

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE

DEDICACES	I
REMERCIEMENTS	II
PAGE DES ABREVIATIONS	III
LISTE DES ANNEXES	IV
RESUME	V
ABSTRACT	VI
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : synthèse bibliographique	3
I / RAPPELS SUR LA CROISSANCE BACTERIENNE	3
I-1/ Définition.....	3
I-2 / Nutrition bactérienne	3
I-2-1 /Les besoins alimentaires	3
I-2-2 / Les besoins énergétiques.....	4
I-2-3/ Les besoins spécifiques	4
I- 3/ Les conditions physico-chimiques de la croissance	5
I-3-1/ La température	5
I-3-2/ Le Ph	5
I-3-3/ La pression partielle en oxygène.....	5
I-3-4/ Les substances antibactériennes	6
II / MESURE DE LA CROISSANCE BACTERIENNE	6
II-1/ Les méthodes indirectes	7
II-2/ Les méthodes directes	7
III / RAPPEL SUR LES SOUCHES BACTERIENNES	7
III-1/ <i>Haemophilus influenzae</i>	7
III-1-1/ Historique	7
III-1-2/ Systématique.....	8
III-1-3/ Habitat	10
III- 1-4 / Caractères bactériologiques.....	10
III-1-4-1/ Caractères morphologiques	10

III-1-4-2 / Caractères cultureux.....	10
Caractères biochimiques	11
Caractères antigéniques.....	12
III-1-5 / Identification.....	13
III-2/ <i>Streptococcus pneumoniae</i>	14
III-2-1/ Historique	14
III-2-2/ Systématique.....	14
III-2-3/ Habitat	15
III-2-4 / Caractères bactériologiques.....	16
III-2-4-1/ Caractères morphologiques.....	16
III-2-4-2/ Caractères cultureux.....	16
III-2-4-3/ Caractères biochimiques	16
III-2-5/ Identification.....	17
IV/ CONSERVATION DES SOUCHES BACTERIENNES	20
CHAPITRE II : Matériel et Méthodes	21
I / MATERIEL	21
I-1/ Cadre d'étude.....	21
I-2/ Souches bactériennes.....	21
I-3/ Matériel pour l'isolement et l'identification des souches.....	21
I-4/ Matériel pour la conservation des souches.....	22
II / METHODES	23
II-1/ Milieux de culture pour l'isolement et l'identification des souches bactériennes	23
II-1-1/ Gélose trypticase- soja + sang de cheval	23
II-1-2/ GSC + Polyvitex.....	23
II-1-3/ Gélose Columbia + 5% de sang de cheval.....	23
II-1-4 / Gélose Wilkins Chalgren + sang de cheval	24
II-2/ Milieux de culture pour la conservation des souches.....	24
II- 2- 1/ Milieu MGY	24
II-2-2/ BCC + glycérol à 25 % + lactose à 6 %.....	24
II-3/ Contrôle des milieux des culture.....	24
II-3-1/ Contrôle de la gélose et des bouillons	25
II-3-2/ Contrôle de la stérilité des milieux préparés.....	25
II-3-3/ Contrôle de l'efficacité	25

II-4/ Isolement et identification des souches bactériennes.....	25
II-4-1/ <i>Haemophilus influenzae</i>	25
II-4-1-1/ Isolement	25
II-4-2/ Identification.....	26
II-4-2/ <i>Streptococcus pneumoniae</i>	29
II-4-2-1/ Isolement	29
II-4-2-2/ Identification.....	29
II-5/ Conservation des souches bactériennes	33
II-6/ Etude de la viabilité des souches bactériennes.....	34
CHAPITRE III : Résultats et discussion	35
I / RESULTATS	35
I-1/ Isolement et identification des souches avant et après la conservation.....	35
I-1-1/ <i>Haemophilus influenzae</i>	35
I-1-1-1/ Isolement.....	35
I-1-1-2/ Identification.....	35
I-1-2/ <i>Streptococcus pneumoniae</i>	36
I-1-2-1/ Isolement.....	36
I-1-2-2/ Identification.....	36
I-2/ Etude de la viabilité des souches conservées	38
I-2-1/ Dénombrement des colonies avant la conservation	38
I-2-2/ Dénombrement des colonies après la conservation	40
II / DISCUSSION	67
CONCLUSION	71
PERSPECTIVES	72
BIBLIOGRAPHIE	73

DEDICACES

Je dédie ce travail :

- A mes parents (Père, Mère)
- A mes frères et sœurs
- A mes cousins, cousines, tantes, oncles et amis

Qui m'ont toujours soutenus.

REMERCIEMENTS

Nombreux sont ceux qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail. Mes remerciements vont en particulier :

Au **Professeur Cheick Saad BOYE** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et qui m'a aidé sur tous les plans à orienter et à mettre en valeur ce travail. Je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude et ma reconnaissance.

Au **Professeur Ibrahima NDOYE**, à qui ce mémoire doit beaucoup. Son accueil simple et sympathique lors nos rencontres a représenté pour moi une source d'encouragement. J'ai particulièrement apprécié sa disponibilité comme interlocuteur scientifique.

Au **Professeur Rianatou BADA ALAMBEDJI**, c'est une fierté et un grand privilège pour moi de bénéficier de votre disponibilité pour l'évaluation de ce travail, merci.

Au **Professeur Tahir DIOP**, je vous remercie pour l'opportunité que vous m'offrez à profiter de vos connaissances scientifiques, merci d'avoir accepté de juger ce travail.

A **M. SOUMARE** pour le soutien moral qu'il m'a apporté au cours de nombreuses discussions scientifiques.

Au **docteur Téning SARR** qui s'est donnée corps et âme pour l'accomplissement de ce travail. J'apprécie très profondément son ouverture et son courage.

Au **docteur Yénaba SOUMMAH** pour m'avoir aidé à découvrir les problématiques du laboratoire de bactériologie à mes débuts et la complicité journalière qui nous a liées pendant un long moment.

A **M^{elle} Aminata DIATTA**. Vous m'aviez assisté, conseillé et guidé en mes débuts d'études universitaires.

Aux **doctorants BA Ngansoumana, LYDIA, DIOUF Mahécor et SARR Bathie** qui ont joué un rôle déterminant pour l'accomplissement de ce travail.

Aux **techniciens** qui ont participé activement à ce travail, pour leur grande disponibilité et leur investissement auprès des stagiaires.

PAGE DES ABREVIATIONS

- API : Appareil et procédé d'identification
- ATCC : American type culture collection
- BCC : Bouillon cœur-cervelle
- DNP : Diphosphonucléotide
- GSC : Gélose au sang cuit
- LCR : Liquide céphalo-rachidien
- MEVAG : milieu pour étude de la voie d'attaque du glucose

MGY : 10 % Skim milk +10 % glycerol + 1 % glucose + 0,5 % yeast extract = (milieu au lait écrémé+glucose+glycérol+extrait de levure).

- MH : Müller ou Mueller Hinton
- NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
- NADP : NAD Phosphate
- Ph : Potentiel hydrogène
- TNP : Triphosphonucléotide

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: caractères biochimiques d' <i>Haemophilus influenzae</i>	i
Annexe 2: Lecture de la galerie API NH	ii
Annexe 3.1 : Caractères biochimiques <i>d'H.influenzae</i> donnés par la galerie API NH	iii
Annexe 3.2 : Caractères biochimiques <i>de S. pneumoniae</i>	iii
Annexe 4 : Lecture de la galerie CSB / Streptocoques	iv
Annexe 5 : Caractères biochimiques de <i>S. pneumoniae</i> d'après la galerie_Micro CSB / Streptocoques	v
Annexe 6.1 : Résultats de la préconservation d' <i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49247 ..	vi
Annexe 6.2 : Résultats de la préconservation sur MGY et sur BCC de <i>S.pneumoniae</i>	vi
Annexe 7.1.1 : Résultats de la conservation <i>d'H. influenzae</i> sur MGY et sur BCC à - 20°C	vii
Annexe 7.1.2 : Résultats de la conservation <i>d'H. influenzae</i> sur MGY et sur BCC à - 70°C	viii
Annexe 7.2.1 : Résultats de la conservation de <i>S .pneumoniae</i> sur MGY et sur BCC à - 20°C	ix
Annexe 7.2.2 : Résultats de la conservation de <i>S .pneumoniae</i> sur MGY et sur BCC à - 70°C	x
Annexe 8 : Néphélomètre de McFarland	xii

RESUME

L'objectif du travail est de mesurer la viabilité de deux bactéries exigeantes : *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae* après les avoir conservés sur BCC (bouillon cœur cervelle + glycerol à 25 % + lactose à 6 %) et sur MGY (10 % de lait écrémé + 10 % glycerol + 1% glucose + 0,5% extrait de levure).

Les températures de conservation sont -20°C et -70°C .

Nous avons utilisé 5 types de concentration différentes : 10^{15} , $1,2 \cdot 10^8$, $1,2 \cdot 10^6$, $1,2 \cdot 10^4$, $1,2 \cdot 10^2$.

Après dix jours de conservation sur MGY et sur BCC, à -20°C et à -70°C et pour chaque concentration, on sort un tube Nunc contenant l'inoculum de chacune des souches que l'on repique sur GSC. (Gélose au Sang Cuit)

Les premiers résultats obtenus avant la conservation des souches ont montré que le nombre de colonies sur MGY est supérieur au nombre de colonies sur BCC pour *S. pneumoniae*. Pour *H. influenzae*, nous notons un léger écart du nombre de colonies entre les deux milieux.

Qu'il s'agisse d'*H. influenzae* ou de *S. pneumoniae*, le nombre de colonies décroît lorsque la concentration est faible.

Après la conservation, toujours sur BCC et sur MGY, le nombre de colonies sur ce dernier est supérieur à celui du BCC.

Nous avons montré qu'*H. influenzae* peut être conservé à -70°C sur MGY pendant au moins un mois et sur BCC durant 25 jours pour une concentration de 10^{15} .

Alors qu'à -20°C , il reste viable pendant 27 jours sur MGY et 25 jours sur BCC.

Pour *S. pneumoniae*, il reste viable à -70°C sur MGY et sur BCC pendant un mois au moins.

Il peut être conservé à -20°C pendant un mois sur MGY et durant 29 jours sur BCC.

Mots clés : *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, biométrie, conservation, milieux de culture.

ABSTRACT

The objective of this work is to measure the viability of two fastidious bacteria: *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* after having preserved them on BHIH (Brain Heart infusion broth + 25 % glycerol +6 % lactose) and on MGY (10 % Skim milk +10 % glycerol + 1 % glucose + 0,5 % yeast extract).

The temperatures of conservation are - 20°C and - 70°C.

We used 5 different concentration types: 10^{15} , $1,2 \cdot 10^8$, $1,2 \cdot 10^6$, $1,2 \cdot 10^4$, $1,2 \cdot 10^2$.

After ten days of conservation on MGY and on BHIB, to - 20°C and to - 70°C and for every concentration, we took out a Nunc tube containing the inoculum of each of stumps that we planted back on chocolate agar.

The first results gotten before the conservation of stumps have revealed that the number of colonies on MGY is superior to the number of colonies on BHIB for *S. pneumoniae*. For *H.influenzae*, we have noted a light gap of the number of colonies between the two surroundings.

That it is about *H.influenzae* or *S. Pneumoniae*, the number of colonies decreased when the concentration was weak.

After the conservation, still on BHIB and on MGY, the number of colonies on the latter is superior to the one of the BHIB.

We showed that *H.influenzae* can be preserved at less than -70°C on MGY for at least a month and on BHIB for 25 days for a concentration of 10^{15} .

Whereas to - 20°C, he/it remained viable during 27 days on MGYS and 25 days on BHIB.

For *S. pneumoniae*, it remained viable at - 70°C on MGY and on BHIB during one month at least.

At - 20°C, it can be preserved during one month on MGY and during 29 days on BHIB.

Key words: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, Biometrics, Preservation, Culture media.

Introduction

Streptococcus pneumoniae et *Haemophilus influenzae* sont des bactéries exigeantes responsables de nombreuses maladies infectieuses.

En effet, *S. pneumoniae* est responsable de plusieurs infections dont les plus fréquentes sont des pneumonies (accompagnées ou non de septicémies), des otites moyennes, des sinusites, des conjonctivites, des méningites etc.

En Europe, il provoque par an 800 infections / 100.000 habitants dont 500 otites, 300 pneumonies, 1,5 méningites avec 20 décès / 100.000 habitants par an. La mortalité est de l'ordre de 30 %. (2)

Au Sénégal, les incidences de pneumopathies et de méningites sont estimées à 14 et 1.400 pour 100.000 habitants par an et une mortalité de 7 et 200 pour 100.000 habitants.

H. influenzae provoque au moins 3.000.000 de cas de maladies graves et 400 à 700.000 décès chaque année chez les jeunes enfants, rare chez les nourrissons de moins de trois mois et chez les enfants de plus de six ans. (27)

H. influenzae est responsable de méningite chez l'enfant avant 3 ans, l'épiglottite (enfants âgés de 2 à 7 ans), arthrites, cellulite, péricardite, pneumonies etc.

La mesure de la viabilité des bactéries est d'un intérêt capital.

Elle permet de déceler l'influence des conditions environnantes sur la physiologie bactérienne, de choisir les milieux les plus favorables au développement rapide d'une bactérie ou au rendement maximum de la culture, d'étudier l'action bactériostatique ou bactéricide des agents inhibiteurs, de conserver des souches en vue d'usages multiples. Parmi ces derniers, on peut citer : les examens complémentaires, la recherche, l'enseignement, la préparation de vaccins, les études taxonomiques.

Ainsi, plusieurs méthodes sont actuellement utilisées pour mesurer la viabilité des souches : comptage des colonies au microscope, comptage en flux, mesure de la densité optique, apport de la biologie moléculaire, dénombrement des colonies sur boîte de Pétri etc.

Introduction

Nous nous limiterons à la dernière méthode qui consiste à compter les colonies sur boîte de Pétri.

Cette étude de viabilité s'avère souvent difficile du fait non seulement de l'utilisation d'une méthode de mesure qui n'est pas toujours fiable mais aussi des difficultés de conservation de ces souches vu leurs exigences particulières.

L'objectif général de ce travail est de mesurer la viabilité des souches après conservation, de noter s'il y a lieu le(s) changement(s) de caractères morphologiques et/ou biochimiques.

Les objectifs spécifiques sont de mettre en évidence certains paramètres ayant des influences sur la viabilité des souches conservées et d'en déduire enfin le ou les meilleur(s) paramètre(s) donnant le meilleur taux de survie ; ce sont :

- ✓ Les milieux de conservation des souches ;
- ✓ La température de conservation des souches ;
- ✓ La concentration de l'inoculum.

Après avoir décrit les généralités, nous nous intéresserons dans un premier temps à l'isolement et à l'identification des souches, dans un second temps, à la conservation des souches et enfin nous procéderons à l'étude de la viabilité des souches conservées.

CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

I /RAPPEL SUR LA CROISSANCE BACTERIENNE

I-1 / DEFINITION (23)

La croissance se définit comme étant l'accroissement ordonné de tous les composants d'un organisme. Chez les microorganismes unicellulaires (bactéries, levures), elle aboutit à une augmentation du nombre d'individus. Cet accroissement est donc synonyme de multiplication, toutes les trente minutes environ, une bactérie donne naissance, par division, à deux nouvelles bactéries. La croissance ou le développement des bactéries est tributaire d'une part du milieu et des éléments physiques de ce milieu, d'autre part des besoins nutritifs spécifiques. Ces différents facteurs physiques et chimiques qui sont indispensables sont étudiés dans le cadre de la nutrition.

I-2 / Nutrition bactérienne

Les bactéries se multiplient à partir des aliments ou nutriments que l'on met à leur disposition dans les milieux de culture. Elles ont toutes un certain nombre de besoins communs : de l'eau, une source d'énergie, une source de carbone, une source d'azote et des éléments minéraux. (23)

Mais ces besoins peuvent être rangés dans trois rubriques :

- **Les besoins alimentaires**
- **Les besoins énergétiques**
- **Les besoins spécifiques**

I-2-1 /Les besoins alimentaires (23, 27)

Ils correspondent aux divers aliments constitutifs des bactéries tels que :

- Le **carbone** : il est un des éléments les plus abondants de la bactérie et doit être fourni en quantité suffisante. Le plus simple des composés carbonés est l'anhydride carbonique CO_2 . Elle est la seule source de carbone pour les bactéries autotrophes. Les bactéries hétérotrophes utilisent facultativement le CO_2 ; elles dégradent une grande quantité de substances hydrocarbonées (alcool, acide lactique, acide acétique, etc.)

Synthèse bibliographique

- L'azote :

Les bactéries ont besoin de substances azotées pour synthétiser leurs protéines.

- Le soufre et le phosphore

Parmi les constituants minéraux de la bactérie, le soufre et le phosphore tiennent une place de choix. Le premier est présent dans certains acides aminés et donc dans les protéines sous forme de groupements thiols (-SH). Il est incorporé sous forme de sulfate principalement ou de composés soufrés organiques, rarement sous forme de soufre réduit. Le second fait partie des acides nucléiques, de nombreuses coenzymes et de l'ATP. Il est incorporé dans la cellule sous forme de phosphate inorganique. Le phosphore joue le rôle d'une véritable centrale énergétique à l'échelon cellulaire : il permet la récupération, l'accumulation et la distribution de l'énergie dans la cellule.

- Autres éléments minéraux

Certains de ces éléments jouent un rôle dans l'équilibre physico-chimique de la cellule. Ce sont le sodium, le potassium, le magnésium et le chlore. D'autres beaucoup plus nombreux sont partie constituante d'enzyme ou de coenzyme : ce sont le fer des cytochromes, le magnésium de la chlorophylle, le nickel et le sélénium des hydrogénases, etc.

I-2-2 / Les besoins énergétiques

Ils couvrent les dépenses engagées dans la synthèse des molécules contenant des liaisons riches en énergie telles que l'ATP, le glucose 6P, l'acétyl CoA, etc.

La gamme de substances utilisée comme source d'énergie est spécifique à chaque espèce :

- Les bactéries **phototrophes** utilisent l'énergie lumineuse pour la photosynthèse ;
- Les bactéries **chimiotrophes** puisent leur énergie à partir des composés minéraux ou organiques.

NB : la grande majorité des bactéries d'intérêt médical utilise le glucose comme substrat.

I-2-3 / Les besoins spécifiques

Certaines bactéries ont besoin en plus des éléments précédents (besoins alimentaires, besoins énergétiques) 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 des bactéries auxotrophes.

Les facteurs de croissance varient selon les espèces bactériennes. Ces facteurs peuvent être des acides aminés, de bases puriques ou pyrimidiques, de vitamines etc.

I-3 / Les conditions physico-chimiques de la croissance (27, 28)

I-3-1 / La température

Elle influence profondément la multiplication microbienne aussi bien que le métabolisme. Selon la température optimale de développement, on distingue généralement trois catégories de microorganismes :

- Les bactéries **psychrophiles** :

Elles se développent pour des températures se situant aux alentours de 0° C

- Les bactéries **psychotropes** :

Elles se multiplient préférentiellement entre 0 et 20° C.

- Les bactéries **mésophiles** :

Elles préfèrent une température comprise entre 20 et 40° C. Ces dernières représentent la majorité des bactéries d'intérêt médical.

- Les bactéries **thermophiles** :

Elles se multiplient préférentiellement entre 45 et 65° C.

I-3-2 / Le pH

Les bactéries pathogènes pour l'homme se développent préférentiellement dans des milieux neutres ou légèrement alcalins (pH=7, 0 à 7,5). Par ailleurs certaines bactéries dites acidophiles préfèrent les pH acides alors que les basophiles préfèrent les pH élevés.

I-3-3 / La pression partielle en Oxygène : (26)

Les exigences des bactéries vis-à-vis de l'oxygène moléculaire (O₂) permettent de distinguer plusieurs groupes physiologiques :

- les **aérobies strictes** exigeant l'oxygène libre pour leur développement,

Synthèse bibliographique

- Les **anaérobies strictes** qui ne peuvent se multiplier qu'en l'absence d'oxygène libre,
- Les **aéro-anaérobies** ou **anaérobies facultatifs** capables de croître avec ou sans oxygène libre,
- Les **microphiles** qui ne se reproduisent qu'en présence d'une faible tension d'oxygène.

NB : la majorité des bactéries d'intérêt médical se retrouve dans le groupe des bactéries **aéro- anaérobies**.

I-3-4 / Les substances antibactériennes (11)

Certaines substances antibactériennes peuvent inhiber la croissance de certaines bactéries : c'est le principe des milieux sélectifs.

Exemple : GSC+Gentamicine à 6 mg/l (*Streptococcus pneumoniae*).

II / MESURE DE LA CROISSANCE BACTERIENNE

La mesure de la croissance bactérienne permet de connaître la concentration cellulaire (nombre d'individus par unité de volume) et l'état physiologique de cette population (croissance rapide, état stationnaire...)

Cette mesure de la croissance peut se faire en milieu solide tout comme en milieu liquide, de façon qualitative tout comme de façon quantitative.

L'étude qualitative et quantitative présentent un très grand intérêt, car elle permet, d'une part, de choisir les milieux les plus favorables au développement rapide d'une bactérie et de déceler l'influence des conditions environnantes sur ce développement et, d'autre part, d'étudier dans des conditions bien définies l'action bactériostatique ou bactéricide des différentes substances inhibitrices. Cette étude doit toujours se faire sur une population bactérienne en culture pure. (9)

La mesure de la croissance bactérienne fait intervenir deux méthodes :

II-1 / Les méthodes indirectes (17)

- La numération totale en dénombrant au microscope ou avec des compteurs spéciaux les individus viables ou non.
- La numération viable en dénombrant les colonies auxquelles ont donné naissance les bactéries viables en partant du principe qu'une bactérie donne naissance à une colonie.

NB : Quelle que soit son activité métabolique ou génétique, une bactérie est dite non viable si elle est incapable de former une colonie.

II-2 / Les méthodes directes : (17)

- La détermination du poids sec : les bactéries sont lavées, séchées et pesées. On suppose qu'un mg du poids sec correspond à quelques milliards de corps bactériens.
- Le dosage de l'azote bactérien.
- Mesure de l'activité enzymatique des bactéries. Notons cependant que cette méthode est peu précise.
- Mesure de la densité optique : la culture bactérienne absorbe ou réfléchit la lumière qui passe à travers elle. Cette méthode est rapide et précise ; cependant, elle n'est applicable qu'à partir de 10^7 bactéries/ml de culture

III / RAPPELS SUR LES SOUCHES BACTERIENNES

III-1 / *Haemophilus influenzae* :

III-1-1 / Historique (2)

Au cours de la pandémie de grippe de 1889-1892, Pfeiffer a observé et cultivé à partir de crachats de grippés un petit bacille, *Bacillus influenzae* et en fait l'agent étiologique de la « grippe » ou « *influenzae* » ; il a montré le rôle indispensable de sang pour la culture de cette bactérie et invente la gélose au sang.

Quelques années plus tôt, en 1883 en Egypte par Koch, en 1886 aux USA par Weeks, avait été observée, puis cultivée dans l'exsudat de conjonctivites purulentes une bactérie, bacille de Koch-Weeks, signalée dans un traité de 1889 sous le nom de *Bacillus aegyptius*.

Le nom du genre *Haemophilus* (*Haemophilus* = qui aime le sang) a été proposé en 1917. En 1939, A. Lwoff propose le démembrement des « *Haemophilae* » et la création du genre *Moraxella*, suivi en 1952 par Moreno-Lopez qui propose le genre *Bordetella*.

Jusqu'en 1933, date de la découverte de l'agent étiologique de la grippe, *H. influenzae* était resté, parfois avec des doutes, la bactérie suspectée d'être responsable de *l'influenzae*. En 1930 Miss M. Pittman met en évidence l'existence de souches capsulées, propose des types sérologiques et montre la prédominance du type b dans les méningites et autres infections aiguës suppurées.

III-1-2 / Systématique

La systématique est l'étude de la diversité du monde vivant ou biodiversité.

La classification des bactéries a toujours été et est encore de nos jours une préoccupation très importante pour les bactériologistes systématiciens. Celle-ci est extrêmement difficile et ne peut être établie que par la recherche objective et purement expérimentale des affinités des espèces en vue de grouper celles qui présentent des caractères morphologiques, cytologiques, physiologiques et immunochimiques semblables.

Les classifications actuelles des bactéries sont relativement nombreuses et nous ne citerons que les principales :

1. Classification française de A.R Prévot (1961).
2. Classification américaine du Bergy's Manual (1957).
3. Classification anglaise de Topley et Wilson (1964).
4. Classification soviétique de Krassilnikov (1961). (27)

Pour ces deux souches, nous nous limiterons à la classification française de Prévot et celle du Bergy's Manual.

Dans « le Bergy's Manual », le genre *Haemophilus* est placé dans la famille des *Pasteurellaceae* avec le genre *Pasteurella* et *Actinobacillus*.

Synthèse bibliographique

Haemophilus influenzae est l'espèce du genre qui contient seize espèces d'origine animale et humaine.

Par contre dans la classification de Prévot, il est rangé dans la famille des **Parvobacteriaceae**.

Les bactéries sont rangées dans l'embranchement des Schizomycètes, qui correspond aux protistes procaryotes.

Cet embranchement est subdivisé en quatre sous-embranchements :

- EUBACTERIA = bactéries vraies ;
- MYCOBACTERIA= bactéries affines aux Champignons ;
- ALGOBACTERIA = bactéries affines aux Algues ;
- PROTOZOOBACTERIA = bactéries affines aux Protozoaires.

	Sous-embranchements	Classes	Ordres	Familles	Tribus	Genres	Espèces
Embranchement des SCHIZOMYCETES	EUBACTERIA	ASPORULALES	BACTERIALES	PARVOBACTERIA CEAE	HAEMOPHILEAE	<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>

TABLEAU I : Position systématique d' *H. influenzae*

- ❖ EUBACTERIALES : Bactéries simples, non différenciées, sans ramifications vraies,
qui, suivant l'existence ou l'absence d'une spore, sont subdivisées en deux classes :
Asporulales et Sporulales
- ❖ ASPORULALES : sans spores.
- ❖ BACTERIALES : Bactéries allongées, droites, cylindriques ou plates qui, suivant la coloration de Gram, la morphologie (en particulier la ciliature), le type nutritionnel, l'habitat et le pouvoir pathogène sont réparties en six familles.

Synthèse bibliographique

- ❖ PARVOBACTERIACEAE : Bâtonnets de petite taille, Gram négatifs, mobiles ou immobiles, aérobies ou anaérobies facultatifs, ne liquéfiant pas la gélatine, faiblement glucidolytiques et, en général, parasites des animaux à sang chaud.

III-1-3 / Habitat (19, 27)

Les *Haemophilus* font partie de la flore des muqueuses des voies respiratoires supérieures et de la cavité buccale de l'homme et de nombreux mammifères et oiseaux. On n'en trouve pas dans la nature. Chez l'homme quatre écosystèmes les accueillent : le pharynx, la bouche, la plaque dentaire et, à un degré moindre l'intestin et l'appareil urogénital.

Cependant *H. influenzae* est présent en moins grande quantité et est plus fréquent chez l'enfant. Le portage d'*H. influenzae* concerne 75 % des jeunes enfants et 35 % des adultes et des enfants âgés.

Il est par ailleurs plus rarement rencontré au niveau de la muqueuse buccale, de la salive et à la surface de la muqueuse vaginale. *H. influenzae* de type b est l'une des trois principales espèces bactériennes responsables des méningites primitives chez les enfants âgés de 2 mois à 3 ans avec une incidence maximale entre 6 mois et un an. Les souches sont le plus souvent de biotype I.

III- 1-4 / Caractères bactériologiques (19)

III-1-4-1 / Caractères morphologiques

Haemophilus influenzae se présente sous forme de petits bacilles ou coccobacilles de 0,3µ à 0,4 µ de diamètre sur 1 à 1,5 µ, non sporulés, immobiles, aéro-anaérobie facultatif, généralement capsulés et Gram négatif avec parfois une coloration bipolaire. Le polymorphisme est très accentué dans certains produits pathologiques (crachats, LCR) ou en culture.

La capsule tend à disparaître au cours des repiquages successifs

III-1-4-2 / Caractères culturels

Haemophilus influenzae ne peut pousser que sur des milieux de culture enrichis en sang, lequel lui apporte ses deux facteurs de croissance

- Le facteur X, thermostable, est constitué par l'hémine (ou hématine) qui est un composé tétrapyrrolique contenant du fer, dérivé de l'hémoglobine et des

Synthèse bibliographique

enzymes de la chaîne respiratoire (cytochrome, catalase, peroxydase). En présence du fer, l'hémine peut être remplacé par la protoporphyrine.

- Le facteur V, thermolabile, est constitué par :
 - Soit du NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) ou DNP (diphosphonucléotide) ou **coenzyme I**,
 - Soit du NADP (NAD-phosphate) ou TNP (triphosphonucléotide) ou **coenzyme II**

Ce sont des coenzymes des déshydrogénases qui sont présentes dans les globules rouges, dans les tissus animaux et végétaux et chez la plupart des bactéries.

Cette double exigence permet de le distinguer des autres espèces en l'occurrence *H. parainfluenzae* qui ne nécessite que du NAD.

Cependant, puisque le sang frais contient également des inhibiteurs du facteur V, il est nécessaire d'utiliser des milieux d'isolement au sang cuit (15 mn à 75-80° C). Un chauffage excessif (100° C) détruit le NAD. Il est donc important de s'assurer de la qualité des milieux de culture.

En aérobiose, la croissance *d'H. influenzae* n'est pas dépendante de l'hémine, ce qui peut être source de difficultés d'identification.

L'exigence en NAD peut être recherchée sur des milieux additionnés de NAD purifié ou par la mise en évidence d'un satellitisme *d'H. influenzae* autour des colonies de *Staphylococcus aureus* qui produit du NAD.

Après 24 heures de culture à 37° C sur gélose-chocolat, *H. influenzae* donne des colonies lisses, convexes, grisâtres, translucides, de 0,5 à 1mm. Les souches encapsulées donnent des colonies mucoïdes de plus grosse taille.

Certaines espèces nécessitent une atmosphère enrichie en CO₂.

III-1-4-3 / Caractères biochimiques

Huit biotypes (I à VIII) ont été définies pour *H. influenzae* à partir des caractères métaboliques suivants : production d'indole, activités enzymatiques telles que l'uréase et l'ornithine décarboxylase. Le biotype I est plus fréquemment retrouvé dans les méningites et le biotype IV dans les infections génitales. (30)

H. influenzae possède une catalase et une peroxydase.

Un certain nombre de caractères biochimiques et enzymatiques permet dans certains cas de le différencier des autres espèces voisines. (Voir l'annexe 1) (1,17)

III-1-4-4 / Caractères antigéniques

III-1-4-4-1 / La capsule

Les souches capsulées possèdent un antigène polysaccharidique lié à la capsule dont il existe six variants déterminant six sérovars : **a, b, c, d, e, f**.

La spécificité de type dépend de la composition en polysaccharides de la capsule. Différents sucres ont été individualisés : glucose, ribose, galactose, acide mannuronique.

L'association fréquente entre sérotype b et biotype I semble être une conséquence de la diversité génétique limitée des *H. influenzae* de type b. (11)

III-1-4-4-2/ La membrane externe (11)

Comme tous les bacilles à Gram négatif, *H. influenzae* possède une membrane externe constituée de protéines, de porines, de phospholipides et de lipooligosaccharides (LOS). Les LOS sont constitués de lipide A, de 2 céto-3 désoxyoctonate et d'oligosaccharides. Les profils électrophorétiques des LOS permettent de définir des sous-types utilisables dans les études épidémiologiques.

Les protéines des membranes externes (PEM), très immunogènes, représentent des facteurs de virulence chez les souches d'*H. influenzae* en particulier chez les souches non capsulées.

III-1-4-4-3/ Pili ou fimbriae (24)

La présence de Pili ou fimbriae, mises en évidence chez *H. influenzae*, confère à la bactérie des propriétés d'adhésion à la muqueuse nasopharyngée, étape précédant l'invasion sanguine et méningée.

Chez *H. influenzae* de type b, la piliation permet de définir cinq sérotypes.

Pour *H. influenzae* de type b, les souches isolées du LCR et du sang sont le plus souvent non piliées contrairement aux souches isolées du rhinopharynx.

III-1-5 / Identification d'*Haemophilus influenzae* (2, 11)

L'identification formelle d'*H. influenzae* porte d'abord sur la mise en évidence de l'exigence en facteurs de croissance (facteurs X et V). Différentes méthodes permettent d'étudier cette exigence :

- Le phénomène de satellitisme sur gélose au sang frais avec une strie de *Staphylococcus aureus* qui réalise un apport en facteur V,
- L'utilisation de milieux supplémentés avec l'un ou l'autre facteur,
- L'utilisation de disques contenant l'un et ou l'autre facteur et qui sont déposés à la surface d'un milieu gélosé.

L'identification sera ensuite complétée par la macroscopie, la microscopie et l'étude des caractères biochimiques présentés dans l'annexe 1).

NB :

- ❖ Tout apport parasite de facteur de croissance (en particulier X à partir de milieu au sang, flacon d'hémoculture, ...) doit être soigneusement évité, de même qu'il est important pour réaliser ces tests d'utiliser des milieux nutritifs ne contenant aucune trace de ces facteurs.
- ❖ Le test de la porphyrine permet d'apporter une certitude quand à la dépendance en facteur X.

III-1- 5- 1 / Examens macroscopique

Les colonies d'*H. influenzae* sont lisses, bombées, rondes ou de colonies muqueuses, volumineuses ayant tendance à s'étaler.

III-1- 5- 2 / Examens microscopiques

Ces examens montrent des bacilles à Gram négatif (avec parfois une coloration bipolaire) de petite taille, isolés, polymorphes et parfois capsulés.

III-1- 5- 3 / Recherche d'oxydase

Un résultat positif se traduit par une coloration violette.

Haemophilus influenzae est oxydase positive.

III-1- 5- 4 / Microméthode d'identification

L'identification par la microméthode est possible grâce à la galerie API NH. (Voir annexe 2 pour la lecture de cette galerie)

III-2 / *Streptococcus pneumoniae*

III-2-1 / Historique (2)

Isolé de la salive en 1886 par Pasteur, *Streptococcus pneumoniae* prend la première place parmi les causes de mortalité par maladies infectieuses dans les pays développés. La découverte en 1916 des différents types sérologiques de *S. pneumoniae* avait permis l'emploi d'antisérums spécifiques qui furent le premier traitement efficace de la pneumonie à pneumocoque.

L'étude de la physiologie de cette bactérie a conduit à des découvertes capitales concernant les mécanismes de pathogénicité, la réponse immunitaire à médiation humorale, les transferts génétiques (découverte de la transformation bactérienne dont l'étude a permis de montrer que l'ADN est le support de l'information génétique), ...

En 1928, Griffith a montré qu'une souche R (R = rugueux) non capsulée et non pathogène de *S. pneumoniae* pour la souris pouvait être transformée en une souche S (S = smooth = lisse), capsulée et pathogène.

En 1944, Avery, MacLeod et MacCarthy établirent les bases de la génétique bactérienne en montrant que l'ADN est le facteur transformant chez les pneumocoques.

Autres dénominations :

« *Micrococcus pneumoniae* », « *Diplococcus pneumoniae* ».

Nom vernaculaire : pneumocoques

III-2-2 / Systématique

Dans le « Bergey's Manual of Systematic Bacteriology », *S. pneumoniae* est placé dans le groupe des « **Streptocoques pyogènes** » ; ce qui peut se justifier compte tenu de la gravité des infections dont il est responsable.

Synthèse bibliographique

Toutefois, l'analyse de la séquence des gènes codant pour l'ARN 16S montre une parenté (98,5 p.cent d'homologie) avec *S. oralis*. Ce qui permet de placer *S. pneumoniae* dans le groupe des « Streptocoques oraux ».

Les homologues ADN-ADN et la composition chimique de la paroi avaient déjà permis à Kilpper-Bälz et al. (1983) d'arriver à une conclusion similaire.

	Sous- embranchements	Classes	Ordres	Familles	Tribus	Genres	Espèces
Embranchement des SCHIZOMYCETES	EUBACTERIA	ASPORUALES	MICROCOCALES	MICROCOCCACEAE	STREPTOCOCCACEAE	<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>

TABLEAU II: Classification détaillée de Prévot (27)

- **MICROCOCALES** : bactéries sphériques qui, suivant l'arrangement des cellules après divisions et suivant leur coloration avec le Gram, sont réparties en deux familles.
- **MICROCOCCACEAE** : formes en chaînettes, en paire ou en amas, immobiles, Gram positif.

III-2-3 / Habitats (2)

Streptococcus pneumoniae est un parasite obligatoire qui colonise les muqueuses de l'homme et de quelques Mammifères. Son principal habitat est constitué par le rhinopharynx de l'homme et pratiquement tout individu a été en contact avec des pneumocoques avant l'âge de deux ans.

Chez l'homme, l'incidence de l'infection est plus importante chez les enfants âgés de moins de deux ans et les sujets âgés de plus de 60 ans.

C'est un germe essentiellement humain, très rarement isolé chez les animaux.

Par contre des infections ont été décrites chez des Primates (pneumonies, méningites, septicémies observées chez *Macaca sp*, *Hylobates sp.*, *Cercopithecus sp.*, *Papio sp.*), chez un chat, chez les ruminants etc.

III-2-4/ Caractères bactériologiques

III-2-4-1 / Caractères morphologiques (2, 11)

Les souches de *S. pneumoniae* sont constituées de coques ou de cocco-bacilles, à Gram positif sphériques ou ovoïdes (la coloration de Gram se perd dans les vieilles cultures et les bactéries peuvent paraître comme des coques à Gram négatif), typiquement groupées par deux et d'allure lancéolée ou en huit mais pouvant se présenter de manière isolée ou en courtes chaînes (les repiquages favorisent la formation de chaînes), capsulés (fortement capsulés à l'isolement).

III-2-4-2 / Caractères cultureux

L'intervalle de température permettant la culture va de 25 à 42°C. En routine, le germe se cultive entre 35 et 37° C. Les cultures sont possibles pour des pH situés entre 6,5 et 8,5, le pH optimal étant de 7,8. Les pneumocoques en culture sont sujets à une autolyse spontanée ; il conviendra donc de chercher à limiter cette autolyse.

Les milieux employés seront riches, par exemple gélose + sang de mouton à 5 %. Sur ce milieu, le germe développe une hémolyse de type alpha, comme ses proches parents, les **Streptocoques verdissants**. La culture est favorisée par une atmosphère de 5 à 10 % de CO₂.

L'anaérobiose stricte est encore meilleure pour leur développement et on peut considérer que la gélose au sang placée en anaérobiose est un milieu sélectif qui favorise le développement du pneumocoque.

L'addition d'antibiotique comme la gentamicine ou l'acide nalidixique rendrait le milieu plus sélectif.

III-2-4-3 / Caractères biochimiques (2, 11)

S. pneumoniae ne possède ni catalase, ni peroxydase, ce qui induit l'accumulation de peroxyde d'hydrogène responsable de son autolyse.

Certains caractères biochimiques et enzymatiques permettent de le différencier des autres espèces. (Voir l'annexe 3.2).

III-2-5 / Identification de *Streptococcus pneumoniae* (2)

Elle porte essentiellement sur une étude des caractères morphologiques par des examens macroscopiques et microscopiques, et sur une étude des caractères biochimiques (catalase, sensibilité à l'optochine, la lyse par la bile et la mise en évidence de la capsule).

Cependant l'identification formelle du pneumocoque repose en routine sur trois critères :

- ❖ La sensibilité à l'optochine,
- ❖ La lyse par la bile,
- ❖ La mise en évidence d'une capsule.

III- 2- 5 – 1 / Examens macroscopiques

Streptococcus pneumoniae se présente sous forme de petites colonies transparentes, rondes, de 0,5 à 1,5 mm de diamètre et développant une hémolyse alpha.

III- 2 -5- 2 / Examens microscopiques

L'Examen microscopique a montré des cocci à gram positif groupés par deux et d'allure lancéolée ou en huit.

III- 2-5-3 / Recherche de la catalase

Une réaction positive c'est-à-dire la présence de catalase se traduit par une production de bulles d'air.

Une réaction négative, absence de catalase se traduit par une absence de bulles d'air.

S. pneumoniae est catalase négative.

Remarques :

- La recherche de catalase ne doit pas être réalisée sur des colonies vieilles de plus de 24 heures.

En effet, ces colonies peuvent donner des réactions faussement négatives puisque l'enzyme ne se trouve que dans des cultures viables.

Synthèse bibliographique

- Il faut éviter de prélever de la gélose au moment de la préparation du frottis, car les globules rouges qui sont dans la gélose renferment de la catalase et ceci peut conduire à des réactions faussement positives.

III-2-5-4 / Recherche de la sensibilité à l'optochine :

(éthylhydrocupréine, dérivé proche de la quinine)

Pour un disque de 6 mm, le test serait positif si la zone d'inhibition a un diamètre supérieur à 14mm.

Pour un disque de 10 mm, le test serait positif si la zone d'inhibition a un diamètre supérieur à 16 mm.

S. pneumoniae est sensible à l'optochine.

Si le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 14 mm (pour un disque de 6 mm) ou 16 mm (pour un disque de 10 mm), l'identification doit être confirmée par des tests complémentaires tels que la solubilité dans la bile.

Remarque :

Certaines souches de *S. pneumoniae* sont résistantes à l'optochine (0,5 à 5%) (11).

Il convient donc de nuancer et de tenir compte du diamètre de la zone d'inhibition : la plupart des pneumocoques en phase S (smooth) ou R (rough) ont une zone d'inhibition de diamètre supérieur à 15-20 mm.

III-2-5-5 / Recherche de la lyse par la bile

Deux méthodes peuvent être utilisées :

- ❖ Une méthode en boîte de Pétri,
- ❖ Une méthode en tube.
 - La méthode en boîte de Pétri (voire méthodologie)
 - La méthode en tube

Avec 1 ml d'une solution de Na Cl à 0,85%, préparer une suspension de turbidité égale à celle du tube 1 de la gamme de Mac Farland (annexe 8) avec les colonies à tester.

Synthèse bibliographique

Répartir la solution en quantité égale dans deux tubes de verre nommés respectivement **test** et **témoin**.

Dans le **tube test**, ajouter trois à quatre gouttes de désoxycholate de sodium à 10% et dans le tube **témoin**, trois à quatre gouttes de Na Cl à 0,85%.

Mélanger le contenu de chacun des tubes puis incuber les à 37° C pendant 2 heures.

Examiner ensuite le tube **test** pour rechercher un éclaircissement en comparaison avec le tube **témoin**.

Un résultat positif se traduit par une lyse de la colonie alpha hémolytique. (méthode en boîte de Pétri)

S. pneumoniae est soluble dans la bile.

Remarque :

La sensibilité à l'optochine et la lyse par les sels biliaires sont spécifiques des pneumocoques et peuvent être utilisées pour les souches donnant des colonies en forme lisse. Pour les souches rugueuses (dépourvues de capsules), le seul test utilisable est la sensibilité à l'optochine

III-2-5-6 / La mise en évidence de la capsule

Elle s'effectue à l'aide de sérum antipneumococcique polyvalent, dirigé contre tous les types capsulaires.

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées :

- la réaction du « gonflement capsulaire » ou réaction de NEUFELD.
- la réaction d'agglutination :
 - Agglutination de particules de latex sensibilisées,
 - Coagulation avec des particules des staphylocoques tués,
 - Contre-immuno-électrique (CIE).

Un résultat positif se traduit par la formation d'agrégats visibles dans le latex contenant le latex anti – *Streptococcus pneumoniae* (réaction d'agglutination).

L'identification peut être complétée par une étude des caractères biochimiques et enzymatiques (voir **annexe 5**).

III -2 -5-7 / Microméthode d'identification :

Nous avons eu recours aux microplaques CSB/ Streptocoques pour confirmer l'identification. (Voir annexe 4 pour sa lecture)

IV / CONSERVATION DES SOUCHES BACTERIENNES

Les souches bactériennes exigeantes comme leur nom l'indique, sont difficiles à conserver et nécessitent des milieux de conservation particuliers qui tiennent compte de leur exigence.

Exemples :

- *Haemophilus influenzae* :

Nous pouvons le conserver sur :

- Bouillon MH+ sang de mouton à 5% +glycérol à 10%,
- BCC+ glycérol à 25 % + lactose à 6 %
- GSC+Polyvitex (en pente).
- MGY

- *Streptococcus pneumoniae*

- BCC+glycérol à 25 % + lactose à 6 %
- Bouillon MH+ sang de mouton à 5%+glycérol à 10%,
- GSC+ gentamicine (en pente)
- MGY

CHAPITRE II : matériel et méthodes

I / MATERIEL :

I-1 / Cadre d'étude

Ce travail a pour cadre d'étude l'unité de recherche et de biotechnologie microbienne du laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'hôpital Aristide Le Dentec.

I-2 / Les souches bactériennes :

Notre étude a porté sur des souches de *Streptococcus pneumoniae* et d'*Haemophilus influenzae*.

Les souches de références utilisées sont de type American Type Culture Collection (ATCC). Il s'agit de :

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

I-3 / Matériel pour l'isolement et l'identification des souches :

- Anse de platine
- Autoclave
- Bec Bunsen
- Boîtes de Pétri
- Bougie ou générateur de CO₂
- Désoxycholate de sodium 10%
- Disques d'optochine
- Gélose Columbia
- Sang de cheval
- Polyvitex
- Disques d'oxydase
- Ecouvillons stériles
- Etuve à 37°C

Matériel et Méthodes

- Gélose trypticase – soja
- la gélose de Wilkins-Chalgren
- Isovitalex
- Jarre d'incubation
- Lames porte – objet
- Pipettes
- Embout
- Microplaques CSB
- Microscope optique
- Peroxyde d'hydrogène à 3 %
- Pipettes pasteur
- Sang de cheval
- Violet cristal
- Alcool 95 ° ou 96°
- Eau du robinet
- Lugol
- Fuchsine
- Echelle de McFarland
- Huile d'immersion.

I-4 / Matériel pour la conservation des souches :

- Lait écrémé
- Lactose
- Glucose
- Extrait de levure
- Glycérol
- BCC

- Tubes Nuncs

II / METHODES

II-1 / Milieux de culture pour l'isolement et l'identification des souches

II-1-1 / Gélose trypticase- soja + sang de cheval

- **Milieu de base : gélose trypticase- soja**

Peptone trypsique -----15g

Peptone papainique de soja -----5g

Chlorure de sodium -----5g

Agar -----15g

Dissoudre le mélange dans un litre d'eau distillée stérile puis autoclaver à 121°C pendant 15 mn.

- **Milieu complet : GSC**

Ajouter à la gélose trypticase – soja préalablement refroidie à environ 70° C, 5 à 10% de sang (5 ml de sang de cheval pour 100 ml de milieu).

NB : on peut utiliser indifféremment du sang stérile de cheval ou de mouton ; cependant les zones d'hémolyse chez *S.pneumoniae* sont souvent plus nettes sur la gélose au sang de mouton.

II-1-2 / GSC + Polyvitex :

Milieu de base : GSC

Ajouter le Polyvitex / 100ml de base.

Le milieu obtenu est ensuite coulé en boîtes puis refroidi pour obtenir un milieu solide.

II-1-3 / Gélose Columbia + 5 % de sang de cheval

Gélose Columbia -----39g

Eau distillée -----1l

Matériel et Méthodes

Dissoudre à chaud la gélose dans l'eau distillée puis autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

Ajouter 5% de sang de cheval puis couler le milieu ainsi préparé en boîtes de Pétri.

II-1-4 / Gélose Wilkins Chalgren + sang de cheval :

Wilkins Chalgren -----43g

Eau distillée -----1L

Dissoudre le mélange obtenu à chaud puis autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

Ajouter 5% de sang de cheval puis couler le milieu ainsi obtenu en boîtes de Pétri.

II-2 / Milieux pour la conservation des souches:

II- 2- 1/ Milieu MGY :

Préparation :

- Lait écrémé 10 g
- Glucose 1g
- Extrait de levure 0,5g
- Glycérol 10ml
- Eau distillée 100ml

Mélanger et autoclaver pendant 15mn.

II-2-2 / BCC + glycérol à 25 % + lactose à 6 %

- Bouillon cœur – cervelle en poudre ... 3,7g
- Lactose 6g
- Glycerol 25ml
- Eau distillée 10ml

Dissoudre la poudre à chaud dans l'eau distillée stérile et le mélange est autoclavé à 121°C pendant 15 mn.

II-3 / Contrôle des milieux de cultures :

II-3-1 /Contrôle de la gélose et des bouillons :

- vérifier la date de péremption du milieu disponible en poudre
- respecter la formule donnée sur la boîte
- ajuster le pH du milieu
- autoclaver pour avoir un milieu stérile
- respecter la profondeur de la gélose en coulant le milieu dans des boîtes de pétri de 4mm environ.

II-3-2 / Contrôle de la stérilité des milieux préparés :

❖ Les milieux solides

Les milieux préparés et coulés en boîtes sont incubés à l'étuve dans les mêmes conditions que la bactérie à conserver c'est à dire à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 24 à 48 heures.

❖ Les milieux liquides

Les milieux liquides préparés sont mis dans des tubes et incubés dans les mêmes conditions que les milieux solides pendant 24 à 48 H.

Au terme de l'incubation, s'il n'y a pas de pousse, on considère que les milieux sont stériles.

II-3-3 / Contrôle de l'efficacité

Elle consiste à en semencer les souches dans les différents types de milieux. Si les bactéries poussent au bout de 24 à 48 h d' incubation, on considère alors les milieux efficaces

II-4/ Isolement et identification des souches bactériennes :

II-4-1 / Isolement et identification d'*Haemophilus influenzae*

II-4-1-1 / Isolement :

Nous avons effectué un repiquage sur trois types de gélose :

- la gélose Trypticasse-Soja + sang de cheval + polyvitex

Matériel et Méthodes

- la gélose Columbia + 5% de sang de cheval + polyvitex. (Utilisée après la conservation pour les souches)
- la gélose de Wilkins-Chalgren + 5% de sang de cheval.

L'incubation a été faite à 37° C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ pendant 24 à 48 heures.

II- 4-1-2 / Identification

- **Mise en évidence de l'exigence en facteurs X et V**

Sur gélose ordinaire inondée *d'Haemophilus influenzae*, on y dépose des disques d'hémine et de NAD.

- **Examen macroscopique**

Il consiste à une lecture des boîtes de Pétri *d'Haemophilus influenzae* précédemment incubées à 37 ° C sous 5 % de CO₂ pendant 24 H.

- **Examen microscopique**

A partir d'une colonie nous avons effectué un frottis que l'on a coloré au Gram puis observé au microscope optique à l'objectif x 100.

- Gram positif : coloration bleu –violet ;
- Gram négatif : coloration rouge.

- **Recherche de la catalase**

Technique

A partir d'une colonie *d'Haemophilus influenzae*, nous avons réalisé un frottis sur lequel nous avons déposé quelques gouttes d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 3%.

Interprétation :

Un résultat positif se traduit par une production de bulles d'air.

- **Recherche d'oxydase**

Technique

Matériel et Méthodes

Sur une lame porte-objet, on y dépose un disque d'oxydase (disque de papier buvard imprégné d'une solution à 1% de chlorhydrate ou d'oxalate de diméthyl-para-phénylène diamine) que l'on imbibe avec une goutte d'eau physiologique. Nous avons ensuite prélevé quelques colonies de la culture présumée *d'H. influenzae* que nous déposons sur le disque.

Interprétation

Un résultat positif se traduit par une coloration violette.

- **Microméthode d'identification**

Cette méthode est possible grâce à la galerie API NH.

Principe :

La galerie API NH comporte 10 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée permettant de réaliser les tests d'identification (réactions enzymatiques, fermentation des sucres).

Les réactions qui se traduisent par une variation de coloration peuvent être révélées par l'addition de réactifs.

L'incubation se fait à 35-37° C pendant deux heures.

La lecture se fait visuellement.

Composition du coffret :

- 10 galeries API NH
- 10 ampoules de NaCl 0,85% Médium
- 1 ampoule de réactif JAMES
- 1 ampoule de réactif ZYM B
- 10 écouvillons
- 10 fiches de résultats
- 1 notice technique.

Technique :

• **Préparation de la galerie :**

- Sortir fond et couvercle d'une boîte d'incubation
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte
- Sortir la galerie de son emballage individuel
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation
- Jeter le sachet déshydratant.

• **Préparation de l'inoculum**

Ouvrir une ampoule de Na Cl 0,85% Médium (2ml). A l'aide d'un écouvillon, prélever plusieurs colonies bien isolées et réaliser une suspension d'opacité égale à l'étalon 4 de Mc Farland. (Voir annexe 8)

La suspension ainsi préparée doit être utilisée immédiatement après sa préparation.

• **Inoculation de la galerie :**

- Répartir la suspension bactérienne précédente dans les cupules en évitant de faire des bulles.
- Remplir uniquement la partie tube des 7 premiers microtubes (PEN à URE : 50 µl environ.
- Remplir tubes et cupules des 3 derniers microtubes Lip / Pro A, PAL / GGT, β-GAL / IND : 150 µl environ en veillant à ne pas créer un ménisque convexe.
- Recouvrir les 7 premiers tests (PEN à URE) d'huile de paraffine

NB : la qualité de remplissage est très importante : des tubes insuffisamment ou trop remplis sont sources de résultats faussement positifs ou faussement négatifs.

- Refermer la boîte d'incubation
- Incuber à 35-37° C en atmosphère aérobie pendant 2 heures.

• **Lecture de la galerie**

Les réactions sont lues en se rapportant au tableau de lecture de la notice technique :

- Lire les réactions spontanées et les noter sous forme de + ou – sur la fiche de résultats.

Matériel et Méthodes

NB : les trois derniers microtubes sont bifonctionnels et permettent la réalisation de deux réactions dans le même tube :

- ▲ Lip (réaction spontanée) / Pro A (réaction après addition de réactif).
- ▲ PAL (réaction spontanée) / GGT (réaction après addition de réactif)
- ▲ β -GAL (réaction spontanée) / IND (réaction après addition de réactif)

Les résultats des réactions Lip, PAL et β - GAL doivent être notés avant l'addition de réactifs.

- Ajouter une goutte de réactif ZYM B dans les microtubes Lip / Pro A et PAL / GGT
- Ajouter une goutte de réactif JAMES dans le microtube β - GAL / IND
- Attendre 3 minutes et lire les réactions en se référant au tableau de lecture de la notice technique et les noter sur la fiche de résultats.

NB: si après deux heures d'incubation, plusieurs réactions sont douteuses, réincuber la galleri 2 heures supplémentaires et la lire à nouveau; cependant, les tests enzymatiques ne seront pas relus.

II-4-2/ Isolement et identification de *Streptococcus pneumoniae* :

II- 4-2-1/ Isolement :

Nous avons effectué un ensemencement sur trois types de gélose :

- la gélose Trypticase- soja + 5 % de sang de cheval + Polyvitex
- la gélose Columbia + 5 % de sang de cheval + Polyvitex
- la gélose Wilkins – Chalgren + 5 % de sang de cheval + Polyvitex

Ensuite nous avons incubé à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂ pendant 24 à 48 heures.

II-4-2-2/ Identification

▪ Examen macroscopique :

Il consiste à u ne lecture de boîte de Pétri de *Streptococcus pneumoniae* précédemment incubées à 37 ° C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ pendant 24 H.

▪ **Examens microscopiques :**

Nous avons effectué à partir d'une colonie de *Streptococcus pneumoniae*, un frottis que nous avons coloré au Gram puis observé au microscope optique à l'objectif x 100.

▪ **Recherche de la catalase :**

Principe :

La catalase est une enzyme qui hydrolyse le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène : $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2\uparrow$. L'importance de cette enzyme est d'empêcher l'accumulation d' H_2O_2 , dont l'action serait létale pour la cellule bactérienne. (9)

Technique :

Nous avons effectué à partir d'une colonie, un frottis sur lequel on a déposé quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène à 3%.

▪ **Solubilité dans la bile :**

Principe :

L'addition de bile ou de sels biliaires à une culture neutralisée active une autolyse impliquée dans la division cellulaire qui clive la liaison entre l'acide N-acétylmuramique et l'alanine. Le peptidoglycane est ainsi altéré et la bactérie apparaît soluble dans la bile.

Technique :

Sur une culture présumée de *Streptococcus pneumoniae* en boîte, nous y déposons deux gouttes d'une solution de désoxycholate de sodium à 10% sur une colonie alpha hémolytique.

Nous avons ensuite incubé la boîte à 37°C pendant 2 heures avec le couvercle vers le haut et légèrement entrouvert afin d'accélérer le séchage du réactif.

Interprétation :

Un résultat positif se traduit par la lyse de la colonie alpha hémolytique.

▪ **Sensibilité à l'optochine :**

Principe :

La croissance de *S. pneumoniae* est inhibée par l'optochine et cette sensibilité est habituellement recherchée en utilisant un disque de papier imbibé d'une solution d'optochine.

Technique :

Nous avons effectué un ensemencement en stries sur une gélose au sang avec une culture présumée de pneumocoques. Nous avons ensuite déposé un disque d'optochine puis incubé la boîte à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 18 heures.

Après l'incubation, nous avons mesuré le diamètre de la zone d'inhibition.

Interprétation :

- Pour un disque de 6mm, le test serait positif si la zone d'inhibition à un diamètre supérieur à 14mm.
- Pour un disque de 10mm, le test serait positif si la zone d'inhibition à un diamètre supérieur à 16mm.

L'identification de *Streptococcus pneumoniae* peut être confirmée par la mise en évidence de l'antigène capsulaire et par l'utilisation d'une micro méthode d'identification :

▪ **Mise en évidence de l'antigène capsulaire :**

Elle repose sur l'agglutination de l'antigène capsulaire avec des particules de latex ; pour ce faire, nous avons utilisé un coffret : le slidex pneumo-kit.

Principe :

Les antigènes capsulaires sont identifiés en utilisant des particules de latex sensibilisées par des groupes spécifiques d'anticorps anti – pneumocoques.

Technique :

Nous avons déposé sur deux cercles différents d'une carte d'agglutination, une goutte d'eau physiologique. Nous ajoutons dans chaque cercle, quelques colonies de la culture

Matériel et Méthodes

présumée de *Streptococcus pneumoniae* afin d'obtenir dans chaque cercle une suspension opalescente.

Nous avons ensuite ajouté :

- dans le premier cercle, une goutte de latex anti *Streptococcus pneumoniae*
- dans le second cercle, une goutte de latex témoin.

Nous avons à l'aide de bâtonnets différents, mélangé les contenus de chaque cercle puis la carte est soumise à un mouvement rotatif pendant une à deux minutes et ensuite nous avons procédé à la lecture.

Un résultat positif se traduit par la formation d'agrégats visibles dans le latex contenant le latex anti – *Streptococcus pneumoniae*.

▪ Microméthode d'identification :

Nous avons eu recours aux microplaques CSB/ Streptocoques pour confirmer l'identification.

Principe :

Les galeries CSB – Streptocoques permettent la mise en évidence d'activités enzymatiques ou d'assimilation de substrats carbonés en milieu approprié ou hostile. Après l'incubation, la lecture est effectuée directement ou après addition de réactifs de révélation.

Technique :

Nous avons préparé une suspension bactérienne de turbidité égale à l'échelle 4 de Mc Farland (voir annexe 8) avec de l'eau distillée stérile.

Dans les cupules VP à BHS, nous avons déposé 100µl d'inoculum bactérien.

Le reste de la suspension bactérienne a été mélangé avec 1ml de MEVAG Streptocoque. Avec ce mélange, nous avonsensemencé les cupules de ARA à GLY (100µl), et fermé les cupules ADH et tous les sucres avec 2 gouttes d'huile de paraffine.

Les plaques ont été incubées à 37°C sur un support humide (papier buvard imbibé d'eau) pour éviter la déshydratation des puits.

Une première lecture a été faite après 4 heures d'incubation, puis une deuxième lecture après 18 heures d'incubation.

L'identification a été faite à l'aide d'un tableau de lecture.

II-5 / Conservation des souches bactériennes

Elle s'est faite dans des tubes Nunc.

Procédé

1. Isoler les souches bactériennes sur GSC+ polyvitex.
2. Identifier les souches.
3. Prendre le quart de la boîte et le mettre dans le MGY et le BCC.
4. Vortexer et répartir dans des tubes Nunc, puis conserver les tubes à -20 ° C et à -70° C. La solution initiale ou E = 10^{15} UFC / ml.
5. Préparer une suspension bactérienne dans de l'eau physiologique de turbidité égale à 4 Mcfarland. ($1,2 \cdot 10^9$ UFC / ml) ; S= $1,2 \cdot 10^9$ UFC / ml
6. Faire les dilutions suivantes :

- Dilution au $1/10^{\text{ème}}$

On prélève 500 µl de la suspension bactérienne (solution S) que l'on ajoute dans 4500 µl de chaque milieu MGY et BCC : D= $1,2 \cdot 10^8$ UFC / ml.

- Dilution au $1/100^{\text{ème}}$

On prélève 50 µl de la solution D que l'on ajoute dans 4950µl de chaque milieu de conservation. La solution ainsi obtenue ou C = $1,2 \cdot 10^6$ UFC / ml.

- Dilution au $1/100^{\text{ème}}$

On prélève 50 µl de la solution C que l'on met dans 4950 µl de chaque bouillon de conservation : B = $1,2 \cdot 10^4$ UFC / ml.

- Dilution au $1/100^{\text{ème}}$

Prélever 50 µl de la solution B que l'on met dans 4950 µl de chaque milieu de conservation : A = $1,2 \cdot 10^2$ UFC / ml.

Matériel et Méthodes

7. Vortexer et ensemerer chaque dilution dans une boîte de Pétri. Compter ensuite les colonies.

8. On conserve 300 µl de chaque dilution dans 20 tubes Nunc dont 10 tubes à -20° C et 10 tubes à -70° C.

Sur chaque tube Nunc, une étiquette a été faite avec les mentions suivantes :

- nom de la souche,
- numéro de code,
- date de conservation,
- milieu de conservation

II-6 / Etude de la viabilité des souches conservée

Au bout de 10 jours, nous avons sorti un tube de chaque dilution. Après isolement, nous avons procédé au comptage des colonies puis à l'identification des souches afin de noter s'il y a lieu des changements de caractéristiques après la conservation.

Nous avons procédé de la même manière au bout de 30 jours.

Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION

I / RESULTATS

I- 1 / Isolement et identification des souches avant et après la conservation

I- 1-1 / *Haemophilus influenzae*

I- 1-1-1 / Isolement

Sur les trois types de gélose que sont :

- Gélose Trypticase-soja +5 % sang de cheval + polyvitex
- Gélose Columbia +5 % sang de cheval + polyvitex
- Gélose Wilkins- Chalgren +5 % sang de cheval + polyvitex,

Et après incubation à 37° C sous 5 % de CO₂ pendant 24 heures, *H. influenzae* a donné des colonies nettes, lisses et rondes.

I-1-1-2 / Identification

➤ Mise en évidence de l'exigence en facteurs X et V

Nous notons la présence de colonies *d'H. influenzae* entre les disques X et V.

➤ Examen macroscopique :

Celui-ci a montré des colonies lisses, rondes, bombées, translucides, volumineuses ayant tendance à s'étaler.

➤ Examen microscopique :

Il montre des bacilles à Gram négatifs, de petite taille, isolées et polymorphes.

➤ Recherche de catalase

Elle est catalase positive

➤ Recherche d'oxydase

La souche isolée est oxydase positive.

➤ **Galerie API NH**

Les caractères biochimiques de cette souche sont regroupés dans le tableau suivant :

Tests	PEN	GLU	FRU	MAL	SAC	ODC	URE	LIP	PAL	ProA	GGT	IND
Résultats	B (-)	J (+)	O (+)	R O (-)	R O (-)	B (+)	R V (+)	B (-)	J (+)	O (-)	J OP (-)	Rose (+)

Tableau III: caractères biochimiques d'*Haemophilus influenzae*

B = bleu ; J = jaune ; O = orange ; R O = rouge orange ; J OP = jaune orange pale.

L'ensemble des tests d'identification nous permet de conclure que la souche de référence utilisée est une souche *d'H. influenzae*.

Nous n'avons pas noté de changement de caractères biochimiques ou morphologiques.

I-1-2 / *Streptococcus pneumoniae*

I-1-2-1 / Isolement

Nous avons effectué les repiquages sur les milieux suivants :

- **Gélose Trypticase-soja +5 % sang de cheval + polyvitex**
- **Gélose Columbia + 5% de sang de cheval + polyvitex**
- **Gélose Wilkins-Chalgren + 5% de sang de cheval +polyvitex**

Après incubation à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 24 H, la souche a poussé sur toutes les géloses avec des colonies bien nettes.

I-1-2-2/ Identification

✓ **Examen macroscopique**

Il montre de petites colonies transparentes, rondes et développant une hémolyse Alpha.

Résultats et Discussion

✓ Examen microscopique

Il révèle la présence de cocci Gram positifs, groupés par deux et d'allure lancéolée ou en forme de bougie.

✓ Recherche de catalase

Nous notons une absence de bulles d'air ; la souche isolée est catalase négative.

✓ Recherche d'oxydase

Absence de coloration violette avec les disques d'oxydase ; *S. pneumoniae* est oxydase négative.

✓ Sensibilité à l'optochine

Pour un disque de 6 mm de diamètre, les zones d'inhibition notées sont supérieures à 14mm : *S. pneumoniae* est sensible à l'optochine.

✓ Solubilité dans la bile

Nous avons noté une lyse des colonies alpha- hémolytiques ; la souche isolée est soluble dans la bile.

✓ Recherche d'antigènes capsulaires

Nous notons la formation d'agrégats visibles avec le latex anti-*Streptococcus pneumoniae* témoignant de la présence d'antigènes capsulaires.

✓ Galerie CSB / Streptocoque

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

Tests	VP	ESC	ADH	BHS	ARA	MAN	SOR	TRE	RAF	SOS	INU	LAC	RIB	AMD	GLY
Résultats	I (-)	I (-)	R (+)	V (-)	R (-)	R (-)	R (-)	J (+)	J (+)	R (-)	R (-)	J (+)	R (-)	R (-)	J (+)

Tableau IV : Caractères biochimiques de *S. pneumoniae* d'après la galerie Micro CSB / Streptocoques

R = rouge ; I = incolore ; V = violet ; J = jaune

Résultats et Discussion

L'ensemble des tests effectués sur cette souche nous permet de dire que celle-ci est une souche de *S. pneumoniae*.

Aucun changement de caractères biochimiques ou morphologiques n'a été constaté.

I- 2 / Etude de la viabilité des souches

I- 2-1 / Dénombrement des colonies avant la conservation

(Voir tableau annexe 6)

Nous avons utilisé 10 μ l pour l'ensemencement des boîtes de Pétri.

1 colonie = 5.10⁸ UFC / ml.

■ *Haemophilus influenzae* ATCC 49247

E = 10¹⁵ UFC/ml ; D = 1,2. 10⁸ UFC/ml ; C = 1,2. 10⁶ UFC/ml; B = 1,2. 10⁴ UFC/ml; A = 1,2. 10² UFC/ml

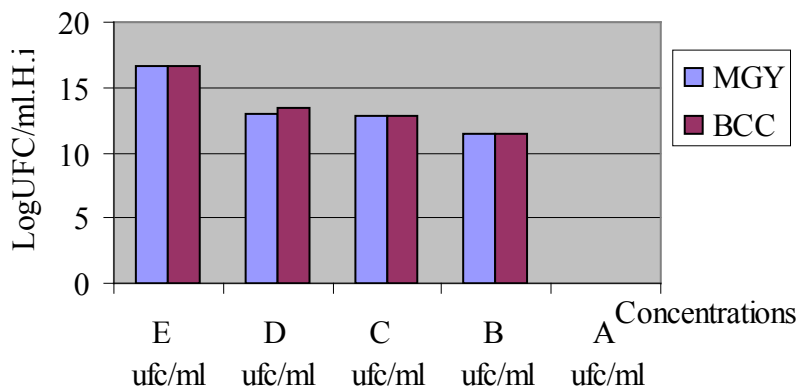


Figure 1 : Variation de Log UFC/ml en fonction des milieux *concentrations

Log UFC/ml H.i = Log unité formant colonies *d'Haemophilus influenzae*

BCC : Bouillon cœur-cerveille ; MGY : Milieu au lait

Résultats et Discussion

Milieux *concentrations	LogUFC/ml	Groupes						
MGY*Concentrations-A ufc/ml	0	A						
BCC*Concentrations-A ufc/ml	0	A						
BCC*Concentrations-B ufc/ml	11,39		B					
MGY*Concentrations-B ufc/ml	11,47			C				
MGY*Concentrations-C ufc/ml	12,77				D			
BCC*Concentrations-C ufc/ml	12,87					E		
MGY*Concentrations-D ufc/ml	13,03						F	
BCC*Concentrations-D ufc/ml	13,51						F	
MGY*Concentrations-E ufc/ml	16,69							G
BCC*Concentrations-E ufc/ml	16,69							G

Newman-Keuls (SNK)/ Analyse des différences entre les milieux*Concentrations avec un intervalle de confiance à 95%

L'analyse de cet histogramme montre un taux important de viabilité lorsque la concentration de l'inoculum est élevée. Plus la concentration est élevée, plus le nombre de colonies augmente. Nous notons aussi que le taux de viabilité sur le MGY est plus important que le taux de viabilité sur le BCC. Ce n'est seulement à $E = 10^{15}$ UFC/ml que le nombre de colonies sur MGY est égal à celui du BCC.

▪ *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

$E = 10^{15}$ UFC/ml ; $D = 1,2 \cdot 10^8$ UFC/ml ; $C = 1,2 \cdot 10^6$ UFC/ml; $B = 1,2 \cdot 10^4$ UFC/ml; $A = 1,2 \cdot 10^2$ UFC/ml

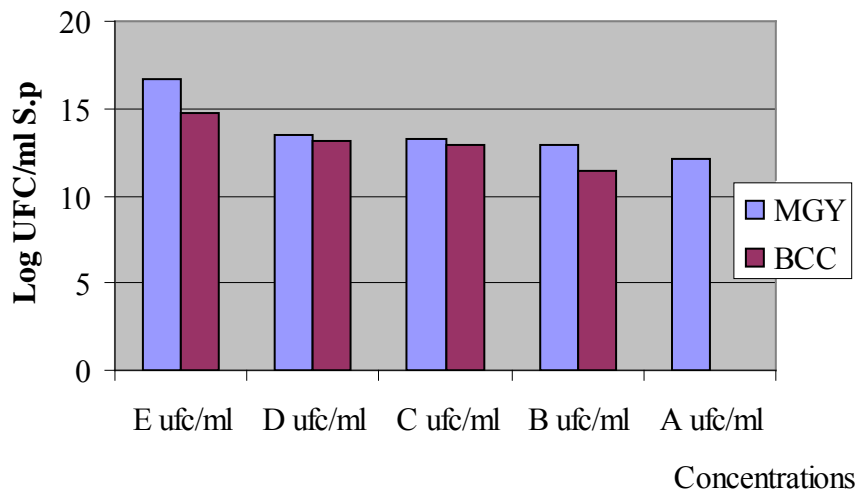


Figure 2 : Variation du logUFC/ml en fonction des milieux*concentrations

Log UFC/ S.p = Log unité formant colonies de *Streptococcus pneumoniae*

BCC : Bouillon cœur-cervelle ; MGY : Milieu au lait

Résultats et Discussion

Milieux*concentrations	LogUFC/ml	Groupes							
BCC*Concentrations-A ufc/ml	0	A							
BCC*Concentrations-B ufc/ml	11,47		B						
MGY*Concentrations-A ufc/ml	12,07			C					
MGY*Concentrations-B ufc/ml	12,87				D				
BCC*Concentrations-C ufc/ml	12,87				D				
BCC*Concentrations-D ufc/ml	13,17					E			
MGY*Concentrations-C ufc/ml	13,24						F		
MGY*Concentrations-D ufc/ml	13,47							G	
BCC*Concentrations-E ufc/ml	14,69								H
MGY*Concentrations-E ufc/ml	16,69								I

Newman-Keuls (SNK)/ Analyse des différences entre les milieux*Concentrations avec un intervalle de confiance à 95%

Le taux de viabilité sur MGY est plus important que celui du BCC et diminue lorsque la concentration est faible. Par contre, le taux de viabilité sur MGY à B = $1,2 \cdot 10^4$ UFC/ml est égal à celui du BCC à C = $1,2 \cdot 10^6$ UFC/ml. Mais cette baisse est considérable sur BCC. En effet, il n'y a pas de survie en A ($1,2 \cdot 10^2$) pour le BCC.

I-2-2 / Dénombrement des colonies après la conservation

(Voir annexe 7)

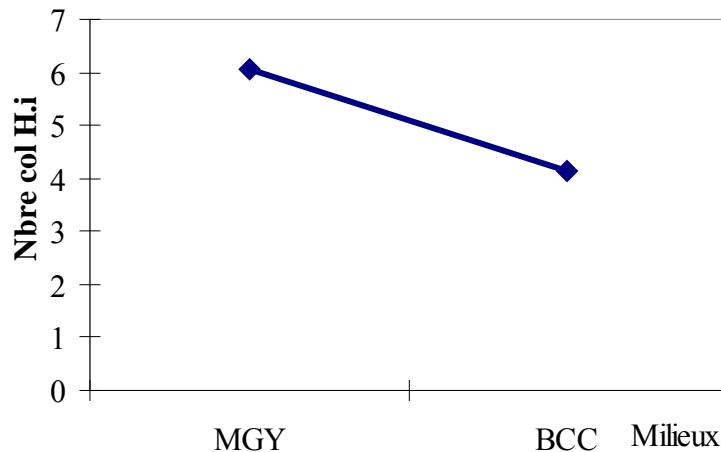


Figure 3 : Variation du nombre de colonies en fonction des milieux

Nbre colonies H.i = Nombre de colonies d'*Haemophilus influenzae*

BCC : Bouillon cœur-cervelle ; **MGY** : Milieu au lait

Résultats et Discussion

Milieux	Moyenne Nombre de Colonies	Groupes	
BCC	4,121	A	
MGY	6,055		B

Newman-Keuls (SNK)/ Analyse des différences entre les milieux avec un intervalle de confiance à 95%

Cette figure montre une différence significative du nombre de colonies entre les deux milieux. (ANOVA, SNK, $P < 0,0001$). En moyenne le nombre de colonies obtenu avec le milieu MGY est de 6 colonies alors qu'il n'est que de 4 colonies pour le BCC.

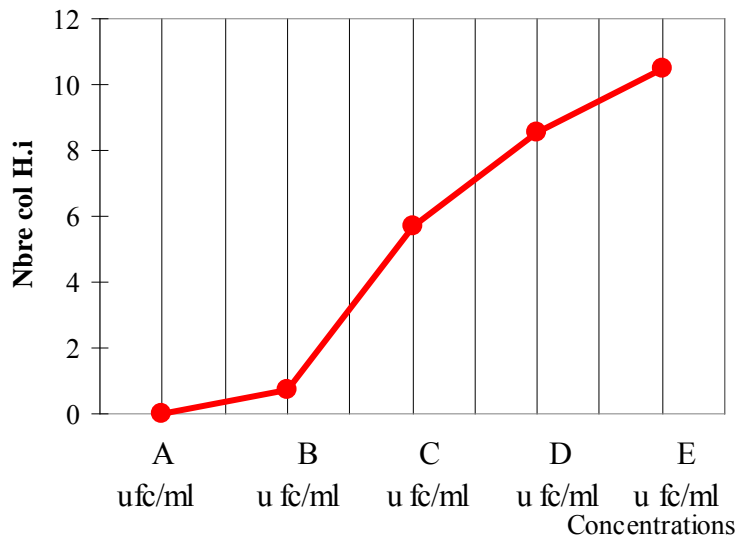


Figure 4 : Variation du nombre de colonies en fonction des concentrations

Nbre colonies H.i = Nombre de colonies d'*Haemophilus influenzae*

BCC : Bouillon cœur-cerveille ; **MGY** : Milieu au lait

Résultats et Discussion

Concentration	Moyenne du nombre de colonies	Groupes			
A ufc/ml	0,000	A			
B ufc/ml	0,727	A			
C ufc/ml	5,695		B		
D ufc/ml	8,524			C	
E ufc/ml	10,495				D

Newman-Keuls / Analyse des différences entre les concentrations avec un intervalle de confiance à 95%

Plus la concentration est forte, plus le nombre de colonies augmente. Nous notons aussi une différence de nombre de colonies entre les concentrations A et C, D, E. ((A \neq (C \neq D \neq E))

Par contre la différence du nombre de colonies n'est pas significative entre les concentrations A et B. (P=0,189)

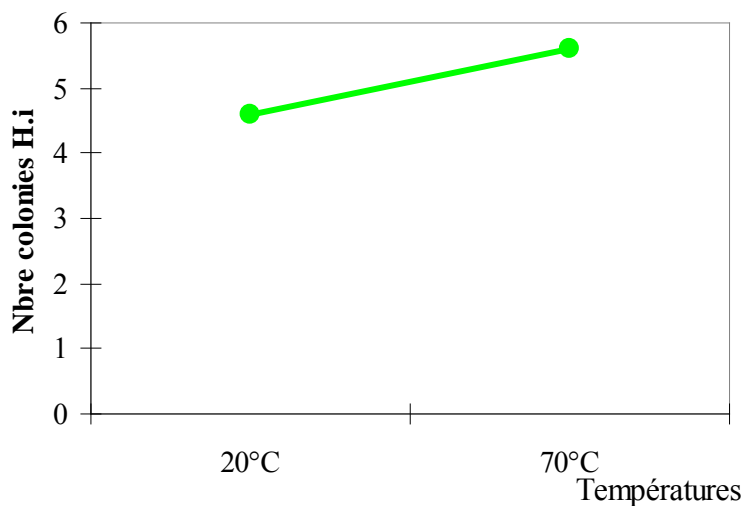


Figure 5 : Variation du nombre de colonies en fonction des températures

Nbre colonies H.i = Nombre de colonies d'*Haemophilus influenzae*

BCC : Bouillon cœur-cervelle ; **MGY** : Milieu au lait

Résultats et Discussion

Températures	Moyenne du nombre de colonies	Groupes	
-20°C	4,582	A	
-70°C	5,594		B

Newman-Keuls / Analyse des différences entre les températures avec un intervalle de confiance à 95%

Il y a une différence significative du nombre colonies entre les températures -70°C et -20°C (ANOVA, SNK, $p=0,004$). Le nombre de colonies est plus important à -70°C qu'à -20°C.

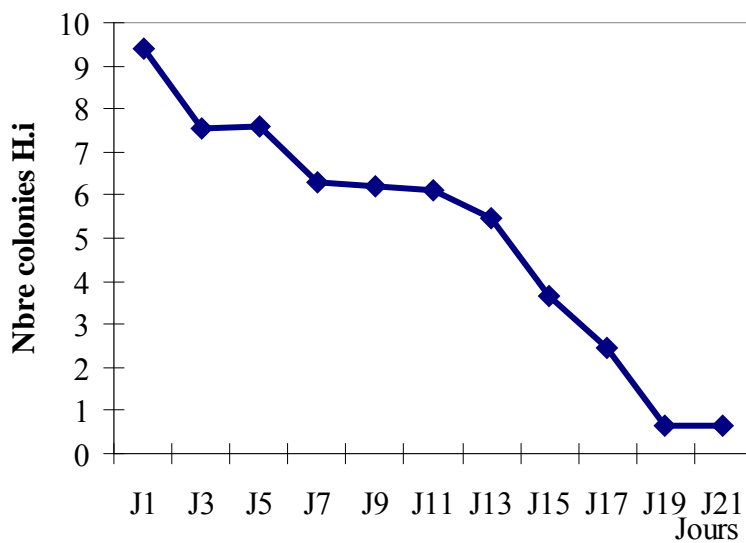


Figure 6 : Variation du nombre de colonies en fonction de la durée de conservation

Nbre colonies H.i = Nombre de colonies d'*Haemophilus influenzae*

BCC : Bouillon cœur-cerveille ; **MGY** : Milieu au lait

J1, J2,...J21 = 1^{er} jour, 2nd jour,...21^{eme} jour.

Résultats et Discussion

Jours	Moyenne du nombre de colonies	Groupes			
J21	0,648	A			
J19	0,650	A			
J17	2,448	A	B		
J15	3,674		B		
J13	5,451			C	
J11	6,107			C	
J9	6,201			C	
J7	6,274			C	
J3	7,565			C	D
J5	7,573			C	D
J1	9,379				D

Newman-Keuls / Analyse des différences entre les jours avec un intervalle de confiance à 95%

Plus la durée de conservation de la souche est longue, plus le nombre de colonies diminue. Il y a quatre groupes qui se dégagent :

- Groupe A : il n'y a pas de différence significative entre le J21 et J19 (A)
- Groupe B : pas de différence significative entre J17, J15.
- Groupe C : pas de différence significative également entre J13, J11, J9, J7, J5, J3.
- Groupe D : J1 différent de tous les autres groupes. (D)

Cependant, nous précisons que J17 est intermédiaire entre J19 et J15. De même J5 et intermédiaire entre J3 et J1.

Résultats et Discussion

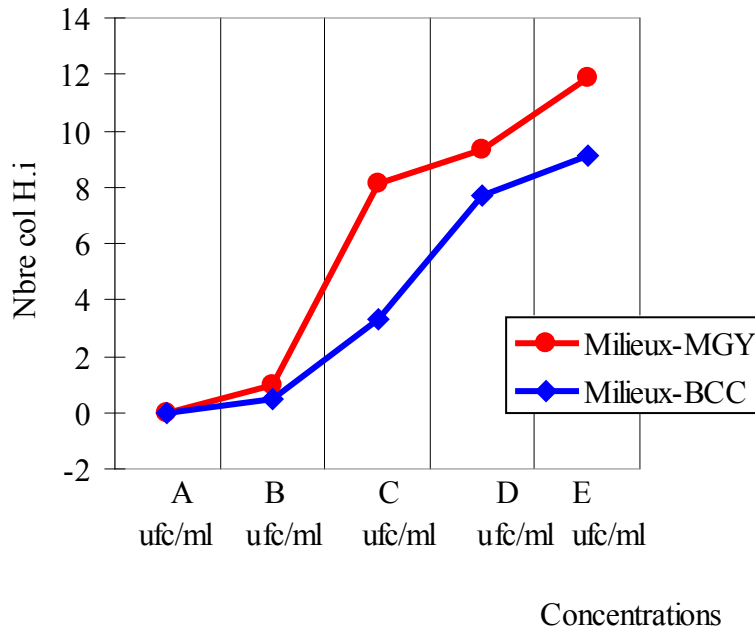


Figure 7 : Variation du nombre de colonies en fonction des milieux- concentrations

Nbre colonies H.i = Nombre de colonies d'*Haemophilus influenzae*

BCC : Bouillon cœur-cerveille ; **MGY** : Milieu au lait

Milieux*Concentrations	Moyenne nombre de colonies	Groupes			
MGY*Concentrations-A ufc/ml	0,000	A			
BCC*Concentrations-A ufc/ml	0,000	A			
BCC*Concentrations-B ufc/ml	0,500	A			
MGY*Concentrations-B ufc/ml	0,955	A			
BCC*Concentrations-C ufc/ml	3,290		B		
BCC*Concentrations-D ufc/ml	7,715			C	
MGY*Concentrations-C ufc/ml	8,100			C	
BCC*Concentrations-E ufc/ml	9,101			C	
MGY*Concentrations-D ufc/ml	9,333			C	
MGY*Concentrations-E ufc/ml	11,888				D

Newman-Keuls (SNK) / Analyse des différences entre les Milieux*Concentrations avec un intervalle de confiance à 95% :

Quatre groupes se dégagent dans ce tableau :

- **Groupe A** : il n'y a pas de différence significative du nombre de colonies entre les Milieux-MGY*Concentrations-A, Milieux-BCC*Concentrations-A, Milieux-BCC*Concentrations-B, Milieux-BCC*Concentrations-B. La moyenne des colonies est nulle
- **Groupe B** : qui n'est identique à aucun groupe.

Résultats et Discussion

- **Groupe C** : pas de différence significative également entre les Milieux-BCC*Concentrations-D, Milieux-MGY*Concentrations-C, Milieux-BCC*Concentrations-E, Milieux-BCC*Concentrations-E et milieux-MGY*Concentrations-D.
- **Groupe D** : qui n'est identique à aucun groupe.

Notons que le nombre de colonies est beaucoup plus important (11,88 en moyenne) dans E (concentration la plus élevée) du MGY que dans les autres concentrations.

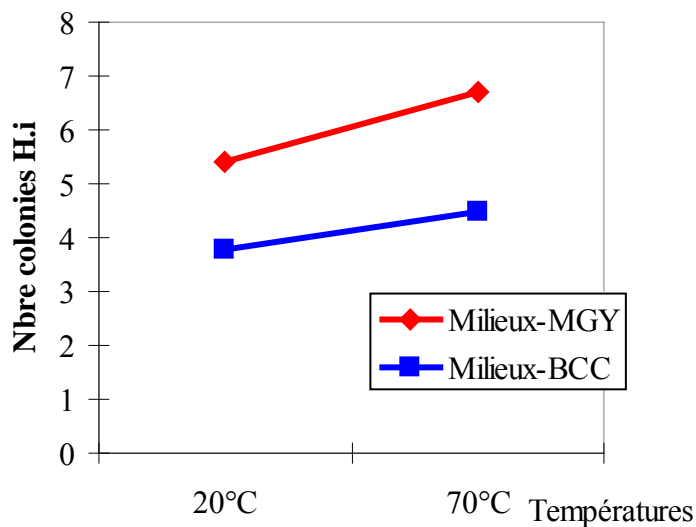


Figure 8 : variation du nombre de colonies en fonction des milieux*températures

Nbre colonies H.i = Nombre de colonies d'*Haemophilus influenzae*

BCC : Bouillon cœur-cerveille ; MGY : Milieu au lait

Milieux*Températures	Moyenne du nombre de colonies	Groupes		
Milieux-BCC*Températures-20°C	3,770	A		
Milieux-BCC*Températures-70°C	4,472	A	B	
Milieux-MGY*Températures-20°C	5,395		B	
Milieux-MGY*Températures-70°C	6,715			C

Newman-Keuls (SNK) / Analyse des différences entre les Milieux*Températures avec un intervalle de confiance à 95% :

Nous avons trois groupes dans ce tableau :

- ✓ **Groupe A** : qui n'est identique à aucun groupe.
- ✓ **Groupe B** : il n'y a pas de différence significative entre le BCC-70°C et le MGY-20°C.

Résultats et Discussion

- ✓ **Groupe C** : qui n'est identique à aucun groupe. C'est dans ce groupe que l'on a le plus grand nombre de colonies (6 colonies en moyenne).
- le BCC-70°C est intermédiaire entre le BCC- 20°C et le MGY-20°C.

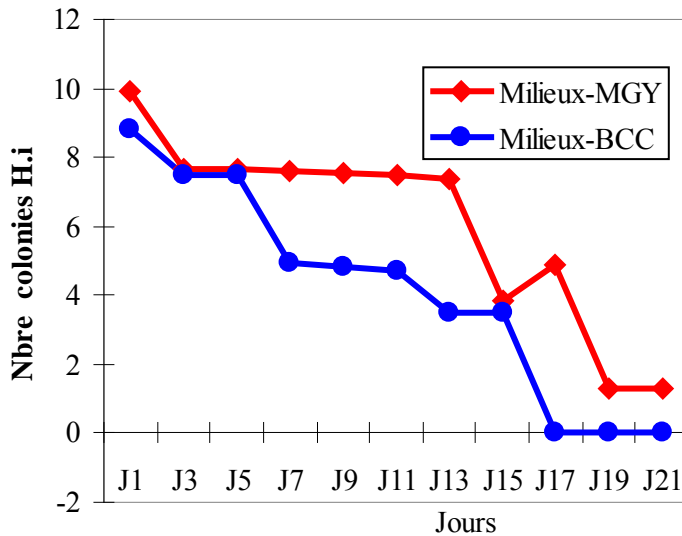


Figure 9 : Variation du nombre de colonies en fonction des milieux*Jours

Nbre colonies H.i = Nombre de colonies d'*Haemophilus influenzae*

BCC : Bouillon cœur-cervelle ; **MGY** : Milieu au lait

J1,..., J21 = 1^{er} jour,..., 21^{eme} jour

Milieux*Jours	Moyenne du nombre de colonies	Groupes				
BCC*Jours-J17	0,000	A				
BCC*Jours-J19	0,000	A				
BCC*Jours-J21	0,000	A				
MGY*Jours-J21	1,297	A	B			
MGY*Jours-J19	1,300	A	B			
BCC*Jours-J15	3,484		B	C		
BCC*Jours-J13	3,514		B	C		
MGY*Jours-J15	3,864		B	C	D	
BCC*Jours-J11	4,731			C	D	
BCC*Jours-J9	4,847			C	D	
MGY*Jours-J17	4,895			C	D	
BCC*Jours-J7	4,957			C	D	
MGY*Jours-J13	7,387				D	E
BCC*Jours-J5	7,478				D	E
MGY*Jours-J11	7,483				D	E
BCC*Jours-J3	7,484				D	E
MGY*Jours-J9	7,555				D	E
MGY*Jours-J7	7,590				D	E

Résultats et Discussion

Milieux*Jours	Moyenne du nombre de colonies	Groupes				
MGY*Jours-J3	7,646				D	E
MGY*Jours-J5	7,667				D	E
BCC*Jours-J1	8,837					E
MGY*Jours-J1	9,921					E

Newman-Keuls (SNK) / Analyse des différences entre les Milieux*Jours avec un intervalle de confiance à 95% :

- **Groupe A** : il n'y a pas de différence significative de nombre de colonies entre le BCC*Jours-J17, 21, 19. Aucune colonie n'est viable.
- **Groupe B** : pas de différence significative entre le MGY*Jours-J21 et le MGY*J19.
- **Groupe C** : différence non significative entre le BCC*J15, J13 et le MGY*J15.
- **Groupe D** : différence non significative entre le BCC*J11, J9, J7 et le MGY*J17.
- **Groupe E** : pas de différence significative entre le BCC*J5, J3, J1 et le MGY*J13, J11, J9, J7, J5, J3 et J1. C'est dans ce groupe d'ailleurs que nous rencontrons le plus grand nombre de survies.

-MGY*J21 est intermédiaire entre BCC*J21 et le MGY*J19.

- MGY*J19 est intermédiaire entre le MGY*J21 et le BCC*J15.

-MGY*J15 est intermédiaire entre le BCC*J13 et le BCC*J11.

-BCC*J7 est intermédiaire entre le MGY*J17 et le MGY*J13.

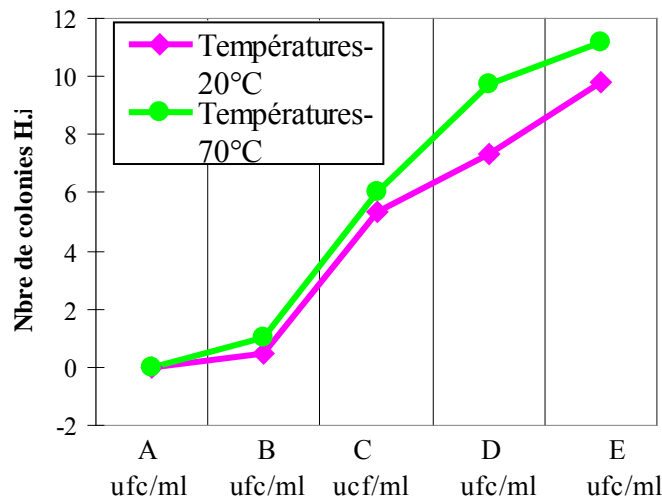


Figure 10 : Variation du nombre de colonies en fonction de concentrations*températures

Nbre colonies H.i = Nombre de colonies d'*Haemophilus influenzae*

BCC : Bouillon cœur-cervelle ; **MGY** : Milieu au lait

Résultats et Discussion

Concentrations*températures	Moyenne du nombre de colonies	Groupes			
Con-A ufc/ml*Températures-20°C	0,000	A			
Con-A ufc/ml*Températures-70°C	0,000	A			
Con-B ufc/ml*Températures-20°C	0,455	A			
Con-B ufc/ml*Températures-70°C	1,000	A			
Con-C ufc/ml*Températures-20°C	5,332		B		
Con-C ufc/ml*Températures-70°C	6,057		B	C	
Con-D ufc/ml*Températures-20°C	7,331			C	
Con-D ufc/ml*Températures-70°C	9,716				D
Con-E ufc/ml*Températures-20°C	9,794				D
Con-E ufc/ml*Températures-70°C	11,195				D

Newman-Keuls (SNK) / Analyse des différences entre les Concentrations*Températures avec un intervalle de confiance à 95% :

Con = Concentration

- ❖ **Groupe A** : il n'y a pas de différence significative entre les concentrations A*Température-20°C, Con-A*Température-70°C, Con-B*Température-20°C et B*Température-70°C.
- ❖ **Groupe B** : il n'est identique à aucun groupe.
- ❖ **Groupe C** : pas de différence significative entre la concentration Con-C*Température-70°C et Con-D*Température-20°C.
- ❖ **Groupe D** : pas de différence significative entre Con-E*Température-70°C, Con-E*température-20°C et D*Température-70°C.

Cependant Con-C*Température-70°C est intermédiaire entre Con-C*Température-20°C et Con-D*Température-20°C.

Résultats et Discussion

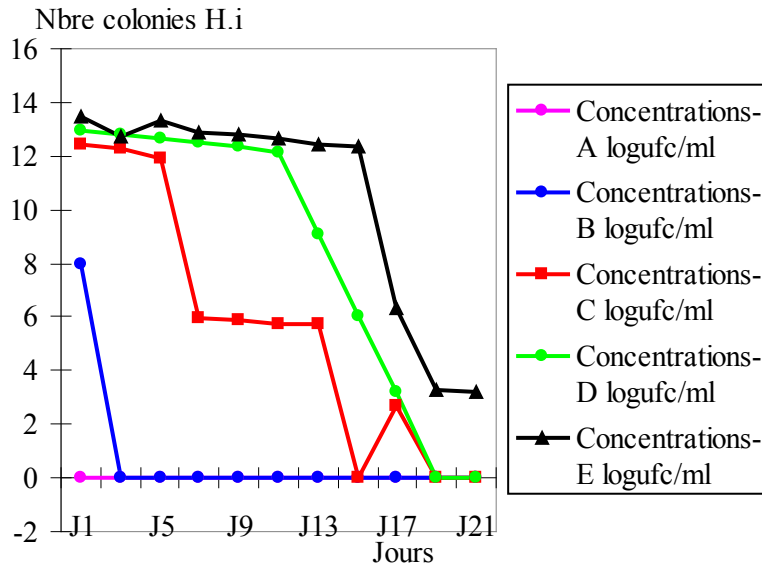


Figure 11 : Variation du nombre de colonies en fonction des concentrations*jours

Nbrc colonies H.i = Nombre de colonies d'*Haemophilus influenzae*

BCC : Bouillon cœur-cervelle ; **MGY** : Milieu au lait

J1,..., J21 = 1^{er} jour,..., 21^{eme} jour

Concentrations*Jours	Moyenne du nombre de colonies	Groupes			
Con-A ufc/ml*Jours-J3	0,000	A			
Con-A ufc/ml*Jours-J5	0,000	A			
Con-A ufc/ml*Jours-J15	0,000	A			
Con-A ufc/ml*Jours-J21	0,000	A			
Con-A ufc/ml*Jours-J17	0,000	A			
Con-D ufc/ml*Jours-J19	0,000	A			
Con-C ufc/ml*Jours-J19	0,000	A			
Con-A ufc/ml*Jours-J9	0,000	A			
Con-A ufc/ml*Jours-J7	0,000	A			
Con-D ufc/ml*Jours-J21	0,000	A			
Con-A ufc/ml*Jours-J11	0,000	A			
Con-C ufc/ml*Jours-J15	0,000	A			
Con-C ufc/ml*Jours-J21	0,000	A			
Con-A ufc/ml*Jours-J19	0,000	A			
Con-A ufc/ml*Jours-J13	0,000	A			
Con-B ufc/ml*Jours-J9	0,000	A			
Con-B ufc/ml*Jours-J13	0,000	A			
Con-B ufc/ml*Jours-J3	0,000	A			
Con-B ufc/ml*Jours-J17	0,000	A			
Con-B ufc/ml*Jours-J15	0,000	A			
Con-B ufc/ml*Jours-J11	0,000	A			
Con-B ufc/ml*Jours-J5	0,000	A			

Résultats et Discussion

Concentrations*Jours	Moyenne du nombre de colonies	Groupes			
Con-B ufc/ml*Jours-J7	0,000	A			
Con-B ufc/ml*Jours-J21	0,000	A			
Con-B ufc/ml*Jours-J19	0,000	A			
Con-A ufc/ml*Jours-J1	0,000	A			
Con-C ufc/ml*Jours-J17	2,672	A	B		
Con-D ufc/ml*Jours-J17	3,217	A	B		
Con-E ufc/ml*Jours-J21	3,243	A	B		
Con-E ufc/ml*Jours-J19	3,250	A	B		
Con-C ufc/ml*Jours-J13	5,733	A	B	C	
Con-C ufc/ml*Jours-J11	5,765	A	B	C	
Con-C ufc/ml*Jours-J9	5,895	A	B	C	
Con-C ufc/ml*Jours-J7	5,960	A	B	C	
Con-D ufc/ml*Jours-J15	6,050	A	B	C	
Con-E ufc/ml*Jours-J17	6,348	A	B	C	
Con-B ufc/ml*Jours-J1	8,000		B	C	D
Con-D ufc/ml*Jours-J13	9,092			C	D
Con-C ufc/ml*Jours-J5	11,888				D
Con-D ufc/ml*Jours-J11	12,110				D
Con-C ufc/ml*Jours-J3	12,273				D
Con-E ufc/ml*Jours-J15	12,320				D
Con-D ufc/ml*Jours-J9	12,335				D
Con-E ufc/ml*Jours-J13	12,428				D
Con-C ufc/ml*Jours-J1	12,455				D
Con-D ufc/ml*Jours-J7	12,535				D
Con-E ufc/ml*Jours-J11	12,660				D
Con-D ufc/ml*Jours-J5	12,673				D
Con-E ufc/ml*Jours-J3	12,738				D
Con-E ufc/ml*Jours-J9	12,775				D
Con-D ufc/ml*Jours-J3	12,815				D
Con-E ufc/ml*Jours-J7	12,873				D
Con-D ufc/ml*Jours-J1	12,935				D
Con-E ufc/ml*Jours-J5	13,303				D
Con-E ufc/ml*Jours-J1	13,505				D

Newman-Keuls (SNK) / Analyse des différences entre les Concentrations*Jours avec un intervalle de confiance à 95% :

Con = Concentration

Nous notons quatre groupes :

- **Groupe A** : pas de différence significative entre Con-A *J3, A *J5, A*J15, A *J21, A *J17, D *J19, C *J19, A *J9, A *J7, D *J21, A*J11, C*J15, C*J21, A *J19, A *J13, B*J9, B*J13, B *J3, B*J17, B *J15, B*J11, B*J5, B*J7, B*J21, B*J19, A*J1
- **Groupe B**: pas de différence significative entre C *J17, D *J17, E *J21, E *J19

Résultats et Discussion

- **Groupe C** : également pas de différence significative entre C *J13, C*J11, C*J9, C *J7, D*J15, E*J17
- **Groupe D** : Pas de différence significative entre B*J1, D*J13, C*J5, D*J11, C*J3, E *J15, D*J9, E*J13, C*J1, D*J7, E*J11, D*J5, E*J3, E*J9, D*J3, E*J7, D*J1, E*J5, E*J1. C'est dans ce groupe que nous rencontrons le plus grand nombre de survies de la souche.

-C*J17 est intermédiaire entre A*J1 et D*J17.

-E*J19 est intermédiaire entre E*J21 et C*J13.

-E*J17 est intermédiaire entre D*J15 et B*J1.

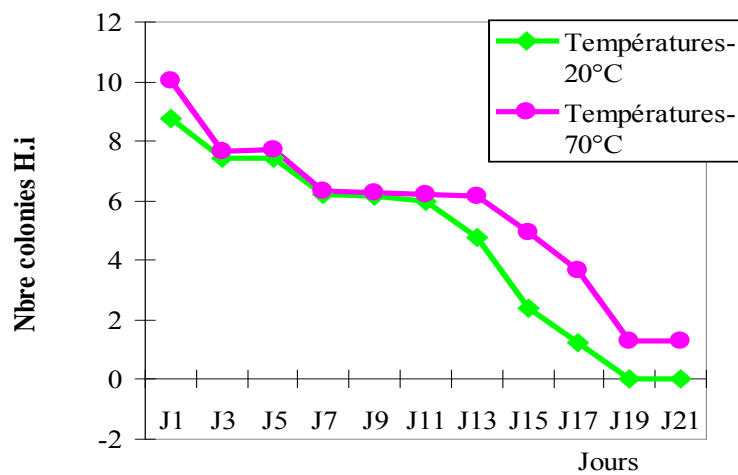


Figure 12 : Variation du nombre de colonies en fonction des températures*jours

Nbre colonies H.i = Nombre de colonies d'*Haemophilus influenzae*

BCC : Bouillon cœur-cerveille ; **MGY** : Milieu au lait

J1,..., J21 = 1^{er} jour,..., 21^{eme} jour

Températures*Jours	Moyenne du nombre de colonies	Groupes						
T-20°C*Jours-J19	0,000	A						
T-20°C*Jours-J21	0,000	A						
T-20°C*Jours-J17	1,239	A	B					
T-70°C*Jours-J21	1,297	A	B					
T-70°C*Jours-J19	1,300	A	B					
T-20°C*Jours-J15	2,423	A	B	C				
T-70°C*Jours-J17	3,656		B	C	D			
T-20°C*Jours-J13	4,765			C	D	E		
T-70°C*Jours-J15	4,925			C	D	E	F	
T-20°C*Jours-J11	5,996				D	E	F	
Te-20°C*Jours-J9	6,130				D	E	F	
T-70°C*Jours-J13	6,136				D	E	F	

Résultats et Discussion

Températures*Jours	Moyenne du nombre de colonies	Groupes						
T-70°C*Jours-J11	6,218				D	E	F	
T-20°C*Jours-J7	6,226				D	E	F	
T-70°C*Jours-J9	6,272				D	E	F	
T-70°C*Jours-J7	6,321				D	E	F	
T-20°C*Jours-J5	7,443				D	E	F	G
T-20°C*Jours-J3	7,445				D	E	F	G
T-70°C*Jours-J3	7,685					E	F	G
T-70°C*Jours-J5	7,702					E	F	G
T-20°C*Jours-J1	8,740						F	G
T-70°C*Jours-J1	10,018							G

Newman-Keuls (SNK) / Analyse des différences entre les Températures*Jours avec un intervalle de confiance à 95% :

T = Température

Nous avons 7 groupes :

- ✓ **Groupe A** : Pas de différence significative entre Température-20°C*J19 et Température-20°C*J21.
 - ✓ **Groupe B** : Pas de différence significative entre Températures-20°C*J17, Températures-70°C*J21, Températures-70°C*J19
 - ✓ **Groupe C** : différence non significative entre Températures-20°C*J15, Températures-70°C*J17
 - ✓ **Groupe D** : différence non significative entre Températures-20°C*Jours-J15, Températures-70°C*Jours-J17
 - ✓ **Groupe E** : différence non significative entre Températures-20°C*Jours-J13, Températures-70°C*Jours-J15
 - ✓ **Groupe F** : différence non significative entre Températures-20°C*J11, Températures-20°C*J9, Températures-70°C*J13, Températures-70°C*J11, Températures-20°C*J7, Température-70°C*J9, Températures-70°C*J7.
 - ✓ **Groupe G** : différence non significative entre Températures-20°C*J5, Températures-20°C*J3, Températures-70°C*J3, Températures-70°C*J5, Températures-20°C*J1, Températures-70°C*J1
- T-20°C*J17 est intermédiaire entre T-20°C*J21 et T-70°C*J21.
- T-70°C*J19 est intermédiaire entre T-70°C*J21 et T-20°C*J15
- T-20°C*J15 est intermédiaire entre T-70°C*J19 et T-70°C*J17.
- T-20°C*J13 est intermédiaire entre T-70°C*J17 et T-70°C*J15
- T-70°C*J15 est intermédiaire entre T-20°C*J13 et T-20°C*J11
- T-20°C*J5 est intermédiaire entre T-70°C*J7 et T-20°C*J3.

Résultats et Discussion

- *S.pneumoniae*

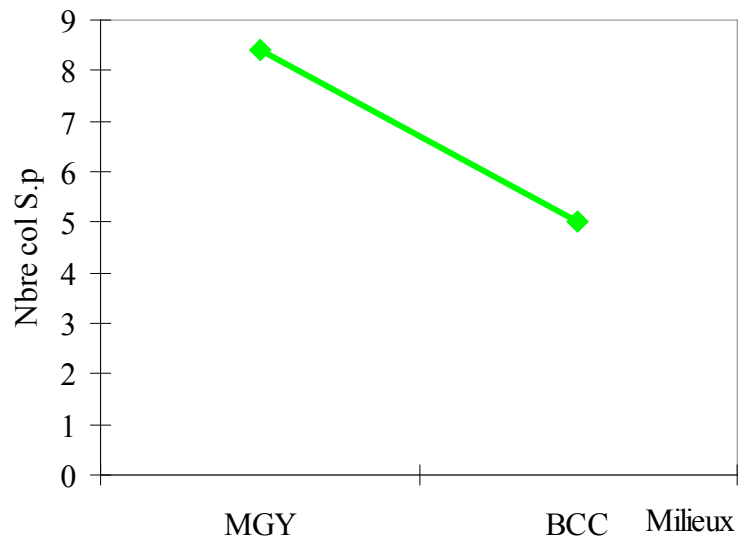


Figure 13 : Variation du nombre de colonies en fonction des milieux

Nbre de col S.p = Nombre de colonies de *Streptococcus pneumoniae*

BCC = Bouillon cœur-cervele ; MGY = Milieu au lait

Milieux	Moyenne du nombre de colonies	Groupes	
BCC	5,025	A	
MGY	8,402		B

Newman-Keuls (SNK) / Analyse des différences entre les Milieux avec un intervalle de confiance à 95% :

Le nombre de colonies est plus important dans le MGY qu'il l'est dans le BCC. La différence du nombre de colonies entre ces deux milieux est significative (ANOVA, SNK, $p < 0,0001$).

Résultats et Discussion

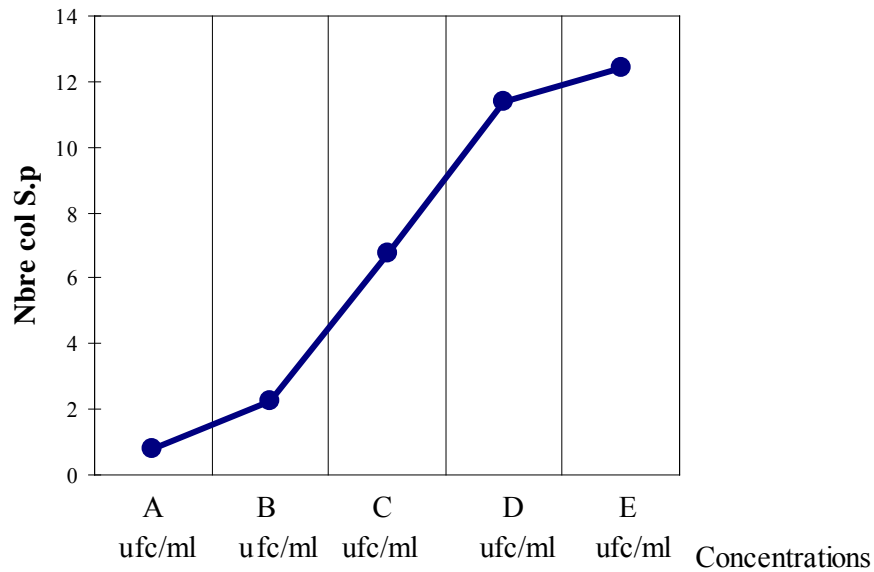


Figure 14 : Variation du nombre de colonies en fonction des concentrations

Nbre de col S.p = Nombre de colonies de *Streptococcus pneumoniae*

BCC = Bouillon cœur-cervelle ; MGY = Milieu au lait

Concentrations	Moyenne du nombre de colonies	Groupes			
A ufc/ml	0,780	A			
B ufc/ml	2,258		B		
C ufc/ml	6,755			C	
D ufc/ml	11,387				D
E ufc/ml	12,388				D

Newman-Keuls (SNK) / Analyse des différences entre les Concentrations avec un intervalle de confiance à 95% :

La différence du nombre de colonies pour les concentrations A, B et C est significative.

Par contre il n'y a pas une différence significative entre les plus fortes concentrations D et E (ANOVA, SNK, $p=0,123$).

Résultats et Discussion

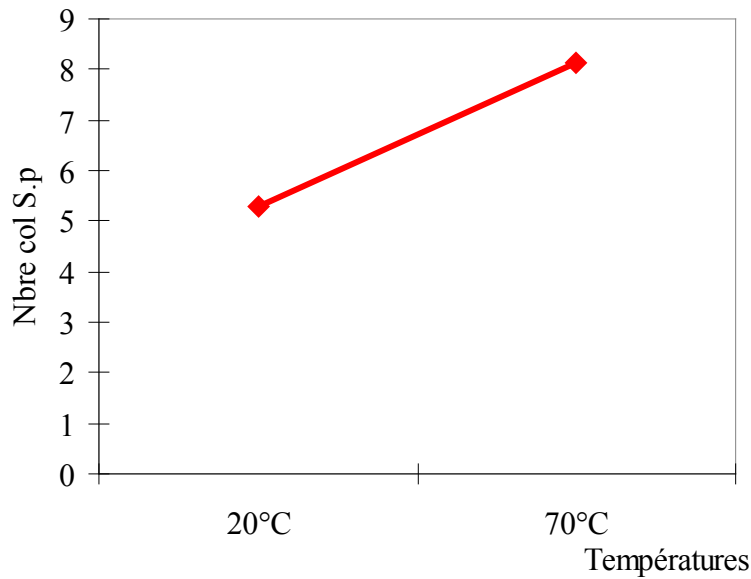


Figure 15 : Variation du nombre de colonies en fonction des températures
Nbre de col S.p = Nombre de colonies de *Streptococcus pneumoniae*
BCC = Bouillon cœur-cerveille ; MGY = Milieu au lait

Températures	Moyenne du nombre de colonies	Groupes	
-20°C	5,289	A	
-70°C	8,139		B

Newman-Keuls (SNK) / Analyse des différences entre les Températures avec un intervalle de confiance à 95% :

Le taux de viabilité de la souche est important pour les températures de conservation les plus basses. Il y a donc une différence significative de nombre de colonies entre les deux températures -20°C et -70°C (ANOVA, SNK, $p < 0,0001$).

Résultats et Discussion

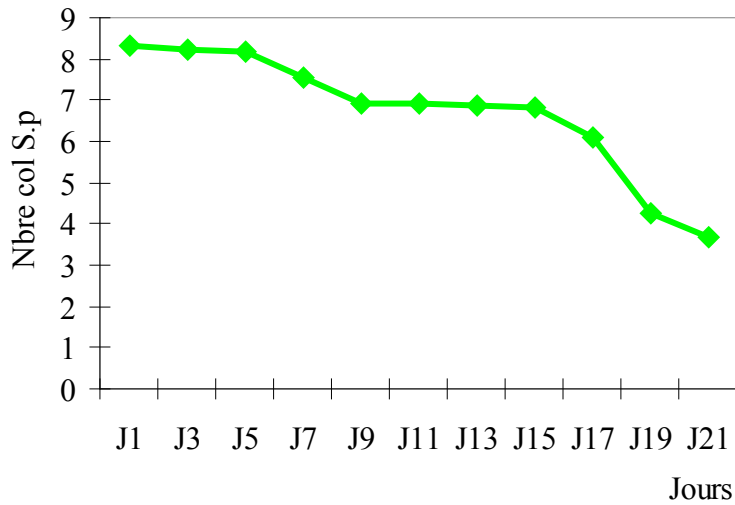


Figure 16 : Variation du nombre de colonies en fonction de la durée de conservation

Nbre de col S.p = Nombre de colonies de *Streptococcus pneumoniae*

BCC = Bouillon cœur-cervelle ; **MGY** = Milieu au lait

J1, J2,..., J21 = 1^{er} jour, 2nd jour, ...21^{eme} jour

Jours	Moyenne du nombre de colonies	Groupes		
J21	3,691	A		
J19	4,255	A	B	
J17	6,105		B	C
J15	6,818		B	C
J13	6,848		B	C
J11	6,905		B	C
J9	6,943		B	C
J7	7,553			C
J5	8,177			C
J3	8,243			C
J1	8,315			C

Newman-Keuls (SNK) / Analyse des différences entre les Jours avec un intervalle de confiance à 95%

Le nombre de colonies diminue en fonction de la durée de conservation ; plus la durée de conservation est longue, moindre est le nombre de colonies.

Nous avons noté des différences non significatives à certains niveaux :

- J21 et J19 (Groupe A) ;
- J17, J15, J13, J11, J9 (groupe B);
- J7, J5, J3 et J1 (groupe C).

Résultats et Discussion

-J19 est intermédiaire entre J21 et J17 ;

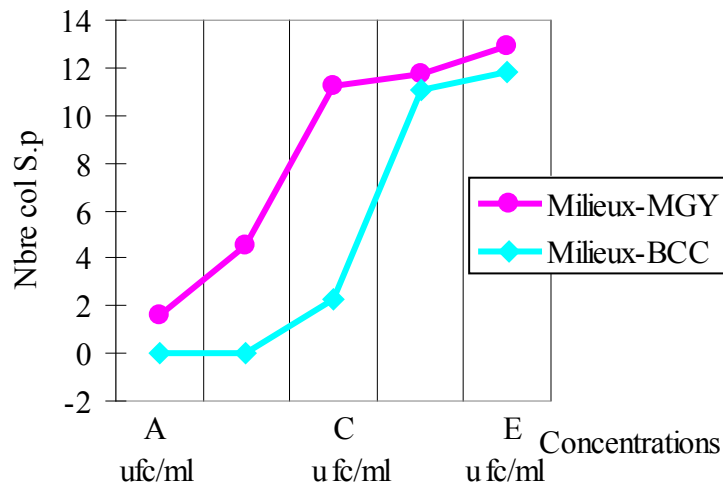


Figure 17 : Variation du nombre de colonies en fonction des milieux*concentrations

Nbre de col S.p = Nombre de colonies de *Streptococcus pneumoniae*

BCC = Bouillon cœur-cervelle ; MGY = Milieu au lait

Milieux*Concentrations	Moyenne du nombre de colonies	Groupes		
BCC*Concentrations-A ufc/ml	0,000	A		
BCC*Concentrations-B ufc/ml	0,000	A		
MGY*Concentrations-A ufc/ml	1,561	A		
BCC*Concentrations-C ufc/ml	2,234	A		
MGY*Concentrations-B ufc/ml	4,516		B	
BCC*Concentrations-D ufc/ml	11,040			C
MGY*Concentrations-C ufc/ml	11,275			C
MGY*Concentrations-D ufc/ml	11,734			C
BCC*Concentrations-E ufc/ml	11,852			C
MGY*Concentrations-E ufc/ml	12,925			C

Newman-Keuls (SNK) / Analyse des différences entre les Milieux*Concentrations avec un intervalle de confiance à 95 % :

Nous distinguons trois groupes :

- **Groupe A** : Il n'y a pas de différence significative entre BCC*A, BCC*B, MGY*A, BCC*C.
- **Groupe B** : Il n'y a pas de différence significative entre MGY*B différent des autres groupes ;
- **Groupe C** : Pas de différence significative entre BCC*D, MGY*C, MGY*D, BCC*E, MGY*E

Résultats et Discussion

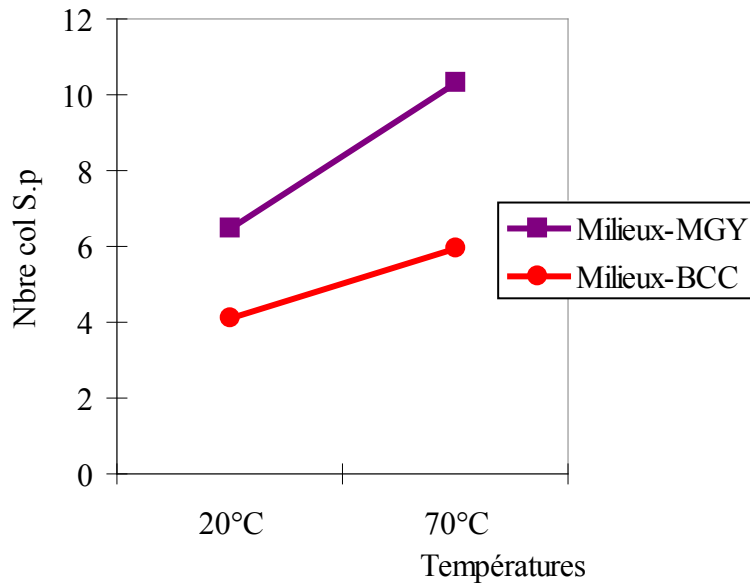


Figure 18 : Variation du nombre de colonies en fonction des milieux*températures
 Nbre de col S.p = Nombre de colonies de *Streptococcus pneumoniae*
 BCC = Bouillon cœur-cervelle ; MGY = Milieu au lait

Milieux*Températures	Moyenne du nombre de colonies	Groupes		
BCC*Températures-20°C	4,113	A		
BCC*Températures-70°C	5,937		B	
MGY*Températures-20°C	6,464		B	
MGY*Températures-70°C	10,340			C

Newman-Keuls (SNK) / Analyse des différences entre les Milieux*Températures avec un intervalle de confiance à 95% :

Il y a trois groupes :

- **Groupe A** significativement différent des autres groupes ;
- **Groupe B** où le BCC*T-70°C et le MGY*T-20°C sont presque identiques ;
- **Groupe C** n'est identique à aucun groupe.

Résultats et Discussion

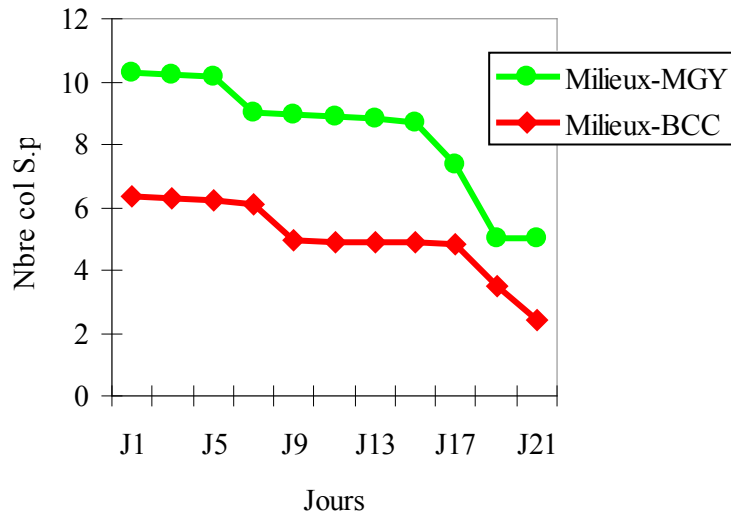


Figure 19 : Variation du nombre de colonies en fonction des milieux*jours

Nbre de col S.p = Nombre de colonies de *Streptococcus pneumoniae*

BCC = Bouillon cœur-cervelle ; **MGY** = Milieu au lait

J1,..., J21 = 1^{er} jour,..., 21^{eme} jour

Milieux*Jours	Moyenne du nombre de colonies	Groupes			
BCC*Jours-J21	2,393	A			
BCC*Jours-J19	3,522	A	B		
BCC*Jours-J17	4,840	A	B	C	
BCC*Jours-J13	4,883	A	B	C	
BCC*Jours-J11	4,890	A	B	C	
BCC*Jours-J15	4,905	A	B	C	
BCC*Jours-J9	4,921	A	B	C	
MGY*Jours-J19	4,987	A	B	C	
MGY*Jours-J21	4,989	A	B	C	
BCC*Jours-J7	6,106	A	B	C	D
BCC*Jours-J5	6,202	A	B	C	D
BCC*Jours-J3	6,293	A	B	C	D
BCC*Jours-J1	6,321	A	B	C	D
MGY*Jours-J17	7,370		B	C	D
MGY*Jours-J15	8,730			C	D
MGY*Jours-J13	8,813			C	D
MGY*Jours-J11	8,919			C	D
MGY*Jours-J9	8,965			C	D
MGY*Jours-J7	8,999			C	D
MGY*Jours-J5	10,152				D
MGY*Jours-J3	10,193				D
MGY*Jours-J1	10,309				D

Newman-Keuls (SNK) / Analyse des différences entre les Milieux*Jours avec un intervalle de confiance à 95% :

Résultats et Discussion

Nous avons quatre groupes :

- Pas de différence du nombre de colonies entre BCC*J21 et BCC*J19 (groupe A),
- Pas de différence du nombre de colonies entre BCC*J17, BCC*J13, BCC*J11, BCC*J15, BCC*J9, MGY*J19, MGY*J21 (groupe B)
- Idem pour BCC*J7, BCC*J5, BCC*J3, BCC*J1 (groupe C) ;
- Pas de différence du nombre de colonies entre MGY*J17, MGY*J15, MGY*J13, MGY*J11, MGY*J9, MGY*-J7 (groupe D).

-BCC*J19 est intermédiaire entre BCC*J21 et BCC*J17

-MGY*J21 est intermédiaire entre MGY*19 et BCC*J7

-BCC*J1 est intermédiaire entre BCC*J3 et MGY*17.

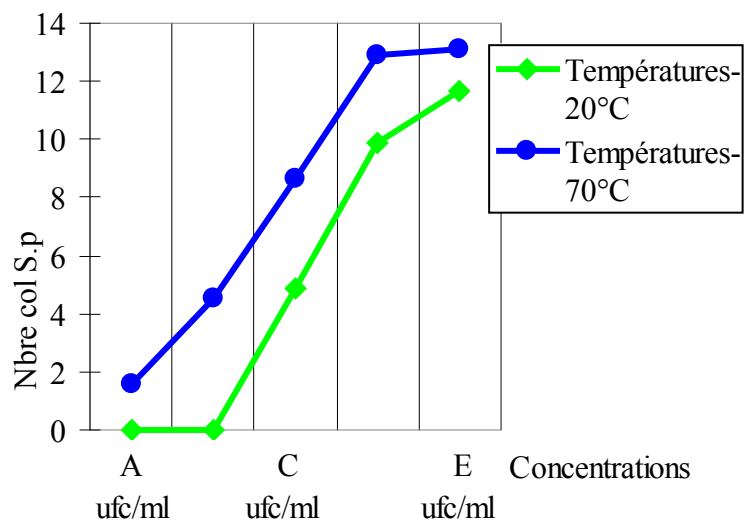


Figure 20 : Variation du nombre de colonies en fonction des concentrations*températures

Nbre de col S.p = Nombre de colonies de *Streptococcus pneumoniae*

BCC = Bouillon cœur-cerveille ; MGY = Milieu au lait

Résultats et Discussion

Concentrations*Températures	Moyenne du nombre de colonies	Groupes			
Con-B ufc/ml*Températures-20°C	0,000	A			
Con-A ufc/ml*Températures-20°C	0,000	A			
Con-A ufc/ml*Températures-70°C	1,561	A			
Con-B ufc/ml*Températures-70°C	4,516		B		
Con-C ufc/ml*Températures-20°C	4,864		B		
Con-C ufc/ml*Températures-70°C	8,645			C	
Con-D ufc/ml*Températures-20°C	9,883			C	
Con-E ufc/ml*Températures-20°C	11,697				D
Con-D ufc/ml*Températures-70°C	12,891				D
Con-E ufc/ml*Températures-70°C	13,080				D

Newman-Keuls (SNK) / Analyse des différences entre les Concentrations*Températures avec un intervalle de confiance à 95% :

Nous notons quatre groupes :

- **Groupe A** : pas de différence significative entre B*T-20°C, A*T-20°C, A*T-70°C.
- **Groupe B** : le nombre de colonies entre B*T-70°C et C*T-20°C n'est pas significatif.
- **Groupe C** : Il l'est de même entre C*T-70°C et D*T-20°C.
- **Groupe D** : pas de différence significative entre E*T-20°C, D*T-70°C et E*T-70°C.

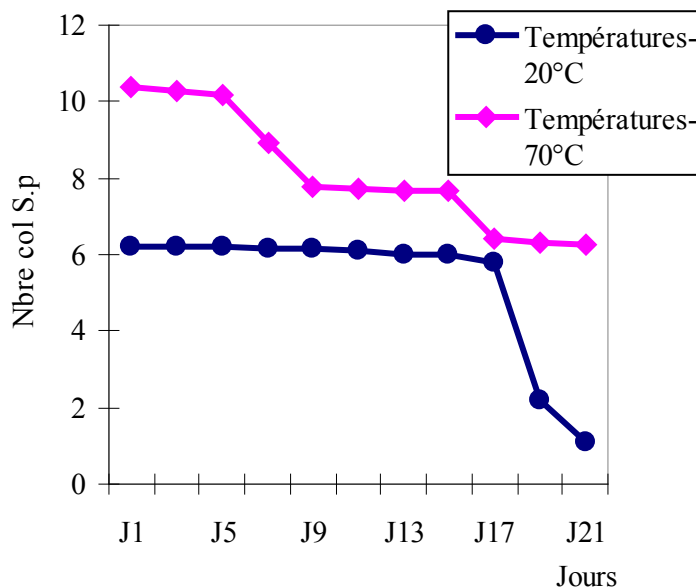


Figure 21 : Variation du nombre de colonies en fonction des températures*jours
 Nbre de col S.p = Nombre de colonies de *Streptococcus pneumoniae*
 BCC = Bouillon cœur-cervelle ; MGY = Milieu au lait
 J1,..., J21 = 1^{er} jour,..., 21^{eme} jour

Résultats et Discussion

Températures*Jours	Moyenne du nombre de colonies	Groupes		
Températures-20°C*Jours-J21	1,117	A		
Températures-20°C*Jours-J19	2,208	A	B	
Températures-20°C*Jours-J17	5,805		B	C
Températures-20°C*Jours-J15	5,990		B	C
Températures-20°C*Jours-J13	6,020		B	C
Températures-20°C*Jours-J11	6,091		B	C
Températures-20°C*Jours-J9	6,138		B	C
Températures-20°C*Jours-J7	6,161		B	C
Températures-20°C*Jours-J5	6,198		B	C
Températures-20°C*Jours-J3	6,221		B	C
Températures-20°C*Jours-J1	6,227		B	C
Températures-70°C*Jours-J21	6,265		B	C
Températures-70°C*Jours-J19	6,301		B	C
Températures-70°C*Jours-J17	6,405		B	C
Températures-70°C*Jours-J15	7,645			C
Températures-70°C*Jours-J13	7,676			C
Températures-70°C*Jours-J11	7,718			C
Températures-70°C*Jours-J9	7,748			C
Températures-70°C*Jours-J7	8,944			C
Températures-70°C*Jours-J5	10,156			C
Températures-70°C*Jours-J3	10,265			C
Températures-70°C*Jours-J1	10,403			C

Newman-Keuls (SNK) / Analyse des différences entre les Températures*Jours avec un intervalle de confiance à 95%

Nous notons trois groupes :

- ❖ **Groupe A** : la différence du nombre de colonies entre T-20°C*J21 et T-20°C*J19 n'est pas significative.
- ❖ **Groupe B** : différence non significative entre -20°C*J17, -20°C*J15, -20°C*J13, -20°C*J11, -20°C*J9, -20°C*J7, -20°C*J5, -20°C*J3, -20°C*J1, -70°C*J21, -70°C*J19, -70°C*J17.
- ❖ **Groupe C** : pas de différence significative entre -70°C* J15, -70°C*J13, -70°C*J11, -70°C*J9, -70°C*J7, -70°C*J5, -70°C*J3, -70°C*J1

Résultats et Discussion

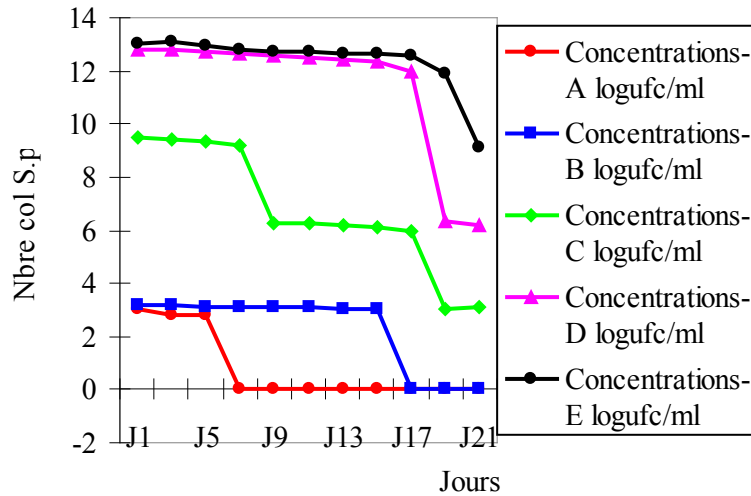


Figure 22 : Variation du nombre de colonies en fonction des concentrations*jours
 Nbre de col S.p = Nombre de colonies de *Streptococcus pneumoniae*
 BCC = Bouillon cœur-cerveau ; MGY = Milieu au lait

Concentrations*Jours	Moyenne du nombre de colonies	Groupes		
Con-A ufc/ml*J7	0,000	A		
Con-A ufc/ml*J19	0,000	A		
Con-A ufc/ml*J21	0,000	A		
Con-A ufc/ml*J17	0,000	A		
Con-A ufc/ml*J13	0,000	A		
Con-A ufc/ml*J15	0,000	A		
Con-A ufc/ml*J11	0,000	A		
Con-A ufc/ml*J9	0,000	A		
Con-B ufc/ml*J21	0,000	A		
Con-B ufc/ml*J19	0,000	A		
Con-B ufc/ml*J17	0,000	A		
Con-A ufc/ml*J3	2,792	A	B	
Con-A ufc/ml*J5	2,793	A	B	
Con-B ufc/ml*J15	3,000	A	B	
Con-B ufc/ml*J13	3,000	A	B	
Con-A ufc/ml*J1	3,000	A	B	
Con-C ufc/ml*J19	3,018	A	B	
Con-B ufc/ml*J11	3,090	A	B	
Con-C ufc/ml*J21	3,105	A	B	
Con-B ufc/ml*J9	3,115	A	B	
Con-B ufc/ml*J7	3,118	A	B	
Con-B ufc/ml*J5	3,130	A	B	
Con-B ufc/ml*J3	3,173	A	B	
Con-B ufc/mlJ1	3,215	A	B	

Résultats et Discussion

Concentrations*Jours	Moyenne du nombre de colonies	Groupes		
Con-C ufc/ml*J17	5,975	A	B	C
Con-C ufc/ml*J15	6,078	A	B	C
Con-C ufc/ml*J13	6,173	A	B	C
Con-D ufc/ml*J21	6,213	A	B	C
Con-C ufc/ml*J11	6,233	A	B	C
Con-C ufc/ml*J9	6,255	A	B	C
Con-D ufc/ml*J19	6,328	A	B	C
Con-E ufc/ml*J21	9,138		B	C
Con-C ufc/ml*J7	9,208		B	C
Con-C ufc/ml*J5	9,335		B	C
Con-C ufc/ml*J3	9,413		B	C
Con-C ufc/ml*J1	9,510		B	C
Con-E ufc/ml*J19	11,928			C
Con-D ufc/ml*J17	12,000			C
Con-D ufc/ml*J15	12,370			C
Con-D ufc/ml*J13	12,393			C
Con-D ufc/ml*J11	12,480			C
Con-E ufc/ml*J17	12,550			C
Con-D ufc/ml*J9	12,590			C
Con-D ufc/ml*J7	12,620			C
Con-E ufc/ml*J15	12,640			C
Con-E ufc/ml*J13	12,675			C
Con-D ufc/ml*J5	12,698			C
Con-E ufc/ml*J11	12,720			C
Con-E ufc/ml*J9	12,755			C
Con-D ufc/ml*J3	12,770			C
Con-D ufc/ml*J1	12,798			C
Con-E ufc/ml*J7	12,818			C
Con-E ufc/ml*J5	12,930			C
Con-E ufc/ml*J1	13,053			C
Con-E ufc/ml*J3	13,068			C

Newman-Keuls (SNK) / Analyse des différences entre les Concentrations*Jours avec un intervalle de confiance à 95% :

Con = Concentration

Nous avons trois groupes :

- **Groupe A**: Pas de différence significative du nombre de colonies entre A *J7, A *J19, A *J21, A *J17, A *J13, A *J15, A *J11, A *J9, B *J21, B *J19, B *J17.
- **Groupe B**: Différence du nombre de colonies non significative entre A *J3, A*, B *J15, B *J13, A *J1, C *J19, B *J11, C *J21, B *J9, B *J7, B *J5, B *J3, B *J1.
- **Groupe C**: Pas de différence significative du nombre de colonies entre C J17, C *J15, C *J13, D *J21, C *J11, C *J9, D *J19, E *J21, C *J, C *J5, C *J3, CJ1, E *J19,

Résultats et Discussion

D*J17, D *J15, D *J13, D *J11, E *J17, D *J9, D *J7, E *J15, E *J13, D *J5, E *J11, E *J9, D *J3, D *J1, E *J7, E *J5, E *J1, E *J3.

Conclusion partielle:

▪ *Haemophilus influenzae*

Un regard global de notre étude révèle que le taux de survie sur MGY est supérieur au taux de survie sur BCC. Qu'il s'agisse du BCC ou du MGY et quelle que soit la température de conservation, ce taux diminue de façon continue lorsque le temps de conservation augmente. Il l'est de même lorsque la concentration est faible.

Par ailleurs, des études détaillées grâce à ANOVA SNK ont montré des différences non significatives à certains niveaux.

H.influenzae peut être conservé sur BCC à forte concentration pendant 25 jours et sur MGY pendant 27 jours à -20°C. De même il peut être conservé sur MGY pendant au moins un mois et sur BCC pendant 25 jours à – 70°C.

▪ *Streptococcus pneumoniae*

Nous avons pratiquement les mêmes observations décrites sur *H.influenzae*.

S.pneumoniae peut être conservé sur BCC pendant 29 jours et sur MGY pendant au moins un mois à – 20°C. De même il peut être conservé sur BCC et MGY pendant au moins un mois à – 70°C.

Il ressort de l'ensemble de ces observations que le MGY est le milieu de choix pour la conservation de ces deux souches.

II / Discussion

Isolement :

Nous avons utilisé trois milieux de culture pour l'isolement des souches lors des études préliminaires: milieu de Wilkins- Chalgren, milieu Trypticase-soja, milieu Columbia.

Le choix de ces milieux s'explique par leur adéquation.

Mais nous avons par la suite travaillé sur la gélose Columbia parce qu'elle donnait non seulement l'aspect typique des colonies mais aussi elle procurait des zones d'hémolyse particulièrement nettes.

La gélose Trypticase-soja ne permet pas la recherche de type d'hémolyse et les bactéries peuvent y dépérir. (26)

La gélose Wilkins-Chalgren contenant 5 % de sang de cheval permet de limiter l'autostérilisation des cultures constatées lorsqu'elles sont incubées en atmosphère normale du fait de la présence du pyruvate de sodium.

Les souches ont poussé sur les trois milieux d'isolement.

Identification :

L'identification a porté sur les caractères morphologiques et biochimiques.

Pour *S.pneumoniae*, la sensibilité à l'optochine permet de le différencier des autres Streptocoques tels que les *Streptocoques alpha viridans* qui résistent à celui-ci.

La lyse par la bile permet de s'assurer que *S.pneumoniae* ne résiste pas à l'optochine comme il a été décrit par certains auteurs. (38)

Pour *H.influenzae*, d'après les caractères biochimiques donnés par la galerie API NH (ODC +, URE +, IND +), on peut supposer que celui-ci est de biotype I.

Les caractères morphologiques et biochimiques des deux souches n'ont pas du tout varié après leur conservation comme l'ont montré d'ailleurs certains auteurs comme **AULET DE SAAD O. C et al** (2001), **SIBERRY G. et al** (2001).

Par contre, des études antérieures ont montré une légère variation des caractères biochimiques (réaction du glycérol positive avant la conservation et négative après) de *S. pneumoniae* conservé sur BCC + glycérol à 10 %, **DIOUF M.F** (2004). Ces

Résultats et Discussion

variations semblent être dues à des mutations ponctuelles au niveau du gène codant pour la synthèse des enzymes qui dégradent ces substrats. Ainsi, les enzymes vont perdre leur capacité à métaboliser les substrats correspondants.

Conservation :

La viabilité des souches comme nous venons de le montrer dépend de plusieurs facteurs :

- Milieux de conservation :

Les résultats obtenus montrent que le MGY donne le meilleur taux de viabilité par opposition au BCC.

Ces milieux sont supplémentés par des agents cryoprotecteurs tels que le sucre, le glycerol et le lait.

L'usage des agents cryoprotecteurs remonte en 1941 quand **Woodcock et al (1941)** utilisaient du sucre pour protéger les érythrocytes des dommages du gel.

Pour expliquer le taux de viabilité élevé sur MGY par opposition au BCC, on peut supposer que la présence de trois agents cryoprotecteurs (lait, glucose, glycerol) serait le principal facteur explicatif. Notons cependant que le lait a une action double : celui de milieu de base et d'agent cryoprotecteur. Alors que sur BCC nous n'avons que deux éléments cryoprotecteurs (glycerol, lactose). Et il a été constaté d'ailleurs que plus le nombre d'agents cryoprotecteurs est important dans un milieu de conservation donné, plus leur efficacité est avérée.

Par ailleurs, **Avril D. et al (1998)** ont montré que le « Dorset Egg medium » (milieu à l'œuf de Dorset) maintenait *S.pneumoniae* en vie pendant 44 jours à température de la pièce.

- La température de conservation

Le taux de viabilité à – 70°C est supérieur au taux de viabilité à -20°C qu'il s'agisse d'*H.influenzae* ou de *S.pneumoniae*. Ceci traduit donc l'importance de basse température sur la conservation des souches.

En effet, **Tarja Kaijalainen et al (2004)** ont montré que le nombre de colonies de *S.pneumoniae* était constant à – 80°C pendant 3 ans sur STGG (Skim milk, Tryptone, glucose, glycerol). Alors qu'à -20°C, la baisse de colonies survint après 9 mois.

Résultats et Discussion

Ils ont par ailleurs montré que le nombre de colonies *d'H. influenzae* sur le même milieu diminuait après 15 mois à -80°C et est nul après 4 mois à -20°C.

De même **Diop M.** (2006) a montré que ces deux souches survivaient à -20 et à -70°C pendant un mois sur bouillon MH.

L'influence de la température peut être fonction de l'espèce.

En effet, **Rousée et al** (2000) ont montré que la température de conservation a une faible influence sur la survie de *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 430089 et *Eikenella corrodens* ATCC 23834 pendant 48 heures.

- La concentration de l'inoculum

Comme nous avons eu à le montrer, la concentration de l'inoculum influe sur la viabilité des souches. Plus on a une forte concentration, plus le nombre de colonies est important.

En effet, **Olga C Aulet de Saab et al** (2001) ont aussi trouvé des effets similaires aux nôtres.

Nous n'avons pas réussi à maintenir en vie *S.pneumoniae* à -20°C sur BCC pendant un mois comme on ne l'a pas pu faire sur *H.influenzae* à -70°C et à -20°C sur BCC et aussi à -20°C sur MGY.

Certains facteurs que nous n'avons pas pris en compte ont une influence sur la viabilité des souches :

- La qualité du milieu de transport

Rousée et al (2000) ont montré que Venturi Transystem et Transwab donnait le meilleur taux de recouvrement à +4°C.

Beaucoup d'auteurs ont montré que le milieu de transport des souches influe de façon nette sur la survie de celles-ci. (**Gandhi, Campos et al 2000, Biggs 2005, Drake et al 2005, Farrington et al 2002.**)

- Le temps de dégel

Il ne doit pas dépasser trois heures. (**Olga C Aulet de Saab et al.** 2001)

Ces derniers ont montré chez *H.influenzae* que plus le temps de dégel est court, plus le taux de recouvrement est important.

Résultats et Discussion

De la même occasion, ils ont montré que le taux de recouvrement est nul à -20°C après 24 H. alors que pour le même temps de dégel, le taux de recouvrement se situait aux environs de 15 % à -70°C .

Le temps de dégel s'il n'excède pas 3 heures a une faible influence si la température de conservation est très basse.

- **Wagman J** (1960) a montré que l'agitation des tubes de conservation, la formation de mousses et les changements de température soudaine endommagent les bactéries lors du dégel.
- La méthode d'évaluation elle-même

Le dénombrement des colonies bactériennes sur boîte de pétri semble être une méthode facile. Ce qui explique d'ailleurs le choix de celui-ci parmi tant d'autres. C'est une méthode précise.

Mais elle renferme certains inconvénients :

- Le premier inconvénient c'est la lenteur de celle-ci ;
- L'autre inconvénient de cette méthode est qu'il n'existe toujours pas un milieu différentiel permettant de distinguer deux espèces proches et que ces milieux sont généralement coûteux ;(8)
- les amas cellulaires non dissociés constituent un autre méfait de cette méthode ;
- On constate souvent l'absence de pousses après avoir effectué une culture bactérienne.

Ce qui ne signifie pas toujours que le germe n'est pas viable. La souche peut être présente dans le milieu de culture mais elle n'est pas cultivable du fait qu'elle ne se présente pas sous forme de colonies ; d'où la notion de BVNC ou VNC (bactéries viables non cultivables. **KEER&BIRCH**, 2003.)

Il existe plusieurs méthodes actuellement permettant d'étudier le VNC : méthode de potentiel de membrane (Rhodamine 123 et DiBAC4), méthode d'intégrité membranaire (SYTO 9/propidium iodide) etc.

Conclusion

L'objectif général était de mesurer la viabilité des souches conservées et de noter le(s) changement(s) de caractère(s) morphologiques et biochimiques.

Notre étude nous a révélé que *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* étaient bel et bien viables après conservation et aucun changement de caractère morphologique et/ou biochimique n'a été noté.

Ces deux souches peuvent donc être conservées.

La température, les milieux de conservation et la concentration de l'inoculum ont une influence nette sur la viabilité des souches conservées. Et la mise au point d'une méthode efficace de conservation pour ces souches serait d'une importance capitale aussi bien pour le microbiologiste (identification des souches, sensibilité aux antibiotiques) que pour le clinicien car, la connaissance des caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques et antigéniques des bactéries exigeantes est indispensable dans les applications pratiques au diagnostics, aux traitements et à la prévention des maladies infectieuses dont elles sont responsables.

Nous avons aussi montré que le taux de viabilité sur MGY était meilleur que le taux de viabilité sur BCC.

Ainsi *H.influenzae* peut être conservé à -70°C sur MGY pendant au moins un mois et sur BCC durant 25 jours pour une concentration de 10^{15} .

Alors qu'à -20°C , il restait viable pendant 27 jours sur MGY et 25 jours sur BCC.

Pour *S. pneumoniae*, il restait viable à -70°C sur MGY et sur BCC pendant un mois au moins.

A -20°C , il peut être conservé pendant un mois sur MGY et durant 29 jours sur BCC.

Le MGY semble être le milieu de choix de conservation de ces souches et qu'une température à -70°C serait souhaitable à long terme pour l'obtention d'un taux de recouvrement satisfaisant.

Par contre, on peut se servir d'une température à -20°C sur BCC pour les conservations de courte durée.

Conclusion et Perspectives

La concentration de l'inoculum est très importante sur la survie des souches.

En effet, plus celle-ci est forte, plus le taux de recouvrement est important. Et c'est grâce à une concentration de 10^{15} que l'on est parvenu à avoir une survie des souches pendant au moins un mois. Une concentration à 10^{15} serait souhaitable.

Perspectives

- Prendre en compte le temps de dégel lors de la décongélation.
- Le souhait de connaître le milieu de transport des souches pour une bonne exploitation des résultats.
- L'utilisation de plusieurs méthodes d'évaluations pour en déduire celle qui semble la meilleure et l'usage surtout d'une technique permettant la mise en évidence du VNC si cela s'avère nécessaire.
- Mener des recherches sur la prédominance des facteurs influant la viabilité des souches.

BIBLIOGRAPHIE

1. **AVRIL D. WASAS., ROBIN E. HUEBNER., MIGNON DE BLANCHE., KEITH P. KLUGMAN.** Long-term survival of *Streptococcus pneumoniae* at Room Temperature on Dorset Egg Medium, Journal of Clinical Microbiology, Johannesburg, South Africa, April 1998, 36 (4): 113-1140.
2. **AVRIL Jean-Loup., ABARNAT Henry., DENIS François., MONTEIL Henri.** Bactériologie clinique, 3^{ème} édition, 32 rue Bargue 75740 Paris Cedex 15, Ellipses édition marketing S. A, 2000, 602p.
3. **AULET DE SAAD O. C., DE CASTILLO M. C., DE RUIZ HOLGADONA. P., DE NADEROM O. M.** A comparative study of preservation and storage of *Haemophilus influenzae*, Mem. Inst. Osvaldo Cruz, 2001, 96: 583-586.
4. **KILPPER-BÄLZ R., WENZIG P. & SCHLEIFER.** Molecular relationship and classification of some viridans Streptococci as *Streptococcus oralis* and emended description of *Streptococcus oralis*, Int.J.Syst.Bacteriol., 1985, 35: 482-488.
5. **BERCHE Patrick., GAILLARD Jean-Louis., SIMONET Michel.** Bactériologie. Les bactéries des infections humaines, 1^{ère} édition, Paris, Flammarion Médecine- Sciences, 1988, 660p.
6. **BIGGS C.** Comparative Study Of The Viability Of Clinically Important Bacteria In Two New AMIES Gel Transport Systems (BD Cultures wab MAX V(+) And ReMel Bactiswab) Using NCCLS M40-A Quantitative Swab Elution Method, ASM 10th General Convention-Atlanta, Georgia, Pennsylvania, June 2005.
7. **BREAUD SOPHIE.** Etude biométrique de la réponse d'une population bactérienne à une variation défavorable de température ou de pH. Application en microbiologie prévisionnelle alimentaire, Thèse de doctorat d'état, Lyon1 : Université Claude Bernard, 1998, 103p.
8. **CAMPOS J.M., RUTHMAN L., TSHIMANGA M.** Survival of Fastidious Bacteria On Specimen Collection Swabs Stored at Room Temperature, ASM 2000 General Meeting, Los Angeles, California 105/C. Specimen Collection, Transportation, and Processing, Children's Medical Center, Washington, D.C, May 23rd, 2000.
9. **CORNU Marie.** Dynamique des populations bactériennes en milieu mixte, Thèse de doctorat d'état, 2000, 117p.

Bibliographie

10. **DELIGNETTE-MULLER Marie Laure.** Méthodes de prédiction des aptitudes de croissance des populations de micro-organismes, Thèse de doctorat d'état, Lyon I : Université CLAUDE BERNARD, 1995, 143p.
11. **DIOUF M. F.** Evaluation de différentes méthodes de conservations des souches exigeantes, Thèse de Pharmacie N°25, Dakar : UCAD, 2004, 73p.
12. **DIOP M.** Etude de la viabilité des souches de *Streptococcus pneumoniae* et *d'Haemophilus influenzae* conservées à -20° C et à -70° C, Thèse de pharmacie N° 5, Dakar : UCAD, 2006, 78p.
13. **DIOP Ramatoulaye.** Standardisation et optimisation d'une microméthode d'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires, Thèse de pharmacie N° 75, Dakar : UCAD, 2001.
14. **DRAKE Cheryl., BARENFANGER Joan., LAWHORN Jerry., VERHULST Steven.** Comparison of easy-flow Copan Liquid Stuart's and Starplex swab transport systems for recovery of fastidious aerobic bacteria, Journal of clinical microbiology, 2005, American society for Microbiology Washington, DC Etats-Unis, 43 (3): 1301-1303.
15. **EZIN Joëlle.** Etude de caractères phénotypiques des souches *d'Haemophilus influenzae* et *parainfluenzae* isolées à Dakar, Thèse de pharmacie N° 77, Dakar : UCAD, 1994, 96p.
16. **FARRINGTON M., BROWN D. F. J.** Comparison of Five Swabs Systems for the Transport of Pathogenic Bacteria: Effects of Charcoal in the Swab or Gel Medium, ASM 102st General Meeting, Salt Lake City, Utah. Addenbrooke's Hospital, Cambridge, UK, May 2002.
17. **FASQUELLE Robert.** Eléments de bactériologie médicale, 7^{ème} édition, Paris, Ed. Médicales Flammarion, 1968, 312p.
18. **FERRON Azéle.** Bactériologie médicale, 12^{ème} édition, édition C & R, 1984, 374p.
19. **GANDI B.** SURVIVAL RATE OF *Haemophilus influenzae* IN TO COMMERCIAL AMIES GEL SWAB TRANSPORT AT ROOM TEMPERATURE, General meeting of the American society for microbiology, New Orleans, MOUNT SINAI HOSPITAL.
20. **GASTINEL Pierre.** Bactériologie médicale, Paris, Masson et C^{ie}, 1949, 1040p.
21. **HELLER René.** Manuel de statistique biologique, 2^{ème} édition, Paris, Bruxelles, Montréal, Gauthier-Villas édit., 1974, 290p.
22. **JOLICÉUR Pierre.** Introduction à la biométrie, Paris, Masson, 1991, 300p.

Bibliographie

23. **LE MINOR Léon., VERON Michel.** Bactériologie médicale, Paris, Flammarion médecine-sciences, 1982, 1107p.
24. **LECLERC. H., GAILLARD.J-L., SIMONET. M.** Microbiologie générale. La bactérie et le monde bactérien, Paris, doin édit., 1995, 535p.
25. **LECLERC. H., IZARD. D., HUSSON M-O., WATTRE. P., JAKUBZAK. E.** Microbiologie générale, 2^{nde} édition, Paris, doin, 1983, 369p
26. **KEER J. T and BIRCH L.** Detection of Microbial Pathogens using Molecular Methods for assessment of Bacteriae viability, Journal of Microbiological Methods, 2003, 53: 175-183.
27. **MARCHAL n., BOURDON J.L., RICHAIR Cl.** Les milieux de culture pour l'identification et l'isolement biochimique des bactéries, Paris, doin, 1982, 482p.
28. **MOUSTARDIER Georges.** Bactériologie médicale, 4^{eme} édition, Paris, Maloine, 1972, 1389p.
29. **NDOYE I.** Croissance bactérienne, cours de microbiologie (licence), Dakar, 2003.
30. **OLGA C Aulet de Saab., MARTA C de Castillo., AIDA P de Ruiz Holgado., OLGA M de Nader.** A Comparative Study of Preservation and Storage of *Haemophilus influenzae*, Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, May 2001, 94 (4): 58-586.
31. **OMS.** Programme mondial des vaccins et vaccination: position de l'OMS sur les vaccines conjugués anti-Hib. Relevé épidémiologique hebdomadaire 1998, 10 : 64-71.
32. **PILET C., BOURDOU J. L., MARCHAL N., TOMA B., BALBASTRE C.** Bactériologie médicale et vétérinaire Systématique bactérienne, 2^{nde} édition, Paris, doin édit., 1983, 437p.
33. **PRESCOTT, Harley, Klein.** Microbiologie, 2^{nde} édition, Bruxelles, De Boeck édit., 1995, 1014p.
34. **REGNAULT Jean Pierre.** Microbiologie générale, Paris, Montréal, Décarie, Vigot édit., 1990, 859p.
35. **ROUSEE J. M., HERNANDEZ C., DEMARTINO S., MONTEIL H., PIEDMONT Y.** Comparison of Four Swabs Transport Systems Stored at Room Temperature and +4° C for Recovery of Previously Inoculated Fastidious Aerobic and Anaerobic Bacteria, ASM 101st General Meeting, Orlando, Florida. France May 2000.
36. **SIBERRY G., BRAHMADATHAN K., PANDIAN R.** Comparison of a different culture media and storage temperature for the long term preservation of *Streptococcus pneumoniae* in the tropics, Belting of the World Health Organisation, 2001

Bibliographie

- 37. SINGLETON Paul.** Bactériologie, 4^{ème} édition, Paris, Dunod édit., 1999, 451p.
- 38. SOW Mouhamadou.** Standardisation des méthodes de contrôle de qualité des antifongiques utilisées en thérapeutique. Thèse de pharmacie N° 82, Dakar : UCAD, 2002, 102p.
- 39. STGME JW., CUTTER D.** Influence of pili, fimbriae and capsule in vitro adherence by *Haemophilus influenzae* type b, *Mal.Microbiol.*, 1996, 21: 20-31
- 40. TARJA Kaijalainen., ESA Ruokokoski., PENTTI Ukkonen., ELJA Herva.** Survival of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* Frozen in Skim Milk-Tryptone-Glucose-Glycerol Medium, *Journal of Clinical Microbiology*, Jan. 2004, 42 (1): 412-414.
- 41. WAGMAN J.** Evidence of cytoplasmic membrane injury in the drying of bacteria, *J Gen Microbial*, 1960, 132: 503-512.
- 42. WOODCOCK AH., THISTLE MW., COOK WH., GIBBONS NE.** The ability of sheep's erythrocytes to survive freezing, *Canad J Res*, 1941, 19D: 206-212.

Annexes

Annexe 1: caractères biochimiques d'*Haemophilus influenzae*

Tests	PEN	GLU	FRU	MAL	SAC	ODC	URE	LIP	PAL	ProA	GGT	IND
Résultats	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+

(+) = réaction positive

(-) = réaction négative

PEN : Pénicillinase

URE : Uréase

GLU : Glucose

LIP : Lipase

FRU : Fructose

PAL : Phosphatase alcaline

MAL : Maltose

ProA : Proline arylamidase

SAC : Saccharose

IND : Indole

ODC : Ornithine décarboxylase

GGT : Gamma Glutamyl Transférase

Annexes

Annexe 2: Lecture de la galerie API NH

Tests	Substrats	Résultats	
		négatif	positif
PEN	Pénicillinase	bleu	Jaune Jaune vert Jaune bleu
GLU	Glucose (acidification)	Rouge	Jaune Orange
FRU	Fructose	Rouge orange	
MAL	Maltose		
SAC	Saccharose		
ODC	Ornithine décarboxylase	Jaune vert Gris vert	Bleu
URE	Uréase	Jaune	Rose violet
LIP	Lipase	Incolore Gris pale	Bleu (+précipité)
PAL	Phosphatase alcaline	Incolore Jaune pale	Jaune
β-GAL	Bêta- galactosidase	Incolore	Jaune
Pro A	Proline arylamidase	ZYM B pendant 3 minutes	
		Jaune	Orange
GGT	Gamma glutamyl transférase	Jaune Orange pale	Orange
IND	Indole	JAMES B pendant 3 minutes	
		Incolore	Rose

Annexes

Annexe 3.1 : Caractères biochimiques d'*H.influenzae* donnés par la galerie API NH

PEN	GLU	FRU	MAL	SAC	ODC	URE	LIP	PAL	βGAL	ProA	GGT	IND
-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+

Annexe 3.2 : Caractères biochimiques de *S. pneumoniae*

Tests	VP	ESC	ADH	BHS	ARA	MAN	TRE	RAF	SOS	INU	LAC	RIB	AMD	GLY
Résultats	-	-	d	-	-	-	+	+	d	d	+	-	-	d

VP : réaction de Voges-Prokaüer

RAF : Raffinose

ADH : Arginine dihydrolase

SOS : Sorbose

ESC : Esculine

INU : Inuline

ARA : L-Arabinose

LAC : Lactose

BHS: Bouillon hypersalé

RIB: Ribose

MAN: Mannitol

AMD: Amidon

SOR: Sorbitol

GLY: Glycerol

TRE : Tréhalose

(-) : caractère négatif

(d) : caractère variable

(+) : caractère positif

Les autres caractères sont :

- Nitrate : -

- Gélatine : -

- Lait tournesolé : acidifié et coagulé

- esculine : -

Annexes

Annexe 4 : Lecture de la galerie CSB / Streptocoques

Tests	Substrats	Réactions/ Enzymes	Réactifs à ajouter	Résultats positifs	Résultats négatifs
VP	Glucose+pyruvate	Production D'acétoïne	1 goutte de KOH 1 goutte de créatinine 1 goutte de a- naphtol	Rose- Rouge	Incolore
ESC	Esculine	Béta-glucosidase		Noir	Incolore
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase		Rouge	Jaune
BHS	Glucose	Croissance en milieu hypersalé		Jaune	Violet
ARA MAN SOR TRE RAF SOS INU LAC RIB AMD GLY	L-Arabinose Mannitol Sorbitol Tréhalose Raffinose Sorbitose Inuline Lactose Ribose Amidon Glucérol	Fermentation		Jaune	Rouge

Annexes

Annexe 5 : Caractères biochimiques de *S. pneumoniae* d'après la galerie

Micro CSB / **Streptocoques**

Tests	VP	ESC	ADH	BHS	ARA	MAN	SOR	TRE	RAF	SOS	INU	LAC	RIB	AMD	GLY
Résultats	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+

(+) = réaction positive

(-) = réaction négative

Annexes

Annexe 6.1 : Résultats de la préconservation d' *Haemophilus influenzae* ATCC 49247

Sur BCC et MGY

N.CO = nombre de colonies

UFC/ml = Unité Formant Colonies par ml

	MGY					BCC				
	10^{15}	$1,2 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^2$	10^{15}	$1,2 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^2$
N.CO	$>10^6$	650	150	5	0	$>10^6$	400	120	6	0
UFC/ml	$>5 \cdot 10^{16}$	$3,25 \cdot 10^{13}$	$7,5 \cdot 10^{12}$	$2,5 \cdot 10^{11}$	0	$>5 \cdot 10^{16}$	$2 \cdot 10^{13}$	$6 \cdot 10^{12}$	$3 \cdot 10^{11}$	0
Log UFC/ml	16,69	13,03	12,77	11,47	0	16,69	13,51	12,87	11,39	0

Annexe 6.2 : Résultats de la préconservation sur MGY et sur BCC de *S.pneumoniae*

	MGY					BCC				
	10^{15}	$1,2 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^2$	10^{15}	$1,2 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^2$
N.CO	$>10^6$	600	350	150	30	10^4	300	150	6	0
UCF/ml	$>5 \cdot 10^{16}$	$3 \cdot 10^{13}$	$1,75 \cdot 10^{13}$	$7,5 \cdot 10^{12}$	$1,2 \cdot 10^{12}$	$5 \cdot 10^{14}$	$1,5 \cdot 10^{13}$	$7,5 \cdot 10^{12}$	$3 \cdot 10^{11}$	0
Log UFC/ml	16,69	13,47	13,24	12,87	12,07	14,69	13,17	12,87	11,47	0

Annexe 7.1.1 : Résultats de la conservation d'*H.influenzae* sur MGY et sur BCC à -20°C

N.CO : Nombre de colonies

J : jour

UFC/ml = Unité Formant Colonies/ml

<i>Haemophilus influenzae</i>		MGY à - 20°C					BCC à - 20°C				
		10 ¹⁵	1,2. 10 ⁸	1,2. 10 ⁶	1,2. 10 ⁴	1,2. 10 ²	10 ¹⁵	1,2. 10 ⁸	1,2. 10 ⁶	1,2. 10 ⁴	1,2. 10 ²
J1	N.CO	600	180	50	1	0	600	106	51	0	0
	UFC/ml	3. 10 ¹³	9. 10 ¹²	2,5. 10 ¹²	10 ¹⁰	0	3. 10 ¹³	5,3. 10 ¹²	2,55. 10 ¹²	0	0
	Logufc/ml	13,47	12,95	12,39	10	0	13,47	12,72	12,4	0	0
J3	N.CO	500	150	34	0	0	315	96	25	0	0
	UFC/ml	2,5. 10 ¹³	7,5. 10 ¹²	1,7. 10 ¹²	0	0	1,57. 10 ¹³	4,8. 10 ¹²	1,25. 10 ¹²	0	0
	Logufc/ml	12,39	12,87	12,23	0	0	13,19	12,68	12,09	0	0
J5	N.CO	400	100	19	0	0	109	56	4	0	0
	UFC/ml	2. 10 ¹³	5. 10 ¹²	9,5. 10 ¹¹	0	0	5,45. 10 ¹²	2,8. 10 ¹²	2. 10 ¹¹	0	0
	Logufc/ml	13,3	12,69	11,97	0	0	12,73	12,44	11,3	0	0
J7	N.CO	350	85	7	0	0	79	38	0	0	0
	UFC/ml	1,75. 10 ¹³	4,25. 10 ¹²	3,5. 10 ¹¹	0	0	3,95. 10 ¹²	1,9. 10 ¹²	0	0	0
	Logufc/ml	13,24	12,62	11,54	0	0	12,59	12,27	0	0	0
J9	N.CO	340	80	5	0	0	44	11	0	0	0
	UFC/ml	1,7. 10 ¹³	4. 10 ¹²	2,5. 10 ¹¹	0	0	2,2. 10 ¹²	5,5. 10 ¹¹	0	0	0
	Logufc/ml	13,23	12,6	11,39	0	0	12,34	11,74	0	0	0
J11	N.CO	325	70	2	0	0	22	3	0	0	0
	UFC/ml	1,62. 10 ¹³	3,5. 10 ¹²	10 ¹¹	0	0	1,1. 10 ¹²	1,5. 10 ¹¹	0	0	0
	Logufc/ml	13,21	12,54	11	0	0	12,04	11,17	0	0	0
J13	N.CO	204	20	2	0	0	9	0	0	0	0
	UFC/ml	1,02. 10 ¹³	10 ¹²	10 ¹¹	0	0	4,5. 10 ¹¹	0	0	0	0
	Logufc/ml	13	12	11	0	0	11,65	0	0	0	0
J15	N.CO	100	0	0	0	0	7	0	0	0	0
	UFC/ml	5. 10 ¹²	0	0	0	0	3,5. 10 ¹¹	0	0	0	0
	Logufc/ml	12,69	0	0	0	0	11,54	0	0	0	0
J17	N.CO	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	UFC/ml	2,5. 10 ¹²	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Logufc/ml	12,39	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Annexes

J19	N.CO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	UFC/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Logufc/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J21	N.CO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	UFC/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Logufc/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Annexe 7.1.2 : Résultats de la conservation d'*H.influenzae* sur MGY et sur BCC à -70°C

<i>Haemophilus influenzae</i>		MGY à - 70°C					BCC à - 70°C				
		10 ¹⁵	1,2. 10 ⁸	1,2. 10 ⁶	1,2. 10 ⁴	1,2. 10 ²	10 ¹⁵	1,2. 10 ⁸	1,2. 10 ⁶	1,2. 10 ⁴	1,2. 10 ²
J1	N.CO	450	406	74	2	0	450	120	60	0	0
	UFC/ml	2,25. 10 ¹³	2,03. 10 ¹³	3,7. 10 ¹²	10 ¹¹	0	2,25. 10 ¹³	6. 10 ¹²	3. 10 ¹²	0	0
	Logufc/ml	13,54	13,3	12,56	11	0	13,54	12,77	12,47	0	0
J3	N.CO	400	300	64	0	0	240	70	38	0	0
	UFC/ml	2. 10 ¹³	1,5. 10 ¹³	3,2. 10 ¹²	0	0	1,2. 10 ¹³	3,5. 10 ¹²	1,9. 10 ¹²	0	0
	Logufc/ml	13,3	13,17	12,5	0	0	13,07	12,54	12,27	0	0
J5	N.CO	363	210	56	0	0	171	70	14	0	0
	UFC/ml	1,81. 10 ¹³	1,05. 10 ¹³	2,8. 10 ¹²	0	0	8,55. 10 ¹²	3,5. 10 ¹²	7. 10 ¹¹	0	0
	Logufc/ml	13,25	13,02	12,44	0	0	12,93	12,54	11,84	0	0
J7	N.CO	320	200	40	0	0	58	36	0	0	0
	UFC/ml	1,6. 10 ¹³	10 ¹³	2. 10 ¹²	0	0	2,9. 10 ¹²	1,8. 10 ¹²	0	0	0
	Logufc/ml	13,2	13	12,3	0	0	12,46	12,25	0	0	0
J9	N.CO	293	194	31	0	0	47	21	0	0	0
	UFC/ml	1,46. 10 ¹³	9,7. 10 ¹²	1,55. 10 ¹²	0	0	2,35. 10 ¹²	1,05. 10 ¹²	0	0	0
	Logufc/ml	13,16	12,98	12,19	0	0	12,37	12,02	0	0	0
J11	N.CO	257	166	23	0	0	39	13	0	0	0
	UFC/ml	1,28. 10 ¹³	8,3. 10 ¹²	1,15. 10 ¹²	0	0	1,95. 10 ¹²	6,5. 10 ¹¹	0	0	0
	Logufc/ml	13,1	12,92	12,06	0	0	12,29	11,81	0	0	0
J13	N.CO	223	159	17	0	0	21	6	0	0	0
	UFC/ml	1,11. 10 ¹³	7,95. 10 ¹²	8,5. 10 ¹¹	0	0	1,05. 10 ¹²	3. 10 ¹¹	0	0	0
	Logufc/ml	13,04	12,9	11,93	0	0	12,02	11,47	0	0	0
J15	N.CO	225	160	0	0	0	20	4	0	0	0
	UFC/ml	1,12. 10 ¹³	8. 10 ¹²	0	0	0	10 ¹²	2. 10 ¹¹	0	0	0
	Logufc/ml	13,05	12,9	0	0	0	12	11,3	0	0	0
J17	N.CO	200	150	1	0	0	0	0	0	0	0
	UFC/ml	10 ¹³	7,5.	5.	0	0	0	0	0	0	0

Annexes

			10^{12}	10^{10}							
	Logufl/ml	13	12,87	10,69	0	0	0	0	0	0	0
J19	N.CO	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	UFC/ml	10^{13}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Logufl/ml	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J21	N.CO	190	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	UFC/ml	$9,5 \cdot 10^{12}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Logufl/ml	12,97	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Annexe 7.2.1 : Résultats de la conservation de *S. pneumoniae* sur MGY et sur BCC à - 20°C

<i>Streptococcus pneumoniae</i>		MGY à - 20°C					BCC à - 20°C				
		10^{15}	$1,2 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^2$	10^{15}	$1,2 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^2$
J1	N.CO	250	150	30	0	0	40	14	0	0	0
	UFC/ml	$1,25 \cdot 10^{13}$	$7,5 \cdot 10^{12}$	$1,5 \cdot 10^{12}$	0	0	$2 \cdot 10^{12}$	$7 \cdot 10^{11}$	0	0	0
	Logufl/ml	13,09	12,87	12,17	0	0	12,3	11,84	0	0	0
J3	N.CO	255	146	28	0	0	40	13	0	0	0
	UFC/ml	$1,27 \cdot 10^{13}$	$7,3 \cdot 10^{12}$	$1,4 \cdot 10^{12}$	0	0	$2 \cdot 10^{12}$	$6,5 \cdot 10^{11}$	0	0	0
	Logufl/ml	13,1	12,86	12,14	0	0	12,3	11,81	0	0	0
J5	N.CO	200	131	26	0	0	36	13	0	0	0
	UFC/ml	10^{13}	$6,55 \cdot 10^{12}$	$1,3 \cdot 10^{12}$	0	0	$1,8 \cdot 10^{12}$	$6,5 \cdot 10^{11}$	0	0	0
	Logufl/ml	13	12,81	12,11	0	0	12,25	11,81	0	0	0
J7	N.CO	160	100	27	0	0	31	11	0	0	0
	UFC/ml	$8 \cdot 10^{12}$	$5 \cdot 10^{12}$	$1,35 \cdot 10^{12}$	0	0	$1,55 \cdot 10^{12}$	$5,5 \cdot 10^{11}$	0	0	0
	Logufl/ml	12,9	12,65	12,13	0	0	12,19	11,74	0	0	0
J9	N.CO	100	90	24	0	0	32	12	0	0	0
	UFC/ml	$5 \cdot 10^{12}$	$4,5 \cdot 5 \cdot 10^{12}$	$1,2 \cdot 5 \cdot 10^{12}$	0	0	$1,6 \cdot 10^{12}$	$6 \cdot 10^{11}$	0	0	0
	Logufl/ml	12,69	12,65	12,07	0	0	12,2	11,77	0	0	0
J11	N.CO	85	63	19	0	0	28	10	0	0	0
	UFC/ml	$4,25 \cdot 10^{12}$	$3,15 \cdot 10^{12}$	$9,5 \cdot 10^{11}$	0	0	$1,4 \cdot 10^{12}$	$5 \cdot 10^{11}$	0	0	0
	Logufl/ml	12,62	12,49	11,97	0	0	12,14	11,69	0	0	0
J13	N.CO	60	34	11	0	0	26	9	0	0	0
	UFC/ml	$3 \cdot 10^{12}$	$1,7 \cdot 10^{12}$	$5,5 \cdot 10^{11}$	0	0	$1,3 \cdot 10^{12}$	$4,5 \cdot 10^{11}$	0	0	0
	Logufl/ml	12,47	12,23	11,74	0	0	12,11	11,65	0	0	0
	N.CO	47	18	7	0	0	25	9	0	0	0

Annexes

J15	UFC/ml	2,35. 10 ¹²	9. 10 ¹¹	3,5. 10 ¹¹	0	0	1,25. 10 ¹²	4,5. 10 ¹¹	0	0	0
	Logufc/ml	12,37	11,95	11,54	0	0	12,09	11,65	0	0	0
J17	N.CO	30	8	4	0	0	25	8	0	0	0
	UFC/ml	1,5. 10 ¹²	4. 10 ¹¹	2. 10 ¹¹	0	0	1,25. 10 ¹²	4,410 ¹¹	0	0	0
J19	Logufc/ml	12,17	11,6	11,3	0	0	12,09	11,6	0	0	0
	N.CO	5	0	0	0	0	1	0	0	0	0
J21	UFC/ml	2,5. 10 ¹¹	0	0	0	0	5. 10 ¹⁰	0	0	0	0
	Logufc/ml	11,39	0	0	0	0	10,69	0	0	0	0
J21	N.CO	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	UFC/ml	1,5. 10 ¹¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J21	Logufc/ml	11,17	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Annexe 7.2.2 : Résultats de la conservation de *S .pneumoniae* sur MGY et sur BCC à -70°C

<i>Streptococcus pneumoniae</i>		MGY à -70°C					BCC à – 70°C				
		10 ¹⁵	1,2. 10 ⁸	1,2. 10 ⁶	1,2. 10 ⁴	1,2. 10 ²	10 ¹⁵	1,2. 10 ⁸	1,2. 10 ⁶	1,2. 10 ⁴	1,2. 10 ²
J1	N.CO	600	590	300	145	20	450	213	101	0	0
	UFC/ml	3. 10 ¹³	2,95. 10 ¹³	1,5. 10 ¹³	7,25. 10 ¹²	10 ¹²	2,25. 10 ¹³	1,06. 10 ¹³	5,05. 10 ¹²	0	0
	Logufc/ml	13,47	13,46	13,17	12,86	12	13,35	13,02	12,7	0	0
J3	N.CO	600	590	220	100	11	260	179	60	0	0
	UFC/ml	3. 10 ¹³	2,95. 10 ¹³	1,1. 10 ¹³	5. 10 ¹²	5,5. 10 ¹¹	1,3. 10 ¹³	8,95. 10 ¹²	3. 10 ¹²	0	0
	Logufc/ml	13,47	13,46	13,04	12,69	11,77	13,4	12,95	12,47	0	0
J5	N.CO	590	570	200	67	3	207	105	34	0	0
	UFC/ml	2,95. 10 ¹³	2,85. 10 ¹³	10 ¹³	3,35. 10 ¹²	1,5. 10 ¹¹	1,03. 10 ¹³	5,25. 10 ¹²	1,7. 10 ¹²	0	0
	Logufc/ml	13,46	13,45	13	12,52	11,17	13,01	12,72	12,23	0	0
J7	N.CO	570	550	185	60	0	109	93	11	0	0
	UFC/ml	2,85. 10 ¹³	2,75. 10 ¹³	9,25. 10 ¹²	3. 10 ¹²	0	5,45. 10 ¹²	4,65. 10 ¹²	5,5. 10 ¹¹	0	0
	Logufc/ml	13,45	13,43	12,96	12,47	0	12,73	12,66	11,74	0	0
J9	N.CO	550	500	179	58	0	100	71	0	0	0
	UFC/ml	2,75. 10 ¹³	2,5. 10 ¹³	8,95. 10 ¹²	2,9. 10 ¹²	0	5. 10 ¹²	3,55. 10 ¹²	0	0	0
	Logufc/ml	13,44	13,39	12,95	12,46	0	12,69	12,55	0	0	0
J11	N.CO	550	450	182	46	0	97	49	0	0	0
	UFC/ml	2,75.	2,25.	9,1.	2,3.	0	4,85.	2,45.	0	0	0

Annexes

		10^{13}	10^{13}	10^{12}	10^{12}		10^{12}	10^{12}			
	Logufc/ml	13,44	13,35	12,96	12,36	0	12,68	12,39	0	0	0
J13	N.CO	550	402	180	20	0	97	50	0	0	0
	UFC/ml	$2,75 \cdot 10^{13}$	$2,01 \cdot 10^{13}$	$9 \cdot 10^{12}$	10^{12}	0	$4,85 \cdot 10^{12}$	$2,5 \cdot 10^{12}$	0	0	0
	Logufc/ml	13,44	13,3	12,95	12	0	12,68	12,39	0	0	0
	N.CO	544	350	120	20	0	95	44	0	0	0
J15	UFC/ml	$2,73 \cdot 10^{13}$	$1,75 \cdot 10^{13}$	$6 \cdot 10^{12}$	10^{12}	0	$4,75 \cdot 10^{12}$	$2,2 \cdot 10^{12}$	0	0	0
	Logufc/ml	13,43	13,24	12,77	12	0	12,67	12,34	0	0	0
	N.CO	540	300	120	4	0	70	30	0	0	0
J17	UFC/ml	$2,7 \cdot 10^{13}$	$1,5 \cdot 10^{13}$	$6 \cdot 10^{12}$	$2 \cdot 10^{11}$	0	$3,5 \cdot 10^{12}$	$1,5 \cdot 10^{12}$	0	0	0
	Logufc/ml	13,4	13,17	12,77	11,3	0	12,54	12,17	0	0	0
	N.CO	350	300	24	0	0	50	28	0	0	0
J19	UFC/ml	$1,75 \cdot 10^{13}$	$1,5 \cdot 10^{13}$	$1,2 \cdot 10^{12}$	0	0	$2,5 \cdot 10^{12}$	$1,4 \cdot 10^{12}$	0	0	0
	Logufc/ml	13,24	13,17	12,07	0	0	12,39	12,14	0	0	0
	N.CO	280	295	53	0	0	35	10	0	0	0
J21	UFC/ml	$1,4 \cdot 10^{13}$	$1,47 \cdot 10^{13}$	$2,69 \cdot 10^{12}$	0	0	$1,75 \cdot 10^{12}$	$5 \cdot 10^{11}$	0	0	0
	Logufc/ml	13,14	13,16	12,42	0	0	12,24	11,69	0	0	0
	N.CO	280	295	53	0	0	35	10	0	0	0

Annexe 8 : Néphélomètre Standard de McFarland

MCFARLAND STANDARDS NO.	0.5	1	2	3	4
1.0% Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	04
1. O % SULFURIC ACID (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6.
APPROX. CELL DENSITY (1×10^8 ml)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
% TRANSMITTANCE*	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
ABSORBANCE*	0.132	0.257	0.451	0.582	0.669