille est une entérobactérie mesurant 2 à 4 μ de long sur 0,4 à 0,6 μ de large [21].

C'est une bactérie fine et allongée à extrémités arrondies, mobile grâce à une ciliature péritriche [14].

I-1-2 Caractères cultureux [26 ; 31 ; 36]

Escherichia coli pousse facilement sur les milieux ordinaires en 24h à 37°C en aérobiose et en anaérobiose. Ces exigences nutritionnelles sont en général réduites et la bactérie se multiplie en milieu synthétique avec source de carbone simple comme le glucose.

Sur milieu gélosé les colonies sont lisses, brillantes, de structure homogène [5].

I-1-3 Caractères biochimiques

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

L'étude de l'activité enzymatique et de la fermentation des sucres est réalisée à l'aide de micro-méthodes validées disponibles dans le commerce sous forme de galeries [21 ; 23].

Escherichia coli fermente le glucose et le lactose avec une production de gaz, il est dépourvu d'une uréase, produit de l'indole, n'utilise pas le citrate de Simmons comme source de carbone, ne produit pas d'hydrogène sulfuré. Ces différents tests sont regroupés dans le tableau suivant

Tableau I: Caractères biochimiques d'*Escherichia coli* [21]

Tests	ADH	B GAL	CC	CS	GEL	IND	MAL	PDA	LDC	ODC	TDA	URE	NIT	GLU	LAC	VP	ESC	H2S
Résultats	+/-	+	+	-	-	+	-	+/-	+	+	+	+/-	-	+	+	-	-	-

Légende :

(+) Caractère positif ; (-): Caractère négatif ; (+/-): caractère inconstant

ADH : Arginine dihydrolase, β Gal: Bêta galacto-D pyranoside, CC : Citrate de Christensen, CS : citrate de Simmons, Gel : Gélatinase, H2S : Hydrogène sulfuré, IND : Indole, MAL : Malonate, PDA : Phényl alanine désaminase, LDC : Lysine décarboxylase, ODC : Ornithine décarboxylase, URE : Uréase, NIT : Nitrate réductase, VP : Réaction de Voges-Proskauer, TDA : Tryptophane désaminase, GLU : Glucose, LAC : Lactose

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

I-2 *Pseudomonas aeruginosa*

I-2-1 Habitat

Ce sont des bacilles à Gram négatif non fermentaires, ubiquitaires et saprophytes très répandues dans l'environnement, en particulier dans celui hydrique [12].

I-2-2 Caractères morphologiques [8; 25]

Bacilles fins et longs de 1-3 μ m de long sur 0.5-1 μ m de large.

Pseudomonas aeruginosa est anciennement appelé pyocyanique du fait de sa capacité à donner un pigment de couleur bleu-vert. Il est mobile polaire avec ciliature de type monotriche [8;31].

I-2-3 Caractères cultureux

Le genre *Pseudomonas* est facile à cultiver sur de nombreux milieux de culture en aérobiose à 37°C ou 30°C. Les colonies larges isolées, grandes, au centre bombées et à bord irrégulier (œuf sur le plat), dégagent une odeur aromatique [3 ; 10].

Il produit un pigment bleu (la Pyocyanine) soluble dans l'eau et le chloroforme spécifique de *Pseudomonas aeruginosa* permettant ainsi de faire le diagnostic différentiel

I-2-4 Caractères biochimiques [3; 9 ; 10 ; 31]

Les *Pseudomonas* constituent le modèle des bactéries oxydantes ou dites *oxybiontiques* [9]. Le rendement de la croissance est strictement dépendant de la concentration en oxygène dissout.

- Les enzymes de la glycolyse (voie fermentative d'Embden-Meyerhof) sont absentes,
- L'oxydation complète du glucose en aérobiose est réalisée dans le shunt de l'hexose monophosphate ou voie de Warburg-Dickens-Horecker par l'intermédiaire du 6 P-gluconate, la voie du 2-céto-3 désoxygluconate (voie d'Entner-Doudoroff aboutissant au pyruvate qui alimente le cycle de Krebs). D'où l'intérêt du milieu de Hugh et Leifson (acidification dans le tube sans vaseline en aérobiose).

I-3-*Enterococcus faecalis*

I-3-1-Historique [24]

Pendant très longtemps, les enterocoques ont été classés au sein du genre *Streptococcus* jusqu'à 1984, où une analyse du génome indique qu'il était plus approprié de créer le genre *Enterococcus*. Cet amalgame est dû au fait que les

entérocoques possèdent l'antigène de paroi D, partagé par les bactéries du genre *Streptococcus*. Le genre *Enterococcus* et le sous genre *Streptococcus* D peuvent être différenciés par la salinité d'un milieu. En effet, les entérocoques peuvent être cultivés en milieu hypersalé.

I-3-2- Habitat [3]

Ces bactéries font partie de la flore commensale et se retrouvent dans le tractus génito-urinaire et dans le tractus digestif.

I-3-3- Caractères morphologiques

Les entérocoques sont des Cocci à Gram positif caractérisés par un certain polymorphisme :

Coques de dimensions souvent irrégulières, en diplocoques ou courtes chainettes. Ils sont immobiles et sans capsule [20]

I-3-4- Caractères culturels [10 ; 16 ; 18; 24]

Ce sont des bactéries non exigeantes et ils peuvent pousser sur gélose ordinaire. Leur culture est plus aisée et plus abondante que celle des streptocoques. Elles présentent un trouble en bouillon et des colonies légèrement opalescentes de plus ou moins 1,5 mm sur gélose.

Sur gélose au sang ordinaire les colonies présentent une hémolyse de type bêta.

I-3-5- Caractères biochimiques [3; 5]

Le milieu le plus utilisé pour la mise en évidence des entérocoques est le milieu bile-esculine. Les entérocoques poussent en faisant virer le milieu au noir : le noircissement du milieu traduit l'hydrolyse de l'esculine en esculetine qui se lie avec le fer.

I-3-6- Identification [24]

Les principaux caractères les différenciant des streptocoques sont les suivants:

- Ils résistent 1/2 heure à 60 °C,
- Ils peuvent pousser entre 10 et 40 °C (streptocoques: 37 °C),
- Ils peuvent pousser en bouillon additionné de 40 % de bile (les streptocoques sont inhibés, les pneumocoques sont dissous),
- Ils tolèrent jusqu'à 6,5 % de NaCl,
- Ils fermentent l'esculine.

II. RAPPELS SUR LA CROISSANCE BACTERIENNE

II-1- Définition [17 ; 25 ; 28]

La croissance bactérienne est l'accroissement ordonné de tous les composants d'un organisme.

Chez la bactérie elle aboutit à une augmentation du nombre d'individus, Il ya multiplication d'une bactérie, donnant naissance par scissiparité, à deux nouvelles bactéries identiques.

Au court de la croissance, le milieu s'appauvrit en éléments nutritifs disponibles et s'enrichit en produit du catabolisme, souvent toxiques.

II-2- Nutrition bactérienne [19]

Toute bactérie vivante a besoin d'aliment qui lui sert de matériaux de constructions et de sources d'énergie nécessaire à la synthèse de ces constituants pour la croissance ainsi que le maintien de sa vie en dehors de toute croissance

Les besoins nutritifs des bactéries sont les suivants :

- Besoins alimentaires ;
- Besoins énergétiques ;
- Besoins spécifiques.

II-2-1 Besoins alimentaires [9; 16; 17 ; 25; 28; 31]

Les besoins alimentaires correspondent aux divers aliments constitutifs des bactéries tels que :

➤ Le carbone

Le carbone est l'un des aliments les plus abondants de la bactérie. L'anhydride de carbone est la seule source de carbone des bactéries autotrophes tandis que les bactéries hétérotrophes ne l'utilisent que facultativement, elles dégradent une grande quantité des substances hydrocarbonées (alcool, acide lactique, acide acétique etc.).

➤ L'azote et le soufre

Les bactéries ont besoin de substances azotées pour synthétiser leurs protéines. Elles fixent l'azote atmosphérique ou incorporent de composé azoté

Le soufre est incorporé par les bactéries sous forme de sulfates ou de composés organiques.

➤ Le phosphore

Le phosphore fait parti des acides nucléiques et intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques. Il permet la répartition, l'accumulation et la distribution de l'énergie dans la bactérie. Il est incorporé sous forme de phosphate inorganique.

➤ Autres éléments

D'autres éléments jouent un rôle dans le métabolisme bactérien (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl) et dans les réactions enzymatiques (Ca^{2+} , Fe^+ , Mn , Se , Cu , Co et vitamines).

II-2-2 Les besoins énergétiques [16; 17; 28]

Les besoins énergétiques couvrent les dépenses engagées dans la synthèse des molécules contenant des liaisons riches en énergie telles que l'ATP, le glucose6-P, l'acétylCoA. Ainsi les bactéries doivent trouver dans leur environnement les substances nécessaires à leur synthèse cellulaire. La gamme de substrat utilisé comme sources d'énergie est spécifique à chaque espèce :

- La bactérie phototrophe utilise l'énergie lumineuse pour la photosynthèse
- Les bactéries chimiotrophes puisent leurs énergies à partir de composés minéraux ou organiques
- La grande partie des bactéries d'intérêt médical utilisent le glucose comme substrat.

II-2-3 Les besoins spécifiques [5 ; 9; 17]

Certaines bactéries ont besoins d'un ou de plusieurs composés organiques qu'elles sont incapables de synthétiser.

L'apport de ces composés appelés facteurs de croissance dans les milieux de culture est indispensable à la croissance de ces bactéries autotrophes.

Les facteurs de croissance varient selon les espèces bactériennes : il peut s'agir d'acides aminés, de bases puriques ou pyrimidiques, des vitamines.

II-3-Mesure de croissance [34 ; 37]

Il existe différentes méthodes de mesure de la croissance microbienne :

- On utilise des méthodes de quantification des bactéries: en fonction du temps,
- On suit l'évolution du nombre de micro-organismes par unité de volume du milieu.

Les conditions expérimentales de mesure de la croissance nécessitent:

- Une population homogène.
- Des paramètres physico-chimiques optimums.
- Une certaine quantité de nutriments.

II-3-1- Mesure du nombre de cellules :

II-3-1-1- Méthodes directes, détermination du nombre de cellules par unité de volume :

II-3-1-1-1 Numération directe au microscope optique :

La méthode est utilisée couramment pour les microbes de grande taille. Pour cela, on utilise un hématimètre.

Pour les bactéries de plus petites tailles, on utilise des grossissements forts, ce qui réduit la profondeur du champ donc, on utilise une chambre de comptage spéciale dont la profondeur de la cuvette est dix fois plus faible que celle d'un hématimètre.

Il y a une autre possibilité pour dénombrer les bactéries de petite taille, c'est la technique de Breed [39].

❖ Inconvénients :

- Il faut une suspension très dense pour pouvoir compter les bactéries présentes ;
- C'est une technique longue et fastidieuse.
- Si les bactéries sont mobiles, il faut ajouter du formol à 10%.
- Si les bactéries forment des amas, on compte difficilement les colis.

❖ **Avantages :**

- c'est une technique peu coûteuse
- Il apporte des informations sur la morphologie des cellules.

II-3-1-1-2- Numération au microscope optique à épi fluorescence:

Il détecte la fluorescence des cellules qui sont marquées par un fluorochrome.

L'acridine orange se fixe à l'ADN :

- Lorsque l'ADN est sous forme double brin : fluorescence verte.
- Lorsque l'ADN est sous forme simple brin : fluorescence orange.

❖ **Avantage:**

- Permet de différencier les cellules mortes des cellules vivantes.

❖ **Inconvénients :**

- Longue et fastidieuse.
- Onéreuse.
- Le marquage est transitoire.
- Les cellules en cours de division apparaissent orangées.
- Difficulté de comptage si les bactéries forment des amas.

II-3-1-2- Méthodes indirectes, dénombrements après culture [37] :

Le dénombrement des micro-organismes viables après culture est peu utilisé. Il peut s'agir de dénombrement en milieu liquide ou en milieu solide. Dans la plupart des cas, une série de dilution au 10^{ème} de l'échantillon à analyser, est réalisée.

La principale méthode parfois utilisée est le dénombrement en milieu solide. Ce type de dénombrement repose sur le principe, sur lequel chaque bactérie, après incubation, donne naissance à une colonie repérable macroscopiquement. Cependant, les bactéries ou les levures formant des groupements en suspension ne donneront qu'une seule colonie, c'est pourquoi, on n'exprime pas le résultat en nombre de cellules mais en unité formant colonie (UFC) par unité de volume.

II-3-1-2-1- Dénombrement dans la masse:

Après incubation, le nombre de colonies apparues dans la gélose peut être compté et représente le nombre d'UFC présents dans l'inoculum. Cette opération doit être effectuée en double essai avec les différentes dilutions de l'échantillon à analyser.

L'objectif est d'obtenir un nombre de colonie compris entre :

- 15 et 150 colonies dans le cas d'un milieu sélectif ou contenant un indicateur coloré de pH.
- 30 à 300 colonies dans le cas d'un milieu non sélectif.

II-3-1-2-2- Dénombrement en surface:

- Etalement en surface de la gélose :

On utilise une gélose solide coulée en boîte de Pétri. On étale 0,1 ml de suspension ou de sa dilution à la surface de la gélose à l'aide de bille de verre ou d'un râteau.

- Culture sur membrane filtrante :

Cette technique a pour but de concentrer les micro-organismes présents dans un grand volume de liquide. Les éléments du milieu gélosé vont diffuser vers les bactéries pour permettre leur croissance.

Après incubation, les colonies apparues sont comptées, il ne faut pas que le nombre de colonie soit supérieur à 100.

❖ **Avantages :**

- Permet d'analyser des produits solides et liquides.
- Relativement fiables.
- Permet la culture de tous les micro-organismes étudiés.

❖ **Inconvénients :**

- Ne permet pas d'analyser des volumes importants de liquides.
- Durée longue 24h d'incubation au minimum.

II-3-1-2-3 Détermination du poids sec [19] :

Les micro-organismes sont récoltés par centrifugation ou par filtration sur membrane.

Après lavage soigneux à l'aide d'un tampon approprié, le culot, ou le filtre, est desséché à environ 100°C. On laisse refroidir à température ambiante puis les micro-organismes sont pesés. On exprime le résultat en gramme de matière sèche par litre.

Avantages :

- technique peu coûteuse

Inconvénients :

- Pas de distinction entre cellules mortes et cellules vivantes.

- Technique délicate et les différentes étapes de lavage et de séchage peuvent conduire à des pertes de matières cellulaires.

II-3-2 Mesure de l'activité cellulaire :

II-3-2-1 Mesure de la consommation de substrat :

La quantité de substrat consommé dans un milieu pendant un temps donné va refléter la quantité de germes présents.

L'avantage est que l'on compte les cellules vivantes et l'inconvénient est que c'est peu fiable [17].

II-3-2-2 Etude de la croissance en milieu non renouvelé [37]:

Elle se fait dans un erlenmeyer contenant un bouillon nutritif dans lequel aucune substance nutritive n'est ajoutée au cours de l'expérience.

Pour cela, il fautensemencer un bouillon avec 10^5 bactéries.

Le milieu est agité et toutes les heures, il faut prélever un échantillon sur lequel on réalise le comptage des bactéries.

La figure 1 suivante représente les différentes phases de croissance de la bactérie en milieu de culture non renouvelé

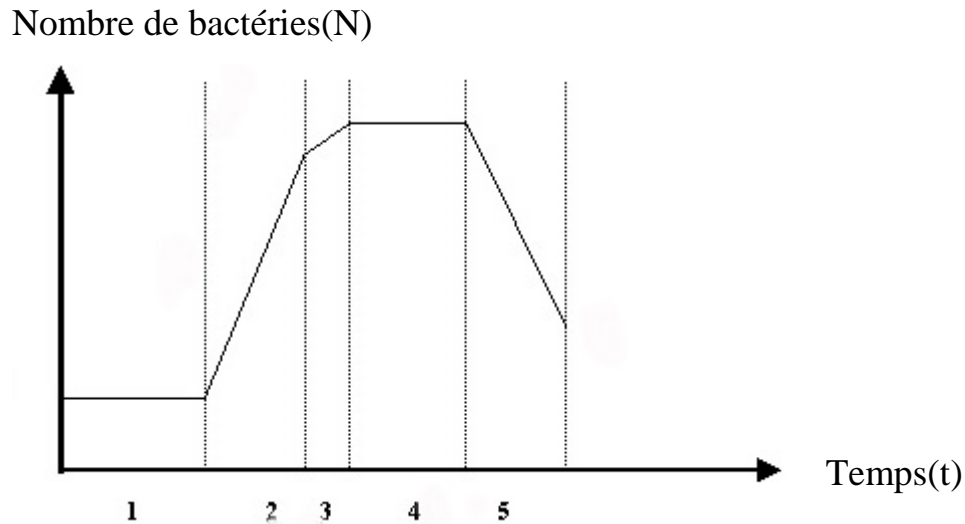


Figure1: Courbe de croissance d'une culture bactérienne pure, en milieu non renouvelé [19;21]

- 1 : Phase de latence
- 2 : Phase de croissance
- 3 : phase de ralentissement
- 4 : Phase stationnaire
- 5: Phase de déclin

- **Phase de latence :**

Elle correspond au temps nécessaire pour les bactéries présentes dans l'inoculum de mettre en place tous les systèmes enzymatiques dont elles ont besoin pour leur croissance. Ces systèmes peuvent être soit inactifs, soit absents, c'est-à-dire que soit la bactérie ne se multiplie pas, soit la bactérie ne dispose pas de systèmes enzymatiques nécessaires au catabolisme des substrats du milieu de culture. Les bactéries nécessitent du temps pour induire l'expression de nouvelles enzymes.

- **Phase de croissance :**

Les bactéries se multiplient grâce à leurs équipements enzymatiques, et leur métabolisme se déroule normalement. Le taux de croissance augmente pour atteindre le maximum.

- **Phase de ralentissement**

La vitesse de croissance régresse du fait de l'appauvrissement du milieu de culture et d'une accumulation des déchets.

- **Phase stationnaire :**

Différents facteurs permettent d'expliquer l'existence de cette phase :

- Il n'y a plus de substrat car la quantité est limitée,
- La production de déchets n'est pas éliminée.

- **Phase de déclin :**

Les cellules sont mortes car il n'y a plus de nutriments, plus de multiplication. Il y a lyse des cellules par des déchets ou des enzymes libérées.

II-4 Les facteurs influençant la croissance :

II-4-1- La composition influençant la croissance:

Les substances chimiques qui composent un milieu peuvent avoir 3 types d'effets sur la croissance :

- Stimuler la croissance ;
- Inhiber la croissance ;
- Arrêter définitivement la croissance.

II-4-2- Nature et concentration des substrats :

La vitesse spécifique de croissance d'une espèce dépend étroitement du milieu dans lequel on la cultive.

II-4-3-La température [9 ; 10 ; 11]

Pour une espèce donnée, on peut définir une température optimale de croissance, selon la valeur optimale de la température. Dans les conditions expérimentales optimales de milieu, on peut observer trois types de courbe de croissance correspondant aux trois principales catégories de micro-organismes: On définit plusieurs classes de bactéries suivant la gamme de température dans laquelle elles se développent :

- Bactéries psychrophiles se développent jusqu'à une température inférieure à 20°C.
- Bactéries mésophiles se développent dans une gamme de température comprise entre 10° et 45°C.
- Bactéries thermophiles se développent à une température supérieure à 45°C.

II.4.4. Le pH [10 ; 11 ; 28]

La plupart des bactéries se développent lorsque le pH est compris entre 5,5 et 9. Il existe néanmoins des bactéries acidophiles se développant à des pH très bas, jusqu'à un pH = 1, et des bactéries alcalinophiles se développant à des pH très élevés.

II-4-5- La disponibilité en eau [11; 21]

Un certain taux d'humidité est nécessaire pour permettre le développement bactérien. On retrouve dans la nature des bactéries partout où il y a de l'eau sous forme liquide.

III. CONSERVATION DES SOUCHES MICROBIENNES

III-1-Définition [17 ; 31]

C'est une méthode utilisée dans les laboratoires pour conserver les cultures des différentes espèces microbiennes isolées. L'objectif de la conservation est de garder constant l'ensemble des propriétés morphologiques, métaboliques, génétiques et physiologiques. Elles sont fréquemment utilisées soit pour l'enseignement, soit pour le contrôle, soit pour la recherche, soit pour la production industrielle.

III-2-Méthodes de conservation des souches

III-2-1-Congélation [17;22; 38]

La technique de conservation la plus pratique est d'inhiber leur développement par la congélation ou la réfrigération. Cette méthode est particulièrement importante en microbiologie alimentaire. Deux paramètres importants parmi d'autres conditionnent la mise en œuvre de ce procédé : le choix de la température et surtout la vitesse d'abaissement à la température choisie.

Pour conserver dans des meilleures conditions les structures cellulaires, Il convient de congeler dans les plus brefs délais à la température la plus basse (souvent de -25°C à -80°C) qui arrête la croissance des micro-organismes. De plus, l'addition d'agents dits cryoprotecteurs permettra d'éviter au maximum les altérations cellulaires dues au refroidissement. Mais ces agents seront d'autant plus efficaces que la vitesse de congélation sera faible.

En général, on travaille avec une vitesse de congélation de -1°C. min⁻¹ jusqu'à - 30°C. min⁻¹ ou - 40°C. min⁻¹, avec comme agent cryoprotecteur du glycérol à 10% ou du DMSO (diméthylsulfoxyde). Ensuite, les souches congelées seront conservées sous azote liquide à - 196°C ou sous vapeur d'azote

à -120°C parce que l'azote liquide bloque les enzymes comme les ribonucléases (RNAses) qui sont actives à des températures supérieures à -70°C et dégradent les prélèvements à long terme [39].

Pour leur remise en culture, il sera préférable d'assurer une décongélation la plus rapide possible.

- Certains micro-organismes sont tués par la rupture des membranes due à la formation des cristaux de glace
- La conservation au froid est coûteuse en énergie et en surveillance.

III-2-2-Dessiccation [22, 38]

L'eau est le solvant des réactions chimiques du vivant. Après dessiccation, les réactions chimiques sont arrêtées (au moins ralenties) et la conservation effective.

C'est un procédé simple à mettre en œuvre, consiste à déshydrater en utilisant la chaleur sèche ou des produits chimiques comme l'anhydride phosphorique. Pour cette opération, les microorganismes sont disposés sur des supports inertes (bandes de papier, cylindres pré séchés d'amidon, de dextrane, disques de gélatine, billes de verre, etc.).

Après la dessiccation, il faut assurer un stockage parfaitement sec, en général vers $0-4^{\circ}\text{C}$ (conteneur étanche avec dessiccateur dans une ambiance réfrigérée).

La revivification s'effectue par immersion dans du milieu de culture.

III-2-3-Lyophilisation [22, 29, 38]

C'est un procédé de conservation des produits biologiques par dessiccation sous vide à basse température. Ici, les suspensions de microorganismes sont tout d'abord congelées à basse température puis mises sous vide.

L'abaissement de la pression en dessous du point d'équilibre, dit point triple ($P = 610 \text{ Pa}$, $T^\circ = 0,01^\circ\text{C}$), entraîne une sublimation de la glace, c'est-à-dire son passage de l'état solide à l'état gazeux sans passer par la phase liquide. La phase de désorption permet d'éliminer l'eau restante. Protégées de l'oxygène, de l'humidité et de la lumière, les suspensions peuvent ainsi être conservées pendant très longtemps, en utilisant des agents cryoprotecteurs comme le lait écrémé pour éviter l'altération des micro-organismes.

La formation d'une poudre qui est facile de conserver en ampoules scellées pour une durée très longue et ordinaire.

Pour la revivification (réhydratation) il faut ajouter un milieu de culture dans l'ampoule de lyophilisat ; ensuite, incuber dans les conditions spécifiées de température et d'atmosphère

La lyophilisation n'est pas compatible avec tous les microorganismes. Dans certains cas elle occasionne des altérations cellulaires et génétiques.

III-2-4-Les applications

- La conservation est plus utilisée en microbiologie industrielle et biotechnologie.
- Importance médicale :

La conservation d'une souche isolée sur un patient et transmise pour études complémentaires (typages moléculaires, études de réactions particulières vis à vis d'antibiotiques ...) et dans le cadre d'une enquête épidémiologique.

IV. LE CONTROLE DE QUALITE

IV-1 Définition [1]

Le domaine de la qualité utilise un vocabulaire spécifique qu'il est important de maîtriser pour tout biologiste

Pour cela, il convient de se reporter aux définitions de la norme ISO 15189 version 2012 [40] (qui définit les exigences particulières concernant la qualité et la compétence, pour les laboratoires d'analyse de biologie médicale) et du guide de bonne exécution des analyses biologiques médicales pour les termes suivants [7]:

Qualité : la qualité, est l'aptitude d'un produit, d'un service rendu ou d'un procédé, à satisfaire les besoins exprimés et implicites de l'utilisateur

Contrôle de qualité : ensemble des procédés mis en œuvre dans un laboratoire en vue de permettre un contrôle de qualité des résultats des analyses au fur et à mesure de leur exécution

Echantillon de contrôle : échantillons adaptés à la méthode utilisée et destinés à apprécier l'exactitude et la précision des résultats obtenus

IV-2 Contrôle de qualité externe (QCE) [1 ; 4;7]

Définition : Selon l'OMS l'assurance externe de la qualité peut être également appelée «évaluation de la qualité ». Il permet au microbiologiste de faire évaluer la qualité de son travail par le laboratoire national de référence, ce même laboratoire étant contrôlé par un « supra laboratoire » de niveau international [1].

Les résultats du laboratoire sont périodiquement contrôlés par un laboratoire de référence.

Dans certains pays la participation à ce contrôle est rendue obligatoire par des textes, et est payante dans certains pays.

Objectifs du contrôle qualité externe :

- Inciter les microbiologistes à se mettre à jour régulièrement ;
- Inciter à la standardisation des techniques ;
- Identifier les anomalies et y remédier collectivement ;
- Evaluer et comparer les résultats des laboratoires du pays.

IV-3: Contrôle qualité interne (QCI)

IV-3-1 Définition et objectifs: [1, 4]

Le contrôle de qualité interne ou QCI est un « auto contrôle », au cours duquel chaque microbiologiste doit contrôler toute technique de laboratoire qu'il pratique. Ce contrôle a pour but d'assurer :

- La précision et la fiabilité de la technique des tests de sensibilité ;
- La performance des réactifs utilisés dans les tests ;
- La performance du personnel qui effectue les tests et la lecture.

Afin de répondre à cela, plusieurs souches de référence peuvent être utilisées exemple :

- *E. coli* ATCC 25922 :
- *P. aeruginosa* ATCC 27853 :
- *S. aureus* ATCC 25923 :
- *E. faecalis* ATCC 29812 :

IV-3-2-Contrôle du pH du milieu

Le pH doit être contrôlé pour chaque nouveau lot de M.H, à l'aide d'un pH mètre. En effet toute variation de pH affecte l'activité des aminosides, des macrolides et des phénicolés.

IV-3-3- Souches de référence :

Dès leur réception, les souches de référence doivent être isolées sur milieu adéquat, une gélose nutritive ordinaire suffit pour les bactéries non exigeantes.

A partir de cette culture faire 12 congélations à -70°C. Chaque mois sortir un tube du congélateur.

Refaire 12 congélations pour l'année suivante à partir du 12ème tube de conservation [4].

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL

I. CADRE DE L'ETUDE : HOPITAL ARISTIDE LE DANTEC

I. Cette étude a été réalisée à l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du Laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec entre le 4 Juillet et le 17 Octobre 2012.

II MATERIEL ET METHODES

II-1 Matériel et réactif d'isolement et d'identification

- Anse de platine ;
- Boîtes de pétri ;
- Bec bunsen ;
- Gélose au sang ordinaire ;
- Jarre d'incubation ;
- Générateur de CO₂ ou bougie ;
- Etuve à 37°C ;
- Autoclave ;
- Lames porte-objet ;
- Microscope optique ;
- Pipettes pasteur ;
- Peroxyde d'hydrogène 3% ;
- Ecouvillons stériles ;
- Tubes à hémolyse ;
- Disque d'oxydase.

II-2 Matériel et réactifs de conservation des souches

- Tube NUNC
- Bouillon cœur cerveau
- Glycérol
- MH en boîte
- Congélateur à -20°C
- Eau physiologique

III. SOUCHES BACTERIENNES

Elle a porté uniquement sur des souches de référence qui ont été déjà identifiées et conservées au laboratoire à -20°C :

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Enterococcus faecalis* 29812
- *Escherichia coli* ATCC 25922

IV. LE CONTROLE DE QUALITE

❖ Contrôle des milieux de culture

IV-1 Contrôle de la gélose et des bouillons

- Vérifier la date de péremption du milieu en poudre disponible
- Respecter l'épaisseur de la gélose en coulant le milieu dans des boîtes de pétri de 4mm environ

IV-2 Contrôle de la stérilité des milieux préparés

Les milieux préparés sont incubés à l'étuve dans les mêmes conditions que les bactéries à étudier c'est-à-dire à 37°C pendant 24h

Au terme de l'incubation, l'absence de culture sur les milieux incubés traduit la stérilité du milieu.

IV-3 Contrôle de l'efficacité des milieux et réactifs

Les milieux préparés sont testés avec des souches et incubés à l'étuve à 37°C pendant 24h.

Après incubation, on observe la présence de pousse bactérienne

V. ETUDE DE LA CONSERVATION

Une identification sommaire a été faite avant la conservation, pour s'assurer de la pureté des souches.

V-1 Isolement et identification d'*Escherichia coli* ATCC 25922

V-1-1 Isolement

Escherichia coli ATCC 25922 est une souche de référence disponible au laboratoire et congelée à -20°C dans du BCC à 10% de glycérol dans des tubes NUNC.

Un tube NUNC est récupéré du congélateur et déposé sur la paillasse à la température du laboratoire pendant 20 minutes pour la décongélation

Ensuit un repiquage sur gélose MH suivi d'une incubation à l'étuve pendant 24h pour des colonies jeunes

V-1-2 Identification

- **Examen macroscopique**

Escherichia coli se présente sous forme de grosses colonies de type «S» à bord régulier.

- **Examen microscopique**

Nous avons effectué à partir d'une colonie, un frottis que l'on a coloré au GRAM puis observé au microscope optique à l'objectif x100.

Nous observons des bacilles à GRAM négatif.

- **Caractères biochimiques**

Nous réalisons une mini galerie pour l'étude de l'activité enzymatique et la fermentation des sucres.

Tableau II : Caractères biochimiques d'*Escherichia coli*.

TEST	LAC	GLU	GAZ	MAN	MOBILITE	URE	IND	CS
RESULTATS	+	+	+	+	-	-	+	-

LAC: Lactose; GLU: Glucose; MAN: Mannitol; URE: Uréase; IND: Indole

CS: Citrate de Simmons ; (+): Positive ; (-): Négatif

V-2 Isolement et identification de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

V-2-1 Isolement

La souche est décongelée et repiquée sur gélose MH puis incubée à l'étuve pendant 24h à 37°C pour obtenir des colonies jeunes.

V-2-2 Identification

- **Examen macroscopique**

Pseudomonas aeruginosa se présente sous forme de colonies de grande taille qui s'étalent sur toute la gélose avec la production d'un pigment verdâtre.

- **Examen microscopique**

Au microscope nous observons des bacilles à GRAM négatif longs et fins.

- **Caractères biochimiques**

Pseudomonas aeruginosa présente sous forme de bacilles non fermentaires dépourvus d'une catalase et possédant une oxydase.

V-3 Isolement et identification des *Enterococcus faecalis* ATCC 29812

V -3-1 Identification

- **Examen macroscopique**

Sur milieu MH les colonies sont petites opalescentes. Sur gélose au sang ordinaire les colonies sont beta hémolytiques.

- **Examen microscopique**

Au microscope les entérocoques se présentent sous forme de cocci à GRAM positif disposés en courtes chaînettes et parfois en diplocoques

- **Caractères biochimiques**

Le milieu le plus utilisé pour la mise en évidence des entérocoques est le milieu bile-esculine.

En présence d'entérocoques incubés à 37°C à l'étuve pendant 24h le milieu vire au noir traduisant l'hydrolyse de l'esculine en esculétine qui se lie avec le fer. Ils poussent dans les bouillons hyper salés.

V-4 La conservation des souches

Après isolement et identification, les souches bactériennes sont repiquées sur gélose MH, incubée à 37°C pendant 24h afin d'obtenir des colonies jeunes en phase de croissance.

Une suspension bactérienne de 0.5 Mac Farland est repiquée à partir des colonies puis répartir dans 15 tubes Nunc à raison de 50µl par tube, porté sur chaque tube Nunc, une étiquette avec les mentions suivantes :

- nom de la souche ;
- numéro de code ;
- date de conservation.

Les 14 tubes sont placés sur un portoir puis conservés immédiatement au congélateur à -20°C. L'autre tube estensemencé sur MH pour dénombrer les bactéries au début de l'étude.

V-4-1 Décongélation des souches

Chaque semaine, un tube est récupéré du congélateur -20°C et déposé sur la paillasse à la température ambiante pendant 20min pour une décongélation progressive. Après décongélation, nous avons procédé à l'identification sommaire et au dénombrement des bactéries.

V-4-2 Etude de la viabilité des souches conservées

Après décongélation, une dilution au centième (100µl de suspension bactérienne+10ml d'eau physiologique) est préparée, puis une série de dilution en cascade jusqu'à 10^{-6} .

Ensuite ensemencer 1ml la dernière dilution sur gélose MH par inondation puis incubé à l'étuve pendant 24h à 37°C, ce qui nous a permis d'avoir des colonies nettes et faciles à compter à l'œil nu.

Ainsi le nombre de bactéries viables dans la suspension initiale est exprimé en UFC/ml suivant la formule :

$$N = \frac{n}{V} \times d$$

N = nombre de bactéries viables

n= Nombre de colonies dénombrées

V = Volume de l'inoculumensemencé = 1 ml

d = l'inverse du facteur de la dilution= 10^6

VI. Résultats

Les résultats obtenus par dénombrement des différents germes étudiés sont regroupées dans les tableaux III, IV, et V

Tableau III: nombre de colonie de *E .coli* par semaine

SEMAINES	<i>E.coli</i> : nombre de colonie x10 ⁶ UFC/ml
0	80
1	78
2	77
3	75
4	74
5	72
6	70
7	69
8	68
9	66
10	65
11	64
12	63
13	63
14	60

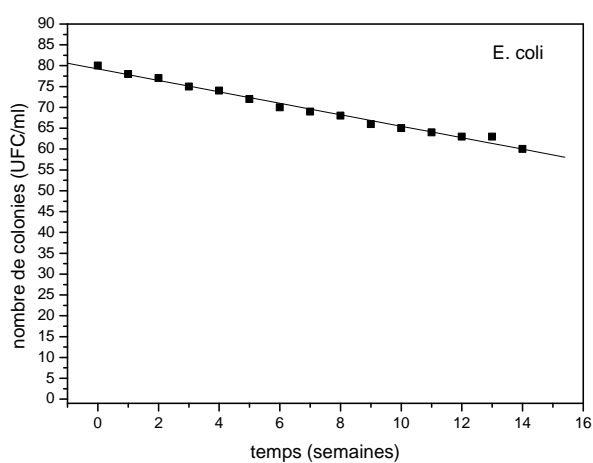


Figure 2 : Evolution de la viabilité de la souche d'*Escherichia coli* ATCC 25922 à -20°C en fonction du temps de conservation

❖ Détermination du temps où nous notons une absence de colonie à -20°C

La courbe définit le modèle mathématique suivant :

$$Y = A + B * X$$

Paramètre

$$A \quad 79,22$$

$$B \quad -1,37$$

$$R \quad -0,99417$$

$$y = -1,37x + 79,22 \quad \mathbf{15} \quad \mathbf{<0.0001}$$

$$-1,37x + 79,22 = 0$$

$$X = -79,22 / -1,37$$

$$X = 57,82 \text{ semaines soit } 14,45 \text{ mois}$$

Les résultats nous montrent que l'UFC est nulle après 14 mois de conservation

Tableau IV: nombre de colonie d'*Enterococcus faecalis* par semaine

SEMAINES	<i>E. faecalis</i> : nombre de colonie $\times 10^6$ UFC/ml
0	90
1	87
2	86
3	85
4	84
5	82
6	79
7	79
8	78
9	76
10	75
11	73
12	70
13	68
14	66

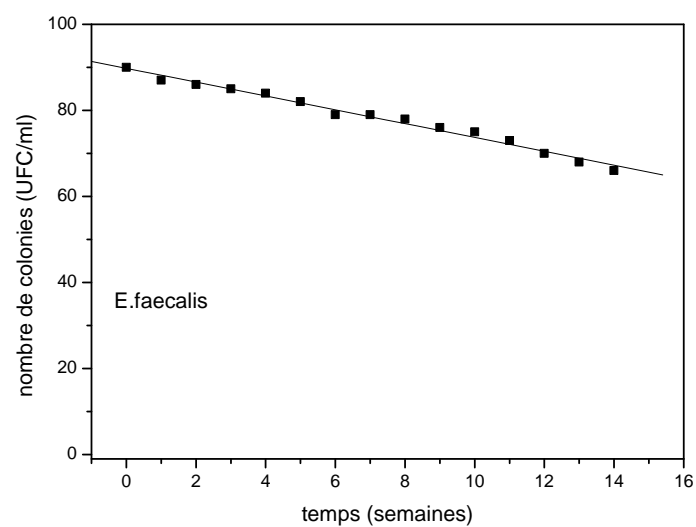


Figure 3 : Evolution de la viabilité de la souche d'*Enterococcus faecalis* ATCC 29212

❖ **Détermination du temps où nous avons plus de colonies à -20°C**

La courbe définit le modèle mathématique suivant :

$$Y = A + B * X$$

Paramètre

$$A \quad 89,78$$

$$B \quad -1,60$$

$$R \quad -0,99281$$

$$y = -1,60x + 89,78$$

$$-1,60x + 89,78 = 0$$

$$X = -89,78 / -1,60$$

$$X = 56,11 \text{ semaines soit } 14 \text{ mois}$$

La souche peut être conservée par congélation pendant 14 mois à -2

Tableau V: nombre de colonie de *Pseudomonas aeruginosa* par semaine

SEMAINES	<i>P.aeruginosa</i> : nombre de colonie $\times 10^6$ UFC/ml
0	86
1	84
2	83
3	80
4	79
5	78
6	76
7	75
8	73
9	72
10	70
11	69
12	67
13	65
14	64

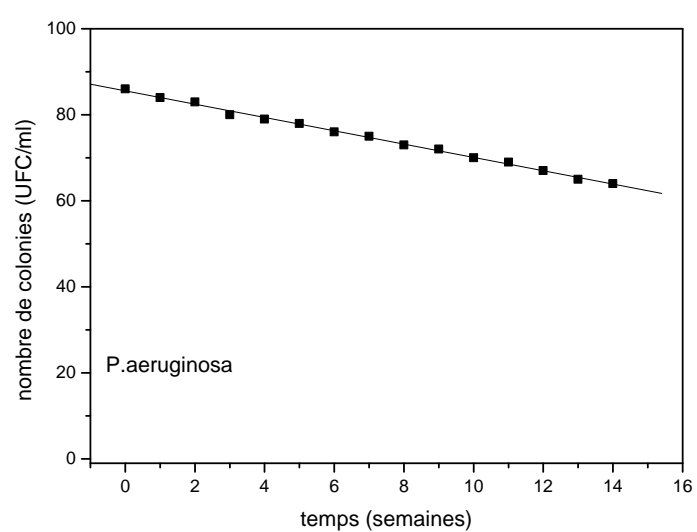


Figure 4 : Evolution de la viabilité de la souche *Pseudomonas aeruginosa*
ATCC 27853

❖ **Détermination du temps ou la viabilité de la bactérie est nulle à -20°C**

La courbe définit le modèle mathématique suivant :

$$Y = A + B * X$$

Parameter

$$A \quad 85,58$$

$$B \quad -1,55$$

$$R \quad -0,99834$$

$$y = -1,55x + 85,58$$

$$-1,55x + 85,58 = 0$$

$$X = -85,58 / -1,55$$

$$X = 55.21 \text{ semaines soit } 13 \text{ mois}$$

VII - DISCUSSION

Cette étude a permis de suivre la viabilité des souches de référence *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Enterococcus faecalis* ATCC 29812 pendant 15 semaines et de déterminer la durée limite de conservation dans du BCC à 10% de glycérol de ces souches.

Elle a montré une bonne viabilité de ces souches de référence durant les 15 semaines de conservation sans aucune modification des caractères morphologiques, biochimiques et la sensibilité aux antibiotiques et que les estimations par modèles mathématique ont permis de déterminer la durée limite de conservation qui est de 14 mois pour *Escherichia coli* ATCC25922, 13 mois pour le *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et 14 mois pour *Enterococcus faecalis* ATCC 29812. Cette limite de conservation ne traduit pas l'absence totale de bactéries dans le milieu mais une quantité inférieure à une UFC c'est-à-dire 10^6 bactéries. Pour régénérer cette quantité de bactéries il faut le mettre dans un bouillon d'enrichissement comme le thioglycolate puis incubé à l'étuve à 37°C pendant au moins 72h

En effet, la viabilité de la souche durant la période de conservation s'explique par la basse température ; la présence de nutriment dans le milieu mais également par la présence d'un cryoprotecteur (glycérol à 10%)

Les basses températures permettent d'arrêter toutes les réactions chimiques cellulaires et donc de conserver de façon parfaite les souches bactériennes. Ainsi plus la température est basse plus le métabolisme bactérien est inhibé et donc plus la conservation est meilleure [38]

Les cryoprotecteurs permettent la multiplication de petits cristaux arrondis sous une forme de cristallisation dite cubique. Ils sont ainsi peu agressifs pour les cellules [38].

D'autres cryoprotecteurs existent comme le DMSO qui constitue avec le glycérol des cryoprotecteurs les plus utilisés en microbiologie.

La diminution du nombre de colonies au cours de la conservation à -20°C peut s'expliquer par l'épuisement en nutriment mais également par la présence de contaminants dans le milieu de congélation.

Au cours de la congélation à -20°C les réactions, malgré qu'elles soient lentes, existent toujours ce qui entraîne à long terme un épuisement du milieu en nutriments et par conséquent un ralentissement de la croissance d'où une diminution du pourcentage de viabilité des souches

Outre la conservation par congélation, il y a d'autres méthodes décrites dans la littérature par exemple la lyophilisation qui est une méthode de déshydratation poussée compatible avec des durées de conservation très longues. Cependant cette méthode présente certains inconvénients, elle occasionne des altérations cellulaires et génétiques de certaines souches bactériennes et présente un coût très élevé pour les pays en développement [22; 29 ; 32]

Cependant, notre étude connaît une limite importante :

La cinétique de refroidissement pour atteindre les températures fixées n'est pas établie. En effet, lorsque le processus de refroidissement est rapide, des cristaux de glace intracellulaires se forment avant la fin du processus de déshydratation cellulaire. Ces cristaux de glace déchirent les membranes et les organelles cellulaires et entraînent la mort de la cellule pendant le processus de décongélation.

CONCLUSION

Les infections bactériennes dues à *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis* diverses dans leurs manifestations cliniques sont les plus fréquentes.

Elles représentent aujourd'hui un problème de santé publique en Afrique du fait des difficultés d'identification et de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques.

Ainsi pour la bonne marche d'un laboratoire microbiologique, la mise au point d'une méthode efficace de conservation des souches bactériennes est d'une importance capitale pour le microbiologiste (pour les études d'identification des souches mais également, de sensibilité aux antibiotiques).

C'est dans cette optique que nous avons entrepris la conservation de souches de références suivantes : *Escherichia coli* ATCC 25922 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785 *Enterococcus faecalis* ATCC 29812.

Les résultats obtenus ont montré une bonne viabilité des souches de références dans le BCC à 10% de glycérol pendant les 15 semaines de conservation et que la durée où la viabilité des bactéries est inférieure à une UFC c'est-à-dire une absence de colonies sur gélose est de 14 mois pour *Escherichia coli* ATCC25922, 14 mois pour *Enterococcus faecalis* ATCC 29812 et 13 mois pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

De manière générale la conservation des souches de référence (*Escherichia coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, et *P. aeruginosa*) à -20°C est facile et accessible dans de nombreux pays en voie de développement. Il suffit juste, d'avoir un congélateur standard à -20°C, un BCC, du glycérol à 10% et une gélose ordinaire MH, contrairement à une congélation à -80°C et à -196°C qui nécessite beaucoup de moyens et un personnel qualifié

Au vu des résultats obtenus, quelques recommandations nous semblent nécessaires pour éviter la perte de la souche bactérienne :

- Faire un repiquage avant 13 mois pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- Faire un repiquage avant 14 mois pour *Escherichia coli* ATCC25922
- Faire un repiquage avant 14 mois pour *Enterococcus faecalis* ATCC 29812
- Travailler dans des conditions d'asepsie stricte pour éviter les souillures
- Faire une identification complète de la souche à conserver
- Lutter contre les coupures d'électricité très fréquentes en disposant par exemple des groupes électrogène ou d'autres sources d'alimentation électrique.
- Eviter le débranchement électrique accidentel d'où la nécessité de fixer les prises électriques
- disposer des fiches de relevé de température quotidienne ainsi que des accumulateurs de températures.

Il est important également d'étudier la viabilité des souches à -80°C pour avoir une durée de conservation beaucoup plus longue

BIBLIOGRAPHIE

1 AFSSAPS

Annales du contrôle national de qualité des analyses de biologie médicales (édition mars 2010)

5 AVRIL J. L., DABERNAT H., DENIS F., MONTEIL H.

Bactériologie clinique 2^{ème} édition ellipseschap. IV section XI

7 BAKHOUM. I M.ND.S

Contrôle de qualité et validation de différentes microméthodes d'identification bactériennes

Thèse Pharm. Dakar 2004 N° 08

8 BENABID R.

Rôle de l'élastase du neutrophile dans les infections pulmonaires à *Pseudomonas aeruginosa*

Doctorat soutenu 30 mars 2009 à Reims

9 BENSLIMANI. A

Cours de résidanat de microbiologie 1^{ère} année de microbiologie et 3^{ème} année de biologie clinique 8 et 11 /11/2006

10 BORNER G.

Importance des bactéries psychotrophes en hygiène des denrées alimentaires

Révue médvet, 2009 151 11 pages 1005-1006

11 BREAND. S

Etude biométrique de la réponse d'une population bactérienne à une variation défavorable de température ou de PH Thèse Pharm. Université Claude Bernard de Lyon I, France. (1998).

12 CATTOIRE V.

Les bacilles à GRAM négatif (cours DCEM1 faculté de médecine de CRETEIL) Laboratoire de bactériologie-virologie-hygiène.

14 CHOUDER N.

Contribution à l'étude des flores intestinales des poulets conventionnels sains

Mémoire soutenu le 08/07/2006 en Algérie

15 CORNU M.

Dynamique des populations bactériennes en cultures mixtes Thèse Université Claude Bernard de Lyon I, France. N° 213. (2000).

16 cour de bactériologie DCEM1 2007-2008 faculté de médecine de Nantes

17 DIOP M.

Etude de la viabilité des souches d'*Haemophilus influenzae* et de *Streptococcus pneumoniae* à basse température (-20°C et -80°C) Thèse pharm. Dakar 2006 N°05

20 DENIS F., PLOY M. C., MARTIN C., BINGEN E., QUENTIN R.

Bactériologie médicale technique édition 2007 ELSEVIER MASSAN SAS chap. 2 page 29, chap. 31 page 301-334

21 GUEYE O.

Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles Gram négative Thèse pharm. Dakar 2007 N° 36

22 SIBERY G, BRAHMADATHAN KN, RAJESWARP, LALITHA MK, MARK C. et JACOB T.

Comparison of different culture media and storage temperature for the long-term preservation of *Streptococcus pneumonia* Bulletin of the World Health Organization 2001 page 44

25 MARCHANDIN H.

Physiologie bactérienne Faculté de médecine Montpellier janvier 2007

Métabolisme bactérien

29 MORGAN C., HERMAN A, WHITE PA, VESEY G.

Preservation of micro-organisme by drying review Microbiol methods 2006 vol.66 page 183-193

30 NDOYE R.

Algorithmes d'identification des Entérobactéries et des Bacilles à Gram négatif non fermentaires
Thèse Pharm., Dakar, 2004, N° 83

31 NIANG O.

Souches de références et procédures de contrôle in vitro de a sensibilité aux antimicrobiens Thèse
Pharm. Dakar 2003 N° 58

32 RYAN D. WINTERS and WASHINGTON C. WINNJR

A simple, effective method for bacterial culture storage a brief technical report. Journal of
bacteriology and virology 2010 vol.40N°2page 99-101

33 SARR T.

Algorithmes d'identification des staphylocoques à coagulase négative et des streptocoques non
groupables Thèse pharm. Dakar 2004 N°84

34 SOW A.

Métabolisme bactérien dans l'isolement et l'identification de *S.pneumoniae*, *H.influenzae*,
M.catarrhalis Thèse pharm. Dakar 2005 N° 53

WEBOGRAPHIE

3 www.ands.dz/aarn/antibiogramme(site consulté le 21/10/2012 à 12h45min)

2 www.anne-decoster.frce.fr site consulté le 30/7/12 à 22H05min

A Decoster *les enterocoques et les pseudomonas*

4 www.anism.sante.fr(siteconsulté le 29/12/12 à 20h 45 min)

6 www.bacterio.univ-fcomte.fr/coursdcem1(site consulté le 7/05/13 à 12h 25min)

13 www.biomnis.com/component/option,com_docman/task...,/lang,fr/

Gestion des contrôles de qualité en bactériologie Biomnis biologie médicale spécialisée

18 www.up.sur-la-toil.com/iw2p (site consulté le 15/5/2013 à 12h 41min)

Les genres Pseudomonas et vibrio

19 [www.ecosociosystème.fr/nutrition bactériennes](http://www.ecosociosystème.fr/nutrition_bactériennes)(siteconsulte le 5/5/2013 à 16h 22min)

23 www.med.univ-MontP1.fr/enseignement/cycle-2/UE-agentinfectieux-hote(site consulté le 5/5/2013 à 18h 35min)

24 www.bacterio.cict.fr/bacdico/ss/enterocoque.html (site consulté le 29/02/2013 à 11h 45min)

Dictionnaire de bactériologie vétérinaire

26 www.microbes-edu.org/étudiant

Cours de bactériologie général : effet pH et disponibilité en eau

27 www.microcsb.net/bonne identification des cocci GRAM positive (Site consulté le 30/7/12 à 22H32min)

28 [www.microbio.ucoz.com /prelegeri /francais
metabolisme bacterien.doc](http://www.microbio.ucoz.com/prelegeri/francais_metabolisme_bacterien.doc)(site consulté le 24/02/13 à 17h 25min)

35 www.techno-science.net(Site consulté 5/5/2013 à 18h)

Définition et explication des bactéries

36 www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/bacteriologie (site consulté le 18 /06 /2013 à 12h)

Résistance aux bétalactamines chap.7 E. coli Première année de microbiologie et troisième année de biologie clinique

37 www.unice.fr/LEML/francour.internet/fichier (site consulté 1/5/2013)

Courbe de croissance en milieu non renouvelé

38 www.perrin33.com/genie-ferment/conservation-souches (site consulté le 23/03/13 à 22h 45min) Mayabiobiology for Everyone les méthodes de conservation

39 www.arnobio2.com (site consulté le 12 -04-13 à 13h 30 min)

La croissance bactérienne

40 www.ac-limoges.fr (site consulté le 16/5/2013 à 21h 33min)

Les contrôles de la qualité analytique en biologie médicale. Document LAB GTA 06 révision 00 Juillet 2005

ANNEXES

I. PREPARATION DES MILIEUX DE CONSERVATION

- **Bouillon cœur cerveau +glycérol 10%**

Bouillon cœur-cerveau en poudre-----37g

Eau distillée-----90ml

Dissoudre la poudre à chaud dans l'eau distillée puis on autoclave le mélange obtenue à 121°C pendant 15mn.

Après autoclave, laisser refroidir le milieu avant d'ajouter 10 ml de glycérol puis répartir dans des tubes NUNC à raison de 1 ml par tube.

- **Milieu Mueller Hinton**

Sa formule en gramme par litre d'eau distillée est la suivante :

– infusion de viande de bœuf	:	300
– hydrolysate de caséine	:	17,5
– amidon	:	1,5
– gélose	:	17

Actuellement, ce milieu est préparé en dissolvant dans de l'eau distillée des milieux de base en poudre disponibles sur le marché. Ces milieux sont contenus dans des bocaux en plastique où est mentionnée la formule exacte de préparation.

Poudre \longrightarrow 19g

Eau \longrightarrow 500ml

Porté à ébullition ensuite autoclavé à 121°C pendant 20 min

Repartir le milieu dans des biotes de pétries et les conservés +4°C jusqu'à l'utilisation

La gélose de MUELLER-HINTON est le milieu de référence pour l'étude de la sensibilité des antibiotiques.

- **Gélose au Sang Ordinaire (G.S.O.)**

Gélose Muller Hinton-----19,5g

Eau distillée-----475ml

La poudre est dissoute à chaud dans de l'eau distillée puis nous avons mis dans l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

- prélever 25 ml de sang de cheval et les verser dans le milieu après refroidissement, puis réchauffer le milieu jusqu'à la cuisson du sang ensuite repartir dans des boîtes de pétri.

- **Sérum physiologique**

- Chlorure de sodium : 9g
- Eau distillée : 1000 ml.

Stériliser ensuite à l'autoclave à 120°C, répartir dans des tubes à essai en verre (en général on met 10 ml par tube) et conserver.

Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

PERMIS D'IMPRIMER

Vu :

Le président du jury

Vu :

Le Doyen.....

Vu et Permis d'imprimer

Pour le recteur, le Président de l'assemblée d'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et par
délégation

Le Doyen