



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB BLIDA -01-

FACULTE DE MEDECINE

Département de pharmacie

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du

Diplôme de Docteur en Pharmacie

Prélèvement bactériologique en ORL

Présenté par :

BENZERGA Wissam

BENZINEB Amina

BOUHADJELA Manal

Encadré(e)s par : Dr OUCHENE Abdelghafour

Service d'accueil : CHU FRANTZ FANON - Service ORL BLIDA

Membres du jury :

Présidente : Pr OUKID

Examinatrice : Dr OUCIF

Année universitaire : 2020/2021

Dédicaces

En avant, à Dieu qui m'a aidée à accomplir ce travail

À mes chers parents

À ma chère tante

Je vous remercie pour votre soutien, amour et pour toute l'aide que vous m'avez fournie pendant ces années d'études.

Je n'aurais rien accompli de tout ça si vous n'aviez pas été là pour moi.

À mes chères et aimables cousines "CHAHRA" et "ASMA"

À mes deux frères

À ma meilleure amie "ROMAÏSSA"

À tous mes cousins et cousines et à toute la famille

À toute personne qui, pendant le long parcours de mes études, m'a aidé de près ou de loin pour arriver à ce moment où j'obtiens mon diplôme.

Pardonnez-moi pour ceux que je n'ai pas cités, mais durant mon parcours universitaire j'ai eu la chance de rencontrer tellement de personnes aussi fabuleuses que fantastiques, que la liste aurait été longue.

Wissam... 

Dédicaces

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut. Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, Le respect, la reconnaissance...

*Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour :
Dieu le Tout Puissant et Miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience
d'accomplir ce travail*

*A mon support dans la vie, qui m'a appris, m'a supporté et m'a dirigé vers la gloire ...
mon père*

*A celle qui m'a arrosé de tendresse et d'espoirs, à la source d'amour incessible, à la mère
des sentiments fragiles qui m'a bénie par ses prières ... ma mère*

*A mes chers frères et sœurs et tous les membres de ma famille, mes amies : Souhila ,Sara,
Chaima...
et à ceux qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de
ce travail .*

Manel...



Dédicaces

A ma chère mère Fatiha

A celle qui est source de mon inspiration et de mon existence. A celle qui restera toujours mon idéal le plus élevé, et la grande bénédiction que Dieu m'a offerte. A celle qui m'a arrosé de tendresse et d'espoir, à la source d'amour incessible. Que personne ne peut compenser les sacrifices qu'elle a consentis pour mon éducation et pour mon bien-être.

A mon cher père Mohamed

A la source de ma force, au grand cœur qui m'a appris le sens de la vie. A celui qui m'a appris que les choses dans la vie n'arrivent pas facilement. Mon père, ce bel homme qui a toujours été et restera toujours mon exemple et mon idéal. Mon super héros qui a sacrifié tous ce qu'il pouvait pour me voir heureuse, je te remercie pour les valeurs nobles et pour ton éducation.

A mon frère Abdélhak

A mon support dans ma vie. A celui qui a partagé avec moi la plupart du mon bonheur. A celui qui s'efforce de me plaire, pour son soutien moral et ses conseils précieux tout au long de ce travail. Je suis fière de t'avoir comme frère.

A mon frère ABDELWAHAB et ma sœur SAFIA

A ceux qui ont hérité de moi la signification de relever les défis. A qui je souhaite un avenir radieux, plein de réussite. Vous êtes des frères en or, j'ai la chance de vous avoir.

A mon grand-père MAHI pour qui je souhaite bonne santé.

A ma défunte grand-mère MEDJADJI

Qui m'a toujours incité depuis mon jeune âge à aller loin dans mes études. Toute ma gratitude.

A mes défunts grands-parents BENZINEB

Qui ont quitté ce monde bien trop tôt. Je suis sûre que si vous étiez encore en vie, vous auriez dû être fiers de moi, mais vous avez quand même le mérite de m'avoir permis de vivre ce jour.

A ma tante Rachida

A cette grandiose femme, mon idéal, qui m'a soutenu et encouragé à l'excellence et m'a aidé à choisir ce que je suis aujourd'hui.

A mon oncle Mohamed MAHI

A ce généreux homme, qui m'a poussé vers la gloire, de par son soutien moral, son affection et ses qualités humaines qu'il incarne.

A mes adorables oncles et tantes et toute la famille MAHI et BENZINEB ; je vous dois ma vie, ma réussite et tout mon respect.

A mon éducateur Ali CHAOUATI

A cet humble homme que je considère comme mon deuxième père, avec qui j'ai appris les valeurs humaines, la droiture et la bonne conduite dans la vie.

A mes chères amies de « Djil Takaful »

A toutes celles qui ont partagé avec moi la vie, et avec qui j'ai accompli de bonnes œuvres et des moments agréables. Toute ma gratitude.

Amina ... 

Remerciements

Nous remercions :

- ❖ *Notre encadreur « Dr OUCHENE Abdelghafour » Maitre assistant en ORL au CHU Frantz-Fanon de Blida, de nous avoir guidé tout au long de ce travail, vos encouragements nous ont poussées à donner le meilleur de nous-même.*
- ❖ *Nous remercions tous ceux qui nous ont aidé et soutenu afin de réaliser ce travail.*
- ❖ *Nous remercions le jury de sa présence pour évaluer et participer à la conclusion de notre travail.*

Table des matières

Liste des abréviations.....	i
Liste des figures.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Introduction.....	01
Objectifs.....	03
CHAPITRE I : Anatomie et Physiologie ORL	
1. Anatomie ORL.....	04
1.1. Anatomie de l'oreille.....	05
1.1.1. L'oreille externe.....	05
1.1.2 L'oreille moyenne.....	06
1.1.3. L'oreille interne.....	06
1.2. Anatomie du nez et des fosses nasales.....	06
1.2.1. Structure des fosses nasales.....	07
1.2.2. Cornets.....	07
1.3. Anatomie de la gorge.....	07
1.3.1. La partie supérieure - naso-pharynx.....	07
1.3.2. La partie moyenne - oro-pharynx.....	07
1.3.3. La partie inférieure - laryngo-pharynx.....	07
2. Physiologie ORL.....	08
2.1. Physiologie auditive.....	08
2.2. Physiologie nasale.....	08
2.3. Physiologie du pharynx.....	09
CHAPITRE II : La flore commensale des voies aériennes supérieures	
1. Au niveau oral.....	10
2. Dans la cavité nasale.....	11
3. Au niveau otologique.....	11
4. Dysbiose et pathologies ORL.....	11
CHAPITRE III : La flore pathogène des infections bactériennes ORL	
1. <i>Haemophilus influenzae</i>.....	12
1.1. Etude bactériologique.....	12
1.1.1. Prélèvements.....	12
1.1.2. Transport.....	12
1.1.3. Examen microscopique direct.....	12
1.1.4. Culture.....	13
1.1.5. Caractères biochimiques.....	14
1.1.6. Identification complète par galerie.....	14
1.2. Éléments d'orientation.....	14

1.3. Résultats de l'Antibiogramme.....	15
2. <i>Pneumocoque (S.pneumoniae)</i>	16
2.1. Etude bactériologique.....	16
2.1.1. Transport des prélèvements.....	16
2.1.2. Examen microscopique direct.....	16
2.1.3. Culture.....	17
2.1.4. Caractères biochimiques.....	17
2.2. Diagnostic bactériologique.....	18
2.3. Résultats d'Antibiogramme.....	18
3. <i>Branhamella (Moraxella) catarrhalis</i>	20
3.1. Etude bactériologique.....	20
3.1.1. Nature des prélèvements.....	20
3.1.2. Examen microscopique direct.....	20
3.1.3. Culture.....	20
3.2. Résultats de l'Antibiogramme.....	21
4. <i>Streptococque de groupe A (Pyogenes)</i>	21
4.1. Etude bactériologique.....	21
4.1.1. Examen microscopique.....	21
4.1.2. Culture.....	22
4.1.3. Caractères biochimiques.....	22
4.2. Test de diagnostic rapide TDR.....	23
4.3. Résultats de l'Antibiogramme.....	23
4.4. Conclusion.....	23
5. <i>Staphylococcus aureus</i>	24
5.1. Etude bactériologique.....	24
5.1.1. Examen microscopique direct.....	24
5.1.2. Culture.....	25
5.1.3. Caractères biochimiques.....	25
5.2. Diagnostic bactériologique.....	26
5.1. Résultats d'Antibiogramme.....	26
6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
6.1. Etude bactériologique.....	27
6.1.1. Examen microscopique direct.....	27
6.1.2. Culture.....	27
6.1.3. Caractères biochimique.....	28
6.2. Résultats d'Antibiogramme.....	29
7. <i>Anaérobies stricts</i>	29
7.1. <i>Fusobacterium necrophorum</i>	30
7.1.1. Etude bactériologique.....	31
7.1.2. Résultats d'Antibiogramme.....	32
7.2. <i>Peptostreptocoques spp</i>	32

7.2.1. Etude bactériologique.....	32
7.2.2. Résultats d'Antibiogramme.....	33
7.3. Prevotella et Porphyromonas.....	33
7.3.1. Etude bactériologique.....	33
7.3.2. Résultats d'Antibiogramme.....	34

CHAPITRE IV : Biofilms

1. Historique.....	36
2. Caractéristiques des biofilms.....	36
3. Composition de la matrice du biofilm.....	37
4. Résistance des biofilms à divers agents antimicrobiens.....	38
5. Protection vis-à-vis du système immunitaire.....	39
6. Biofilms et infection ORL.....	39
7. Otite moyenne avec épanchement.....	40
8. Modèles de laboratoire pour l'étude des biofilms.....	40
8.1. Les bactéries modèles.....	40
8.2. Les modèles de culture.....	41
8.2.1. Étude des biofilms en microplaques.....	41
8.2.2. Étude des biofilms matures.....	41
8.3. Mode de développement d'un biofilm.....	41
9. Molécules pouvant interférer avec la formation du biofilm.....	42

CHAPITRE V : Les infections bactériennes en ORL

1. Angine aiguë.....	44
2. Sinusite aiguë.....	45
3. Otite.....	45
3.1. L'otite moyenne aiguë (OMA).....	45
3.2. L'otite externe.....	46
4. La rhinopharyngite.....	46

CHAPITRE II : Prélèvement bactériologique en ORL

1. Introduction	47
2. Prélèvement de l'oreille	47
2.1. Généralité.....	47
2.1.1. Matériel.....	47
2.1.2. Renseignement des patients.....	47
2.1.3. Mode opératoire.....	48
2.1.4. Transport.....	49
2.2. Particularité.....	49
2.2.1. Otite externe.....	49
2.2.2. Otite moyenne.....	49

2.2.3. Paracentèse.....	49
3. Prélèvement nasal.....	50
3.1. Généralités.....	50
3.1.1. Modalités.....	50
3.1.2. Matériel.....	50
3.1.3. Mode opératoire.....	50
3.1.4. Transport.....	51
3.2. Particularités.....	51
3.2.1. Sinusites.....	51
3.2.2. Prélèvement nasopharyngé et endonasal au méat moyen.....	52
4. Prélèvement de gorge.....	52
4.1. Généralités.....	52
4.1.1. Matériel.....	52
4.1.2. Mode opératoire.....	52
4.1.3. Transport.....	53
4.2. Particularités.....	53
4.3. TDR (Test de diagnostic rapide).....	55
4.3.1. Introduction.....	55
4.3.2. Principes généraux de TDR.....	55
4.3.3. Les inconvénients de TDR par apport de la culture systématique.....	58
4.3.4. Défauts de la sensibilité de TDR.....	58
4.3.5. Conclusion.....	58

CHAPITRE III : Examens bactériologiques.

1. Introduction.....	60
2. Examen bactériologique des prélèvements.....	60
2.1. Schéma de la démarche.....	60
2.2. Examen microscopique.....	60
2.2.1. Analyse cytologique.....	61
2.2.2. Analyse bactériologique.....	62

CHAPITRE IV : Culture et isolement des bactéries

1. Milieux de culture.....	65
1.1. Milieux de base.....	65
1.2. Milieux d'enrichissement.....	65
1.3. Milieux d'isolement.....	66
1.3.1. Géloses de base.....	66
1.3.2. Géloses au sang frais.....	66
1.3.3. Géloses au sang cuit.....	66
1.3.4. Géloses sélectives.....	67
1.3.5. Géloses pour étude de la sensibilité aux antibiotiques.....	68

2. Identification biochimique	68
3. Tests biochimiques utilisés dans l'identification des bactéries (Galerie classique)	69
4. Principaux tests d'orientation	70
4.1. Étude du type respiratoire.....	70
4.2. Recherche de la catalase.....	71
4.3. Recherche d'un cytochrome oxydase.....	71
4.4. Étude des accepteurs minéraux, recherche d'un nitrate réductase.....	72
4.5. Étude du métabolisme glucidique.....	73
4.5.1. Étude de la voie d'attaque des glucides MEVAG (milieu de Hugh et Leifson).....	73
4.5.2. Recherche de métabolites formés à partir de l'acide pyruvique.....	74
4.6. Étude du métabolisme protéique.....	74
4.6.1. Recherche de décarboxylases.....	74
4.6.2. Recherche de désaminases.....	75
4.7. Milieu Citrate de Simmons.....	77
5. Antibiogramme	79
5.1. Introduction.....	79
5.2. Méthode de diffusion de disque.....	79
5.2.1. Principe.....	79
5.2.2. Technique.....	80
5.3. Test de concentration minimale inhibitrice.....	82
5.3.1. Principe.....	82
5.3.2. Préparation de la solution mère d'agent antimicrobien.....	82
5.3.3. Préparation de l'inoculum.....	83
5.3.4. Lectures les valeurs d'MIC.....	84
Conclusion	86
Résumé	87
Références bibliographiques	90

Liste des abréviations

AACC : Américain type Culture Collection.

ADH : Arginine Dihydrolase.

ADN : Acide DécarboxyriboNucléique.

ANC : Acide Nalixidique-Colistine.

API 20^E : Appareils et Procédés d'Identification 20 Entérobactéries.

ARN : Acide RiboNucléique.

BRACA : BRAnhamella CAtarrhalis.

BRO : BRAnhamella (mOraxella) catarrhalis.

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

CAP: Colistine-Aztréonam.

CDC: Centers for Disease Control and Prevention.

CfxA: Cefoxitine de classe A.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institut.

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice.

ENT: Ears, Nose and Throat.

GNAR: Gram Négative Anaerobic Rods.

HTM: Haemophilus Test Medium.

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien.

LDC : Lysine Décarboxylase.

LKV : Laked Kanamycin Vancomycin.

MBEC : Minimal Biofilm Eradication Concentration.

MEVAG : Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides.

MH : Mueller-Hinton.

NCVP : Neuw Copan Vi-Pak Amies Gel.

ODC : Ornithine DéCarboxylase.

ORL : Oto-Rhino-Laryngologie.

PLP : Proteines de Liaison aux Pénicilline.

PSDP : Pneumocoque à Sensibilité Diminué aux Pénicillines.

RAA : Rhumatisme Articulaire Aigue.

RM : Réaction de rouge de Méthyle.

Rapide ID 32 A : Identification Databases 32 Anaerobies.

SARM : Staphylococcus Aureus Résistant à la Méthicilline.

SGA : Streptocoque du Groupe A.

TDA : Activité Tryptophane Désaminase.

TDR : Test de Diagnostic Rapide.

TGV : TurboTrain à Grande Vitesse.

TS : Trypticase Soja.

VP : Réaction de VogesProskauer.

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie ORL.

Figure 2 : Anatomie de l'oreille.

Figure 3 : Anatomie du nez et fosses nasales.

Figure 4 : Anatomie de la gorge.

Figure 5 : Coloration de Gram de *H. influenzae*.

Figure 6 : Culture sur gélose au chocolat de *H. influenzae*.

Figure 7 : Représentation schématique de l'aspect des cultures autour des disques permettant de préciser les exigences en facteur de croissance.

Figure 8 : Aspect de satellitisme observé montrant la double exigence en facteur X + V d'*Haemophilus influenzae*.

Figure 9 : Coloration de Gram de *S. pneumoniae*

Figure 10 : Sensibilité du pneumocoque à l'optochine sur gélose au sang frais

Figure 11 : Coloration de Gram de *B. catarrhalis*

Figure 12 : Aspect en culture de *B. catarrhalis* sur gélose au sang (A) et gélose au sang cuit dite chocolat (B).

Figure 13 : Examen direct (coloration de Gram) de *S. Pyogenes*

Figure 14 : Culture de SGA sur gélose au sang frais.

Figure 15 : *Staphylococcus Aureus* coloré au Gram Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

Figure 16 : Culture de *Staphylococcus aureus* Fermentation du mannitol 24h à 37°C.

Figure 17 : Aspect microscopique du *Pseudomonas Aeruginosa* Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

Figure 18 : Exemple de *pseudomonas aeruginosa* (pyocyanine sur King A et pyoverdine sur King B).

Figure 19 : Coloration de gram de *F. Necrophorum*.

Figure 20 : Culture de *F. Necrophorum* sous espèce funduliforme sur gélose au sang frais.

Figure 21 : Coloration de gram de peptostreptocoque .

Figure 22 : Colonies pigmentées de noir d'agent pathogène parodontal *Porphyromonas gingivalis* sur gélose au sang.

Figure 23 : Etapes de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérien.

Figure 24 : Matériel de prélèvement auriculaire.

Figure 25 : Prélèvement d'un écoulement auriculaire.

Figure 26 : Bistouri et écouvillon avec milieu de transport Amies.

Figure 27 : La cloison inter nasale (Dr. RAY NICHALSON) et le prélèvement nasal.

Figure 28 : Prélèvement de la gorge par écouvillonnage.

Figure 29 : Ponctions exploratrice suivie d'une incision d'un phlegmon péri-amygdalien.

Figure 30 : Test de diagnostic rapide.

Figure 31 : Signes cliniques évocateurs d'une angine.

Figure 32 : Schéma général de la démarche de l'analyse bactériologique.

Figure 33 : Milieu de Chapman.

Figure 34 : Gélose à sang cuit (Columbia).

Figure 35 : Antibiogramme sur gélose de MH.

Figure 36 : La galerie Api 20 E pour l'identification des entérobactéries Microtube contenant des substrats.

Figure 37 : Étude du type respiratoire bactérien sur gélose viande-foie.

Figure 38 : Réaction de catalase positive (par exemple *S. aureus*).

Figure 39 : À droite, réaction d'oxydase positive (par exemple *P. aeruginosa*). À gauche, réaction négative (par exemple *E. coli*).

Figure 40 : Recherche d'une nitrate réductase.

Figure 41 : Étude de la voie d'attaque des glucides (MEVAG).

A) Culture positive dans les deux tubes et acidification des tubes : métabolisme fermentatif (par exemple entérobactéries).

B) Culture positive et acidification uniquement dans la partie supérieure du tube « ouvert » : métabolisme oxydatif (par exemple *Pseudomonas aeruginosa*).

Figure 42 : Exemple de mise en évidence d'une lysine décarboxylase chez *E. coli*.

A) Test effectué sur le milieu de Taylor. B) Test effectué sur galerie API 20 E® (test LDC).

Figure 43 : GALERIE API 20E :

Coloration jaune =TDA-

Coloration brune = TDA +

Figure 44 : GALERIE API 20E : apparition d'anneau rose (indole +).

Figure 45 : coloration verte = citrate- coloration bleu= citrate +.

Figure 46 : Zones d'inhibitions des disques d'antibiotiques.

Figure 47 : Superpositions des disques d'antibiotiques.

Figure 48 : Croissance uniforme d'une zone d'inhibition.

Figure 49 : Préparation de la solution mère d'agent antimicrobien.

Figure 50 : Lecture de CIM.

Liste des tableaux

Tableau 01 : Flores commensales prédominantes des voies aériennes supérieures.

Tableau 02 : caractères d'orientation vers le diagnostic de H.Influenzae.

Tableau 03 : Les caractères biochimique de H. Influenzae.

Tableau 04 : caractères permettant une pré-identification de S. Pneumoniae.

Tableau 05 : Caractéristiques morphologique et biochimiques de P.aeruginosa.

Tableau 06 : Les germes anaérobies prédominants des voies aériennes supérieures.

Introduction

Le microbiologiste est depuis longtemps l'interlocuteur de choix à la fois pour le patient et pour le médecin traitant dans le cadre des études bactériologiques.

Ces méthodes sont définies comme étant un type d'analyse médicale permettant de rechercher et d'identifier les bactéries présumées responsables d'infections. Il y a lieu de distinguer plusieurs analyses selon le site de l'infection.

Nous consacrons notre présente étude aux prélèvements bactériologiques dans la spécialité ORL, dédiée à la prise en charge de toute infection touchant les voies respiratoires supérieures (nez, gorge et oreilles).

La réalisation proprement dite d'un examen bactériologique est précédée d'une phase **pré-analytique** qui comporte plusieurs étapes séquentielles :

- La prescription de l'analyse ;
- Le geste appelé " prélèvement " ; destiné à obtenir un échantillon biologique ;
- Le conditionnement et le transport de l'échantillon vers le laboratoire d'analyse ;
- Le contrôle de la qualité de l'échantillon à l'arrivée au laboratoire d'analyse.

Dès que le prélèvement arrive au laboratoire, le microbiologiste commence une série d'examens pour la mise en évidence de la bactérie causale.

Plusieurs facteurs peuvent gêner la recherche de l'agent étiologique ou empêcher d'établir la cause d'infection, ce sont notamment :

- Les difficultés de prélèvements qui peuvent rendre impossible l'obtention d'un échantillon représentatif du processus infectieux ;
- La contamination habituelle par la flore endogène de certains sites de prélèvement ;
- La difficulté de distinguer une simple colonisation d'une véritable infection due à des bactéries opportunistes.

C'est pourquoi plus les prélèvements auront été effectués avec précautions, plus grand sera le niveau de confiance attribué aux résultats de la culture. Cet état de fait résulte de la meilleure relation et de la bonne coordination entre le clinicien (médecin ORL) et le pharmacien (microbiologiste).

Notre cas d'étude vise notamment à éviter l'utilisation abusive des antibiotiques sachant que tout prélèvement est à réaliser avant toute antibiothérapie. En d'autres termes ; le résultat en est le seul déterminant pour le médecin traitant pour prescrire le traitement adapté.

Objectifs

Notre travail vise les objectifs suivants :

1. Connaître les modalités et les particularités des prélèvements bactériologiques en ORL.
2. Connaître les principaux agents bactériens responsables d'infections ORL chez l'homme.
3. Savoir différencier les agents bactériens pathogènes des commensaux.
4. Evaluer la sensibilité aux antibiotiques des germes souvent responsables des infections ORL.
5. Argumenter l'apport diagnostique des prélèvements ORL.

CHAPITRE I : Anatomie et Physiologie ORL

1. Anatomie ORL :

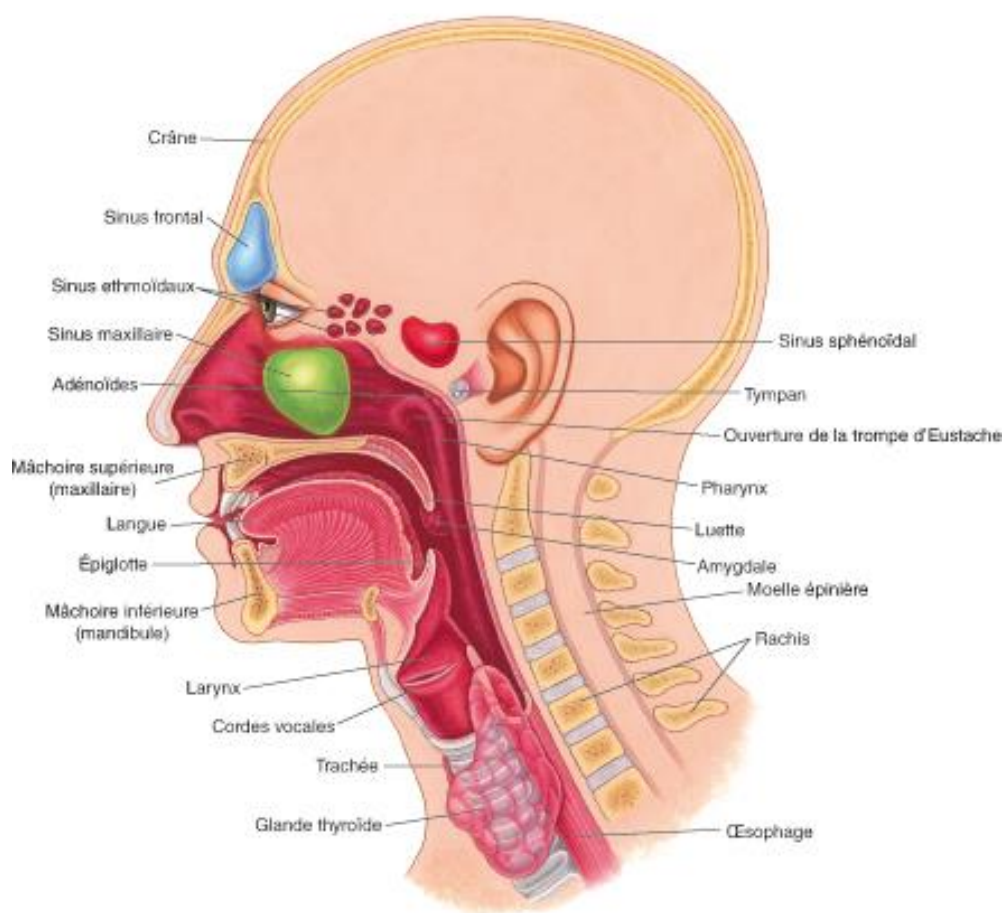


Figure 1 : Anatomie de la sphère ORL.

1.1. Anatomie de l'oreille :

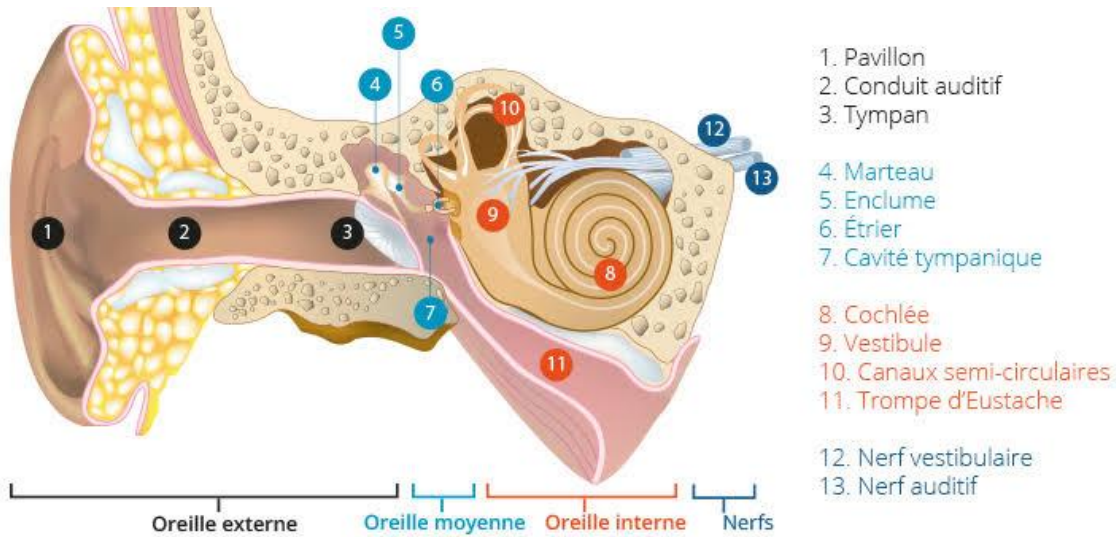


Figure 2 : Anatomie de l'oreille.

1.1.1. L'oreille externe :

L'oreille externe est formée du pavillon, du conduit auditif externe et de la couche épidermique du tympan. (1)

- Pavillon, partie en forme de coquille, rendue rigide par du cartilage sauf dans sa partie inférieure, le lobe de l'oreille, qui est fait de peau.
- Le conduit est un petit tube étroit (environ 2,5 cm de long sur 0,5 cm de large) qui passe à travers l'os temporal. Ses parois sont recouvertes de glandes cérumineuses qui sécrètent le cérumen. (2)

1.1.2. L'oreille moyenne :

L'oreille moyenne est constituée d'un ensemble de cavités (mastoïde, caisse du tympan) creusée dans l'os temporal et de la couche muqueuse du tympan. La couche fibreuse du tympan constitue la séparation entre oreilles moyenne et externe. Les cavités de l'oreille moyenne sont en communication avec le pharynx par un conduit dont la portion latérale est osseuse et la partie médiale est fibro-musculaire : la trompe d'Eustache. (1)

1.1.3. L'oreille interne :

L'oreille interne Située en dedans de la caisse du tympan, encore appelée le labyrinthe :

- Labyrinthe osseux creusé dans le rocher.
- Labyrinthe membraneux contenu dans le labyrinthe osseux

Ces 2 éléments sont séparés en partie par un espace, l'espace périlymphatique, rempli d'un liquide appelé la périlymphe. (2)

1.2. Anatomie du nez :

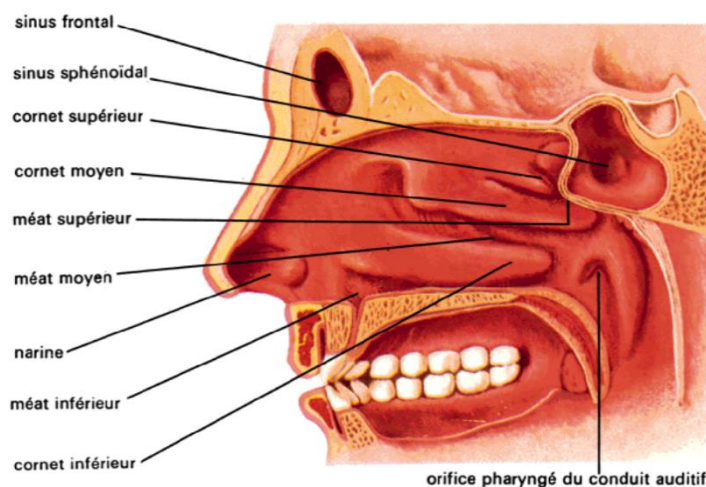


Figure 3 : anatomie du nez et fosses nasales.

1.2.1. Structure des fosses nasales :

La muqueuse du nez tapisse les fosses nasales et est recouverte de cils.

- Dans la partie inférieure, elle contient de nombreux vaisseaux sanguins et glandes à mucus, maintenant l'humidité au sein des fosses nasales.
- Dans la partie supérieure, elle renferme peu de glandes à mucus mais de nombreuses cellules olfactives.

1.2.2. Cornets :

Formés par une superposition osseuse, ils sont impliqués dans la respiration en évitant l'écoulement de l'air par les narines. (3)

1.3. Anatomie de la gorge :

Le pharynx est un conduit musculo-membraneux, étendu verticalement en avant de la colonne vertébrale cervicale, depuis la base du crane jusqu'au bord inférieur de C6 où il se poursuit par l'œsophage, Il comprend trois parties :

1.3.1. La partie supérieure-naso-pharynx : située en arrière de la cavité nasale, sa fonction est exclusivement respiratoire.

1.3.2. La partie moyenne-oro-pharynx : située en arrière de la cavité orale, c'est un carrefour entre la voie digestive et la voie aërièrè. Il communique avec le naso-pharynx, au niveau de l'isthme du pharynx situé en regard du voile du palais" L'isthme se ferme au cours de la déglutition.

1.3.3. La partie inférieure–le laryngo-pharynx : située en arrière du larynx. il est rétrécit, il se continue par l'œsophage. Elle a une fonction essentiellement digestive en reliant l'oropharynx à l'œsophage cervical.

NB : Présence de tonsilles. Connues sous le terme d'amygdales, les tonsilles sont impliquées dans le système de défense immunitaire de l'organisme. Le pharynx abrite plusieurs paires de tonsilles dont les plus importantes et visibles depuis la bouche sont les tonsilles palatines situées au niveau de l'oropharynx, à droite et à gauche de la lueette. (4)

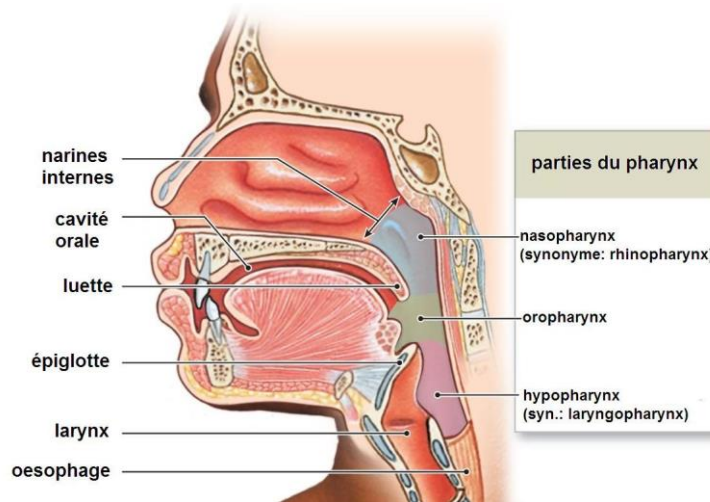


Figure 4 : Anatomie de la gorge.

2. Physiologie ORL :

2.1. Physiologie auditive :

Les ondes sonores sont acheminées par l'oreille externe, qui amplifie les aigus, jusqu'à la membrane tympanique. Celle-ci en vibrant met en mouvement la chaîne des osselets qui transmet ces mouvements à l'oreille interne en ayant amplifié d'autres fréquences. L'oreille peut donc être schématisée sous la forme de l'intersection d'un axe aérien pharyngo-oto-mastoïdien et d'un axe sensoriel dont le carrefour est la caisse du tympan. (5)

2.2. Physiologie nasale :

Le nez a de nombreuses fonctions connues - olfactive, ventilatoire - et moins connues - immunitaire et morphogénétique. Dans la fonction ventilatoire, le conditionnement de l'air inspiré, c'est-à-dire la régulation des débits aériens, la filtration, l'humidification et le réchauffement de l'air se font grâce à un triple mécanisme valvaire, narinaire, nasal et septoturbinale. Cette fine mécanique, variable d'un individu à l'autre et chez le même individu d'une fosse nasale à l'autre et d'un moment à l'autre, passe inaperçue dans les conditions normales habituelles. La ventilation nasale optimale est la ventilation exclusivement nasale, bouche fermée, pendant le sommeil. Toutes ces fonctions essentielles peuvent être perturbées par diverses pathologies et sont menacées dans la chirurgie non fonctionnelle du nez. Il faut impérativement les connaître pour les préserver ou les réparer. (6)

2.2. Physiologie du pharynx :

Le pharynx est doté de fonctions physiologiques complexes dans la déglutition des nourritures, dans la phonation comme cordon de résonance.

Grâce au mécanisme de déglutition, le bol alimentaire rejoint l'oesophage tandis que les voies aériennes supérieures sont transitoirement fermées. On observe plusieurs stades :

- A- Le déclenchement de la déglutition est volontaire : le bol alimentaire est comprimé puis poussé vers l'arrière par la langue contre le voile du palais
- B- Les phénomènes qui suivent sont totalement réflexes et s'enchaînent de la manière suivante :
- Elévation du voile du palais qui se plaque contre la paroi postérieure du pharynx et obstrue le passage vers le nez.
 - Contraction du voile du plancher buccal qui entraîne une élévation du pharynx et de l'os hyoïde ainsi qu'une fermeture de la glotte,
 - La respiration est suspendue : les voies aériennes supérieures sont obstruées, le bol alimentaire poussé par la langue descend dans l'oesophage. (7)

CHAPITRE II : La flore commensale des voies aériennes supérieures

La flore commensale est un ensemble de bactéries qui vivent sur un ou dans un organisme sans lui porte préjudice, elle contribue soit à sa défense soit à son fonctionnement soit au bon état de ses muqueuses. La flore commensale est principalement sur les muqueuses : peau, tube digestif, arbre respiratoire et appareils génitaux.

Les flores commensales des voies aériennes supérieures (Microbiote ORL), flores riches et variées en 700 espèces différentes au moins, dont l'existence complique le diagnostic des infections ORL ; il est possible, en outre, de trouver au sein de cette flore, des espèces potentiellement pathogènes et il est alors difficile de distinguer un simple portage d'une infection.

- Cette flore varie selon les sites (tableau 01). Elle est particulièrement abondante au niveau du pharynx.

	Flore de la muqueuse buccale	Flore salivaire	Flore du pharynx	Flore des fosses nasales	Flore du conduit auditif
<i>Streptococcus salivarius</i>	+++	+++	++		
Autres <i>Streptococcus</i> alpha hémolytiques	+++	++	++	+	
Bactéries anaérobies	++	+	++		
<i>Haemophilus</i>			+		
<i>Neisseria</i>			++	+	
<i>Branhamella</i>			++		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>				+++	+++
Corynébactéries				++	+++
<i>Micrococcus</i>					++

Tableau 01 : Flores commensales prédominantes des voies aériennes supérieures.

- 1. Au niveau oral** : on le trouve principalement sur la langue, les muqueuses, les gencives, les dents ainsi que dans la salive : les phyla dominants sont les Actinobacteria, les Bacteroidetes, les Firmicutes, les Proteobacteria et les Synergistetes (8), avec pour principaux genres *Streptococcus*, *Veillonella*, *Granulicatella*, *Gemella*, *Actinomyces*, *Corynebacterium*, etc (9).

2. **Au niveau nasal :** Actinobacteria et Firmicutes sont prédominantes avec parfois la présence de Proteobacteria : *Corynebacteriaceae* et *Propionibacteriaceae* sont les familles dominantes (10).
3. **Au niveau otologique :** on a longtemps cru que le milieu était exempt de microbiote (car stérile) mais l'on a depuis observé une population relativement variée de bactéries qui se nichent dans l'oreille moyenne avec une prédominance des *Pseudomonadaceae* (11). *La flore du conduit auditif Elle est qualitativement proche de la flore cutanée (staphylocoques et microcoques) mais limitée quantitativement par l'activité bactéricide du cérumen.* Des études récentes ont également mis en évidence la présence d'*Alloiococcus otitis*, *Corynebacterium otitidis* (12) (13) , ou encore *Turicella otitidis*. Si on retrouve ces bactéries dans les infections de l'oreille moyenne, leur rôle chez l'individu sain reste à élucider, mais il semblerait que le conduit auditif soit un réservoir infectieux pour l'oreille moyenne. (13)
4. **Dysbiose et pathologies ORL :**

Un déséquilibre dans le microbiote buccal est à l'origine de pathologies comme les caries, les gingivites et les parodontites, qu'il est possible de combattre en luttant contre le biofilm qui concentre ces bactéries pathogènes (9). Des investigations sont menées sur le microbiote nasal pour connaître son implication possible dans les sinusites, tandis que de plus amples études sont nécessaires pour bien identifier le rôle des bactéries présentes dans la sphère otologique.

CHAPITRE III : La flore pathogène des voies aériennes supérieure

❖ Démarche diagnostique des principales bactéries des infections ORL après le prélèvement au niveau du laboratoire de microbiologie :

La flore pathogène est constituée de microorganismes qui vivent aux dépens de l'hôte (ici l'homme) et provoquent chez lui des troubles plus ou moins graves. Une flore pathogène est dite stricte quand elle provoque chez l'hôte une maladie spécifique ; elle est dite opportuniste quand des microorganismes normalement commensaux deviennent pathogènes suite à divers événements.

1. *Haemophilus influenzae* :

C'est une bactérie à bacille gram négatif qui fait partie de la flore normale des muqueuses des voies respiratoires supérieures de l'enfant et de l'adulte. La colonisation débute très tôt après la naissance et va se poursuivre tout au long de la vie. Elle est avant tout responsable d'infections communautaires de la sphère ORL de l'enfant et de l'adulte. (14)

1.1. Etude bactériologique

1.1.1. Prélèvements :

Les prélèvements, a priori monomicrobiens (non contaminés par les flores commensales) sont les liquides d'épanchement. Ils sont plus simples à traiter, et l'isolement d' *Haemophilus* signera une forte imputabilité dans la pathologie.

Les prélèvements venant du tractus respiratoire supérieur sont susceptibles d'être polymicrobiens et/ou contaminés.

1.1.2. Transport :

Même si les *Haemophilus* sont plus résistants qu'on ne le pense généralement, il est conseillé soit un transport rapide des échantillons, soit le recours à un milieu de transport (TGV, Portagerm®) si le délai d'acheminement est supérieur à 3 heures.

1.1.3. Examen microscopique direct :

Observation de petits bacilles à Gram négatif, d'aspect coccobacillaire, groupés en amas, en courtes chaînettes. Les souches virulentes sont capsulées (comme pour le pneumocoque) (Fig 5).

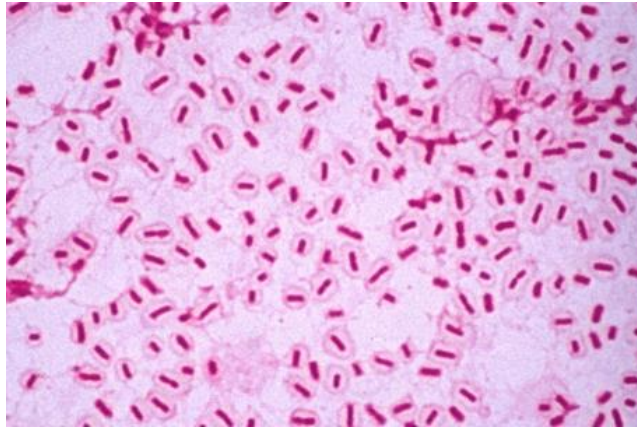


Figure 5 : Coloration de Gram de H .influenzae.

1.1.4. Culture :

H.influenzae exige pour sa croissance les facteurs X et V qui sont présents dans la gélose au sang cuit (gélose chocolat) ou dans la gélose ordinaire additionnée d'extrait globulaire. Les colonies apparaissent en 24-48 heures (Fig 6).



Figure 6 : Culture sur gélose au chocolat de H.influenzae.

Les colonies sont, pour les souches capsulées, assez grosses, muqueuses (3 mm de diamètre) ; elles sont plus petites, convexes ou plates pour les non-capsulées, et la coloration des frottis réalisés à partir de ces colonies révèle des bacilles à Gram négatif polymorphes. (15)

1.1.5. Caractères biochimiques :

L'étude des caractères biochimiques n'a pas d'intérêt pour le diagnostic mais un intérêt épidémiologique pour différencier les biotypes. Celui-ci repose sur l'exigence en facteurs X et V et sur la mise en évidence des caractères antigéniques.

L'exigence en CO₂ est appréciée en comparant les cultures sous 5 à 10 % de CO₂ et en atmosphère usuelle. L'oxydase est généralement lente à apparaître ; la recherche de la catalase (+) est également utilisée. L'hémolyse sur gélose au sang doit être recherchée sur primo culture (à la faveur d'un test de satellitisme). Ces caractères permettent une première orientation (tableau 02).

	Exigence en facteur		Synthèse porphyrine	Exigence CO ₂	Oxydase	Catalase	Hémolyse
	X	V					
<i>H. influenzae</i>	+	+	-	-	+	+	-

Tableau 02 : caractères d'orientation vers le diagnostic de *H. Influenzae*.

1.1.6. Identification complète par galerie :

Le recours à des galeries d'identification toutes prêtes permet de préciser dans 90 % des cas les diagnostics pour *H. influenzae*. Elle comporte la recherche d'activités enzymatiques et l'utilisation des sucres ; ils sont nombreux, distribués par AES, Becton Dickinson, Baxter Health Care ou bioMérieux. Il peut être utile de disposer des caractères détaillés (tableau 03).

	Synthèse porphyrines	Exigence facteur V	Hémolyse	Acidification D-glucose	D-fructose	Saccharose	Lactose	D-xylose
<i>H. influenzae</i>	-	+	-	+	-	-	-	+

Tableau 03 : Les caractères biochimique de *H. Influenzae*.

Elle sera toujours complétée par une recherche de la sensibilité aux antibiotiques, notamment à l'ampicilline (existence ou non d'une betalactamase) et au chloramphénicol.

1.2. Éléments d'orientation :

L'exigence en facteur X et V constitue la première étape du diagnostic différentiel (fig. 7). Pour cette recherche, l'inoculum bactérien ne doit pas apporter ces facteurs (bouillon d'hémoculture, sang) ; il est réalisé en partant de colonies prélevées en surface et mises en suspension en solution saline (9 ‰). Plusieurs méthodes sont utilisables. Nous préférons la méthode des disques imprégnés de facteurs X, V ou X + V (Oxoid, BBL, Rosco). Un inoculum léger (2 à 3 colonies en eau stérile) est ensemencé en nappe sur gélose trypticase-soja, puis on dispose, à distance, les trois disques. Après incubation, on recherche la croissance autour de chacun des disques permettant de préciser les exigences en facteur X, V ou X + V.

Dans certains cas, la diffusion de X et de V à partir des disques permet une culture en zone de confluence où les deux facteurs ont diffusé (fig. 8).

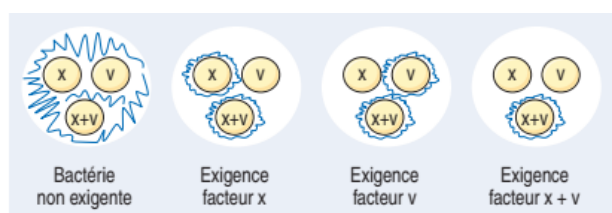


Figure 7 : Représentation schématique de l'aspect des cultures autour des disques permettant de préciser les exigences en facteur de croissance.



Figure 8 : Aspect de satellitisme observé montrant la double exigence en facteur X + V d'*Haemophilus influenzae*.

1.3. Résultats de l'Antibiogramme :

H. influenzae est habituellement sensible aux aminopénicillines, céphalosporines de 2^e et 3^e générations, aminosides, rifampicine.

La résistance naturelle concerne les macrolides comportant un cycle de 16 atomes, les lincosamines, la bacitracine, le mécillinam, l'oxacilline et les glycopeptides. C'est une espèce modérément sensible aux macrolides (cycle 14 et 15 atomes) (érythromycine ou ERY), les streptogramines, les céphalosporines de première génération (céfalotine ou CF).

Comme d'autres espèces bactériennes, *H. influenzae* est concerné par la résistance acquise touchant plusieurs familles d'antibiotiques.

β -lactamines : le mécanisme le plus fréquent est la production de bêta-lactamase (bla de type TEM). L'activité des aminopénicillines est restaurée en présence d'un inhibiteur de β -lactamase.

Un mécanisme non enzymatique est aussi observé reposant sur une modification de la cible des bêta-lactamines, les PLP ou protéines de liaison à la pénicilline, ayant subi des mutations ponctuelles entraînant des substitutions d'acides aminés et une diminution de l'affinité pour les bêta-lactamines. Ces PLP sont aussi les enzymes impliqués dans la synthèse d'un composant de la paroi bactérienne, le peptidoglycane.

La résistance acquise concerne la famille des tétracyclines (TET), des phénicolés (C), des fluoroquinolones ou encore le triméthoprime-sulfaméthoxazole (SXT), mais pour certains, l'incidence est très faible.

Ceci concerne l'ensemble des souches, toutes origines confondues. Dans certaines situations cliniques, la résistance peut être plus élevée, 45% de souches productrices de β -lactamase parmi celles isolées de pus d'otite et de pus conjonctival.

Cette résistance aux antibiotiques concerne aussi les souches capsulées et invasives. Cependant, les souches résistantes restent accessibles à un traitement par céphalosporines de troisième génération injectables, par exemple céfotaxime, ceftriaxone (16).

2. Pneumocoque (*S.pneumoniae*) :

S. pneumoniae est une bactérie commensale des voies aériennes supérieures. L'un des éléments majeurs de virulence du pneumocoque repose sur la capsule.

2.1. Etude bactériologique :

2.1.1. Transport des prélèvements :

Le pneumocoque étant une bactérie fragile, les prélèvements doivent arriver rapidement au laboratoire. Toutefois, avec l'emploi de milieux de transport, type Portagerm®, l'acheminement peut être différé.

2.1.2. Examen microscopique direct :

Les pneumocoques apparaissent comme des Cocci à Gram positif, en flamme de bougie, encapsulés, groupés par paire (diplocoque), parfois en courtes chaînettes (Fig 9).

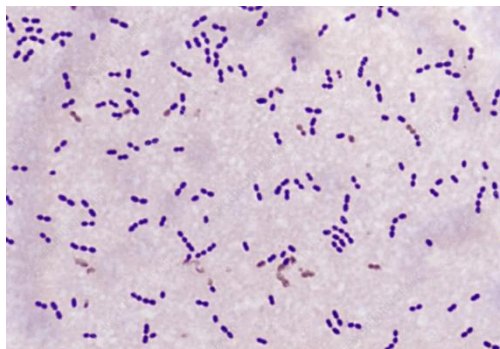


Figure 9 : Coloration de gram de *S. Pneumoniae*.

2.1.3. Culture :

La culture du pneumocoque est aussi difficile que celle des streptocoques. Sur gélose au sang en anaérobiose ou sous CO₂, le pneumocoque donne des colonies lisses, transparentes, en goutte de rosée, entourées d'une zone d'hémolyse partielle (alpha). Par repiquages successifs, les colonies deviennent rugueuses et correspondent à des pneumocoques ayant perdu leur capsule.

2.1.4. Caractères biochimiques :



Figure 10 : Sensibilité du pneumocoque à l'optochine sur gélose au sang frais.

Comme tous les streptocoques, le pneumocoque est un germe à métabolisme anaérobie mais aérobie tolérant. Il n'a pas de catalase. L'adjonction de tensio-actifs (bile, sels biliaires) à une culture de pneumocoque en bouillon entraîne la lyse des capsules du pneumocoque et l'éclaircissement immédiat du bouillon (phénomène de NEUFLED). A l'inverse des streptocoques, le pneumocoque est sensible à un sel de cuivre, l'éthyl-hydrocupréine (optochine) (Fig 10). Cette propriété est utilisée pour l'identification du pneumocoque au laboratoire (tableau 04).

<i>S. pneumoniae</i>	
Hémolyse	α
Bile-esculine	—
NaCl 6,5 %	—
Bacitracine	S*
Hippurate	—
Optochine	S*
Capsule	+

Tableau 04 : caractères permettant une pré-identification de *S. Pneumoniae*.

2.2. Diagnostic bactériologique

Il n'y a pas de diagnostic sérologique des infections à pneumocoque. Le diagnostic bactériologique repose donc sur la mise en évidence du pneumocoque dans les lésions.

— à l'examen microscopique, de diplocoques à Gram positif encapsulés et de nombreux polynucléaires altérés, s'il s'agit d'un liquide de séreuse infectée, d'un abcès, etc.

— à la culture sur gélose au sang, de colonies en goutte de rosée, alpha-hémolytiques, sensibles à l'optochine. L'identification peut, si nécessaire, être complétée par la lyse par la bile ou les sels biliaires d'une culture en bouillon et le sérotypage.

- On complètera l'isolement et l'identification du pneumocoque par un antibiogramme, en raison de l'apparition de souches de pneumocoques résistantes aux antibiotiques.

2.3. Résultats d'Antibiogramme :

❖ Résistance aux bêta-lactamines

Pneumocoque à Sensibilité Diminuée aux Pénicillines (PSDP) : résistance par modification qualitative et quantitative des PLP (PLP issues de recombinaison de l'ADN du pneumocoque avec l'ADN de streptocoques oraux).

Cette résistance s'exprime à des niveaux différents selon la bêta-lactamine concernée.

Les PSDP sont détectés par l'utilisation de l'oxacilline : en cas de diamètre <26mm, on doit réaliser les CMI de la pénicilline G, de l'amoxicilline, d'une céphalosporine de 3^{ème} génération (ceftriaxone, céfotaxime), de l'antibiotique utilisé pour le traitement ...

Les bêta-lactamines les plus actives sur les PSDP sont l'amoxicilline, la ceftriaxone, le céfotaxime et l'imipénème.

❖ **Résistance aux aminosides (gentamicine) :**

A) Résistance de bas niveau :

Résistance naturelle de bas niveau par faible efficacité du transport membranaire. Leur synergie avec les antibiotiques actifs sur la paroi des bactéries (glycopeptides et b-lactamines) est conservée.

B) Résistance de haut niveau :

Principalement par production d'enzymes inactivatrices. La résistance de haut niveau ne permet plus l'utilisation des aminosides même en association.

Streptomycine HC : ne répond que pour la streptomycine (mutation ou ANT)

Kanamycine HC : répond pour la kanamycine, l'amikacine et l'isepamycine (APH (3')-III) On peut observer l'association de ces 2 mécanismes d'action.

Gentamicine HC : une résistance à la gentamicine HC confère une résistance à tous les aminosides.

❖ **Résistance aux macrolides :** (érythromycine, lincomycine, pristinamycine, télichromycine)

❖ **Résistance aux fluoroquinolones** (norfloxacin) :

Les fluoroquinolones les plus actives sur le pneumocoque sont la moxifloxacin et la lévofloxacin (les autres fluoroquinolones sont peu actives). Une diminution de sensibilité des pneumocoques aux fluoroquinolones est détectée par l'utilisation de la norfloxacin. En cas de sensibilité diminuée, l'utilisation de fluoroquinolone ne sera envisagée qu'après réalisation des CMI de la moxifloxacin (et éventuellement de la lévofloxacin). **(17)**

L'apparition des souches de pneumocoques résistantes aux antibiotiques est le résultat de l'augmentation de la consommation des antibiotiques, en particulier chez les jeunes enfants, et la transmission croisée des souches résistantes, surtout dans les collectivités d'enfants (crèches). **(18)**

3. Branhamella (Moraxella) catarrhalis :

Branhamella catarrhalis est aussi désignée sous le nom de Moraxella catarrhalis, elle fait partie des espèces commensales des voies aériennes supérieures est souvent classé comme la 3ème bactérie responsable d'infections respiratoires de la sphère ORL (sinusite - otite) après H.influenzae et S.pneumoniae.

3.1. Etude bactériologique :

3.1.1. Nature des prélèvements :

Prélèvements en fonction de la pathologie et de la sphère touchée, essentiellement prélèvements broncho-pulmonaires, idéalement protégés, parfois possibilité de crachat avec culture pure, pus de sinus ou pus d'otite moyenne aigue ou après paracentèse. Bactérie non fragile mais prélèvements pulmonaires devant parvenir rapidement au laboratoire.

3.1.2. Examen microscopique direct :

B. catarrhalis sont des Cocci à Gram négatif se présente sous forme arrondies ou ovoïdes, avec des aspects Cocco bacillaires. (Figure 11)

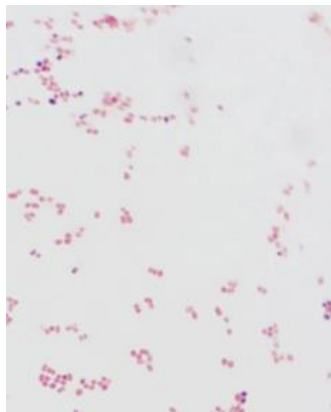


Figure 11 : Coloration de Gram de B.catarrhalis.

3.1.3. Culture :

BRACA pousse sur milieux ordinaires, avec une taille de colonies optimales en 48h meilleure croissance sur gélose chocolat, colonies qui peuvent être poussées sur la gélose comme un palet de hockey (fig 12) (19).

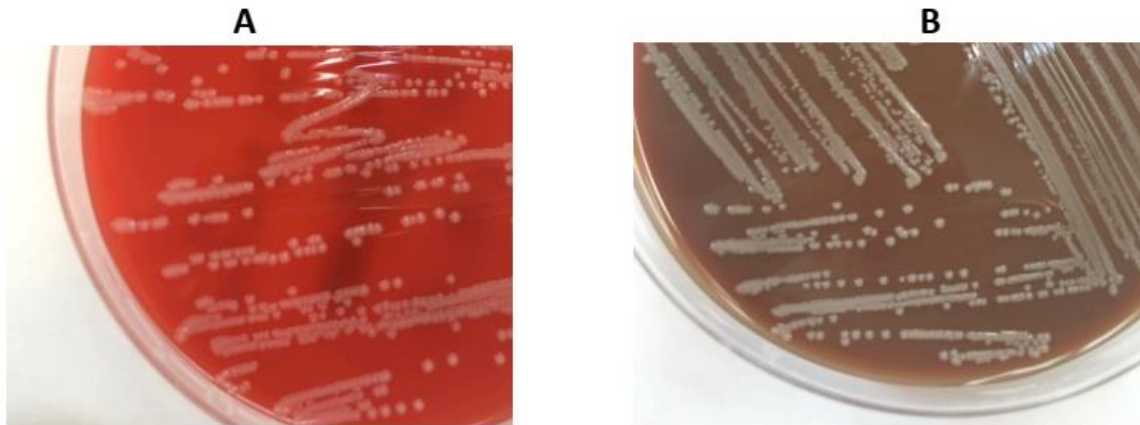


Figure 12 : Aspect en culture de *B. catarrhalis* sur gélose au sang frais (A) et gélose au sang cuit dite chocolat (B).

3.2. Résultats de l'Antibiogramme :

La résistance de *Moraxella catarrhalis* au β -lactamases tels que la pénicilline G, à l'ampicilline et à l'amoxicilline, est médiatisé par la présence de β -lactamases BRO-1 et BRO-2 qui protègent la couche peptidoglycane en hydrolysant le β -lactame. Elle est également distribuée à la vancomycine et à la clindamycine, mais sensible à l'association amoxicilline-clavulanate, aux céphalosporines à spectre étendu ou à large spectre, aux tétracyclines, à la rifampicine et à l'érythromycine (19).

1. Streptocoque de groupe A (Pyogenes) :

SGA est une bactérie à gram positif se présentent le plus souvent sous forme des infections superficielles non compliqués, telles que la pharyngo-amygdalite ou la scarlatine.

4.1. Etude bactériologique :

4.1.1. Examen microscopique direct :

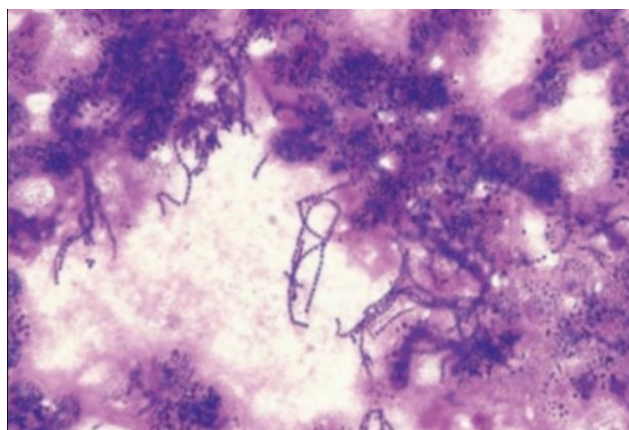


Figure 13 : Examen direct (coloration de Gram) de *S. Pyogenes*.

La coloration de Gram montre sur les colonies des Cocci de taille et de forme irrégulières, à Gram positif, groupés en chaînettes plus ou moins longues et flexueuses, immobiles, acapsulés, asporulés (figure 13).

1.1.2. Culture :

Les streptocoques sont des germes exigeants qui ne poussent donc pas sur les milieux de culture ordinaires. Ceux-ci doivent être additionnés de sérum ou de sang frais (Fig 14).

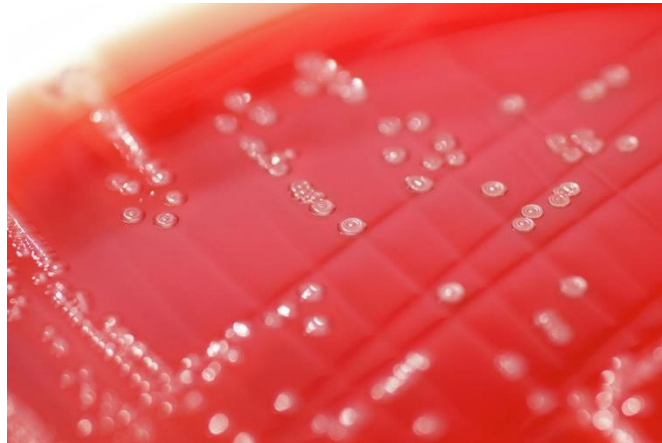


Figure 14 : Culture de SGA sur gélose au sang frais

- **En bouillon :**

Les streptocoques poussent en donnant des flocons et un dépôt au fond du tube dû aux longues chainettes et évoquant de la mie de pain.

- **Sur gélose au sang frais :**

La gélose estensemencée et mise en incubation à 37 °C de préférence en atmosphère anaérobie ou sous CO₂. L'anaérobiose permet une meilleure mise en évidence de la β -hémolyse. Ils donnent de petites colonies grisâtres, translucides, en grain de semoule entourées d'une zone d'hémolyse totale (hémolyse bêta) pour les streptocoques des groupes A, C, G, tandis que les autres streptocoques donnent une hémolyse partielle (hémolyse alpha) ou pas d'hémolyse du tout. **(18)**

4.1.3. Caractères biochimiques :

Après avoir vérifié l'absence de catalase (en prenant une parcelle de la surface de la colonie), on effectue un sérogroupage selon la méthode de Lancefield. Le typage du polyside C (après extraction enzymatique ou chimique et agglutination avec des particules de latex recouvertes d'anticorps de groupe dirigés contre le polyside C) permet de classer les streptocoques β -hémolytiques en groupes A, B, C, G qui sont les plus pathogènes.

4.2. Test de diagnostic rapide TDR :

- Le TDR offre une alternative dans le diagnostic des angines streptococciques. C'est un examen simple, rapide, non invasif qui permet de différencier en quelques minutes les angines virales des angines streptococciques ; ce qui permet de limiter la prescription des antibiotiques aux seules angines streptococciques (20). Dans les différentes études, les TDR utilisés avaient généralement une excellente spécificité souvent supérieure à 95 % et une sensibilité moins bonne souvent comprise entre 80 et 95 %.

Il serait intéressant de recommander d'effectuer un TDR avant toute décision thérapeutique afin de limiter l'antibiothérapie aux angines aiguës à SGA.

- Un TDR positif, confirme l'étiologie à SGA, et justifie la prescription d'antibiotiques.
- TDR Un négatif chez un sujet sans facteur de risque de RAA ne justifie pas de contrôle supplémentaire systématique par culture, ni de traitement antibiotique. (20)

4.3. Résultats de l'Antibiogramme :

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de SGA isolés a montré une sensibilité constante aux β -lactamines (Pénicilline G, Amoxicilline et Cefotaxime) qui restent le traitement de référence des angines streptococciques. Aucune résistance du SGA aux β -lactamines n'a été décrite dans la littérature malgré l'utilisation de ces antibiotiques depuis des décennies dans le traitement des angines.

Les macrolides comme l'érythromycine constituent une alternative thérapeutique en cas de contre-indication des β -lactamines. Au cours des dernières années, une surconsommation des macrolides entraînant une pression de sélection importante était à l'origine d'une augmentation des taux de résistance dans plusieurs pays, notamment en Europe et en extrême orient.

Cette faible prévalence de la résistance à l'érythromycine ne doit pas dispenser de continuer la surveillance pour détecter à temps une éventuelle augmentation des taux de résistances.

Le SGA comme tous les streptococques est résistant aux aminosides.

4.4. Conclusion :

Le SGA est responsable de 32,9 % des angines. Le diagnostic clinique basé sur l'utilisation des signes cliniques isolés où des scores cliniques est non fiable pour le diagnostic étiologique des angines.

Le TDR, par sa sensibilité, sa spécificité et sa rapidité, offre un très bon moyen de diagnostic et d'orientation thérapeutique meilleur que le recours à la clinique. Il serait donc intéressant de

recommander, dans notre pays, d'effectuer un TDR devant toute angine aiguë afin de limiter l'antibiothérapie aux angines à SGA. (21)

2. Staphylococcus aureus :

Staphylococcus aureus est une bactérie extrêmement pathogène pour l'homme. Elle est la cause de multiples infections, cutanée et certaines infections de la sphère ORL comme les otites, sinusites et angines. Elle est très redoutée en milieu hospitalier et arrive au premier rang des germes à Gram positif responsables d'infections nosocomiales.

5.1. Etude bactériologique :

5.1.1. Examen microscopique direct :

Ce sont des Cocci à Gram positif regroupés en amas, en diplocoques, en tétrades ou en grappes de raisin. Ils sont non sporulés immobiles et parfois capsulés. (Fig 15)

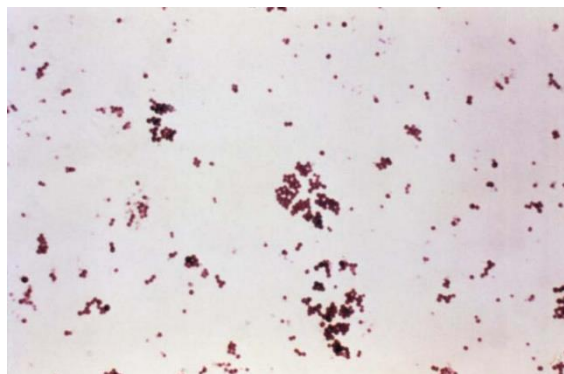


Figure 15 : Staphylococcus Aureus coloré au Gram Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

1.5.2. Culture :

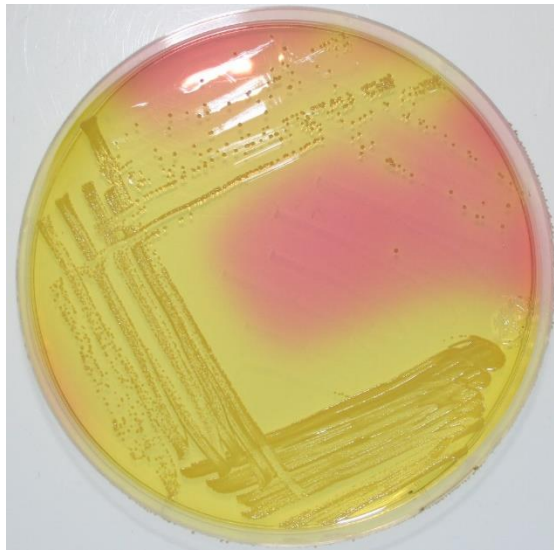


Figure 16 : Culture de *Staphylococcus aureus* Fermentation du mannitol 24h à 37°C.

Comme tous les germes très répandus dans la nature, *S.aureus* cultive facilement sur les milieux usuels, à des conditions de pH et de température variables. Il est même capable de pousser dans des conditions hostiles, par exemple en présence de 7 % de ClNa. Ce caractère est mis à profit dans le milieu de culture sélectif hypersalé de CHAPMAN pour isoler le staphylocoque d'un prélèvement polymicrobien (Fig 16).

- **En bouillon :**

S.aureus donne un trouble uniforme en quelques heures Sur gélose ordinaire les colonies sont lisses, rondes, bombées, brillantes, opaques, de 1 mm de diamètre. Elles se pigmentent habituellement en jaune doré, parfois en jaune citron, et parfois sont non pigmentées.

- **En gélose profonde :**

S.aureus pousse dans la zone d'aérobiose et dans la zone d'anaérobiose. C'est donc une bactérie aérobie-anaérobie facultative, capable de se multiplier à la surface de la peau, en aérobie et dans les tissus mal oxygénés, plaie profonde par exemple.

5.1.3. Caractères biochimiques :

S.aureus a un métabolisme aérobie prédominant et anaérobie facultatif. Il est *catalase positive* à la différence des bactéries du genre *Streptococcus* qui n'ont pas de métabolisme aérobie. Il est toutefois capable de *fermenter* le glucose (métabolisme anaérobie) à la différence des microcoques. Il est habituellement capable de fermenter le *mannitol*. Ce caractère est souvent, mais pas

obligatoirement, associé à la pathogénicité. Il est utilisé dans le milieu de CHAPMAN. La fermentation se traduit par le virage au jaune du milieu de culture (22).

5.2. Diagnostic bactériologique :

Le diagnostic bactériologique de l'infection staphylococcique est uniquement direct (mise en évidence de la bactérie). Il n'y a pas de diagnostic indirect par recherche des anticorps circulants. Le diagnostic repose sur les principales étapes suivantes :

- Le prélèvement : aseptique (pour être certain que le staphylocoque que l'on va isoler n'est pas un simple commensal de la muqueuses) et avant le début du traitement antibiotique.
- L'examen microscopique d'orientation à la recherche de cocci réguliers, à Gram positif, groupés en amas.
- La culture sur gélose ordinaire dans la majorité des cas ou sur milieu de culture sélectif, type milieu de CHAPMAN (qui contient 7 % de ClNa, du mannitol et un indicateur de pH) si le prélèvement est fortement contaminé par d'autres bactéries. L'identification de la bactérie repose sur la mise en évidence des caractères suivants : catalase (différence avec le streptocoque), fermentation du glucose en anaérobiose (différence avec le microcoque), coagulase (+), DNase. Thermostable (qui signe l'espèce *S.aureus*), fermentation de mannitol (23).

5.3. Résultats d'Antibiogramme :

Le diagnostic sera toujours complété par la mesure de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme) étant donné la fréquence de la résistance de *S.aureus* aux bêta-lactamines (ex. : pénicilline) grâce à l'acquisition d'une pénicillinase plasmidique, enzyme dégradant la pénicilline. La résistance à la pénicilline, initialement restreinte au milieu hospitalier, a très vite diffusé en milieu communautaire et concerne actuellement plus de 90 % des souches de *S. aureus*. Pendant les années 1950 sont apparues les souches de *S. aureus* multirésistantes : à la résistance à la pénicilline était associée la résistance à la streptomycine, à l'érythromycine, à la tétracycline, au chloramphénicol ainsi qu'aux sulfamides (23).

Les souches multi-résistantes aux antibiotiques les plus dangereuses sont celles du SARM, résistant à la méticilline (comme 60% des souches multi-résistantes) (22), et aussi à l'oxacilline (pénicilline M).

Les glycopeptides vancomycine et teicoplanine sont des alternatives à l'oxacilline en cas de résistance ou d'intolérance. Cependant, des souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides sont rapportées. Leur détection est difficile mais nécessaire, car l'augmentation progressive des

concentrations minimales inhibitrices (CMI) de vancomycine pour des souches considérées jusqu'à présent comme sensibles semble corrélée à une mauvaise évolution sur le plan clinique. (23)

6. *Pseudomonas aeruginosa* :

Cette bactérie à Gram négatif émerge comme un agent pathogène majeur de l'Homme. C'est l'exemple-type des bactéries nosocomiales opportunistes.

6.1. Etude bactériologique :

6.1.1. Examen microscopique direct :

Après examen à l'état frais entre lame et lamelle et après coloration de Gram on observe des Bacilles à Gram négatif, aérobies stricts, non sporulé, fin, mobile grâce à une ciliature polaire. (Figure 17)

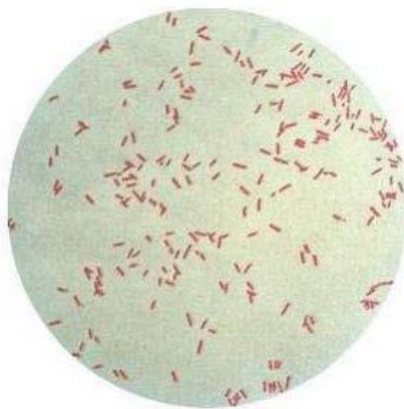


Figure 17 : Aspect microscopique du *Pseudomonas Aeruginosa*
Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

6.1.2. Culture :

P. aeruginosa cultive facilement sur milieux ordinaires en développant une odeur de seringa. La température optimale de croissance est de 30 °C. Sur milieux solides, trois types de colonies peuvent être observés simultanément ou de manière isolée :

- colonies larges (« la ») de 2 à 3 mm de diamètre, à bord irrégulier, rugueuses, avec une partie centrale bombée présentant des reflets métalliques.
- colonies plus petites lisses (« S ») bombées à bord régulier.
- colonies muqueuses (« M »), bombées, coalescentes, filantes, rencontrées chez les souches produisant un slime composé d'un polymère d'alginate.

Pour les souches pigmentées (95 %), la simple constatation d'une pigmentation verte du fait de la production de deux pigments, la pyocyanine (hydrosoluble) et la pyoverdine (soluble dans le chloroforme) établit le diagnostic (fig. 18).

- À partir de prélèvements polymicrobiens, il est nécessaire d'avoir recours à un milieu sélectif contenant ducétrimide (ammonium quaternaire) associé ou non à de l'acide nalidixique. (24)



Figure 18 : Exemple de *pseudomonas aeruginosa* (pyocyanine sur King A et pyoverdine sur King B)

6.1.3. Caractères biochimiques :

Pour *P. aeruginosa*, devant des souches non pigmentées, le recours à des galeries est nécessaire, mais les résultats obtenus avec celles-ci sont parfois erronés et de plus en plus souvent on doit recourir à des méthodes moléculaires pour obtenir un diagnostic d'espèces précis.

L'oxydase positive, non fermentaires, mobiles par une ciliature polaire monotriche ou multitriche, sauf quelques exceptions, respirant ou non les nitrates, oxydant ou non le glucose et n'accumulant pas du poly- β -hydroxybutyrate. (Tableau 05)

Hydrolyse			Citrate	Acidification					Remarques
Gélatine	Lécithinase	Urée	Simmons	Glucose	Tréhalose	Mannitol	Xylose	Maltose	Maltose
+	V	V	+	+	-	+	+	-	10 % de souches apigmentées

Caractères	Pigment	Nombre flagelles	Oxydase	Croissance		Réduction
				à 41 °C	à 4 °C	NO ₃ ⁻
Espèce						
<i>P. aeruginosa</i>	PC + PV ^c	1	+	+	-	+

Tableau 05 : caractéristiques morphologiques et biochimiques de *P.aeruginosa*.

6.2. Résultats d'Antibiogramme :

Pseudomonas aeruginosa possède une résistance naturelle à un très grand nombre d'antibiotiques en raison de la production d'une bêta-lactamase chromosomique inductible de classe C qui n'est pas inhibée par le clavulanate, et d'une mauvaise perméabilité membranaire. *Pseudomonas aeruginosa* est donc résistant aux pénicillines de groupe V, G, M et A, céphalosporines G1 (céfazoline), G2, certains de G3 et aux quinolones de première génération.

Les antibiotiques habituellement actifs contre *P. aeruginosa* sont peu nombreux et d'usage hospitalier.

β-lactamines : pipéracilline (associée à l'inhibiteur de β-lactamase tazobactam), ceftazidime, céfépime, ceftolozane (associé au tazobactam), ceftazidime (associée à l'inhibiteur de β-lactamase avibactam), aztréonam, imipénème et méropénème

Aminosides : tobramycine et amikacine.

Fluoroquinolones : ciprofloxacine.

Polymyxines : polymyxine B et colistine

Autres : fosfomycine. (24)

7. Anaérobies stricts :

Les bactéries anaérobies strictes font partie de tous les microbiotes humains. Lorsqu'elles quittent leur territoire originel, elles peuvent se comporter comme des pathogènes opportunistes et être responsables d'infections ORL sévères, de contiguïté, le plus souvent polymicrobiennes. Les

bactéries anaérobies agissent alors en synergie avec les bactéries aérobies pour conduire à des infections mixtes (angine de vincent), cela grâce à leurs facteurs de virulence. Des infections monomicrobiennes sévères sont également dues à des bactéries anaérobies. Bien que majoritairement d'origine endogène, les infections à bactéries anaérobies peuvent également être d'origine exogène. Elles varient selon les sites d'infection (Tableau 06).

Infections en O.R.L.				
SC = sinusites chroniques, OC = otites chroniques, ID = dentaires, ALV= angines				
Bactéries	SC	OC	ID	ALV
B. fragilis	+	+		
Prevotella	+++	+++	+++	++
Porphyromonas	++	++	+++	+
Fusobacterium	+++	+++	+++	1 ++++
Clostridium	+	+	+	
Eubacterium	+	+	+	+
Peptostreptococcus	++++	+++	+++	+++
Espèces associées spécifiquement : 1 F. necrophorum + spirochètes; 2 P. gingivalis, P. intermedia, B. forsythus + E. corrodens, Capnocytophaga, S. milleri				
Présenté par Pr Luc Dubreuil aux CMI à la faculté COCHIN/ 2019				

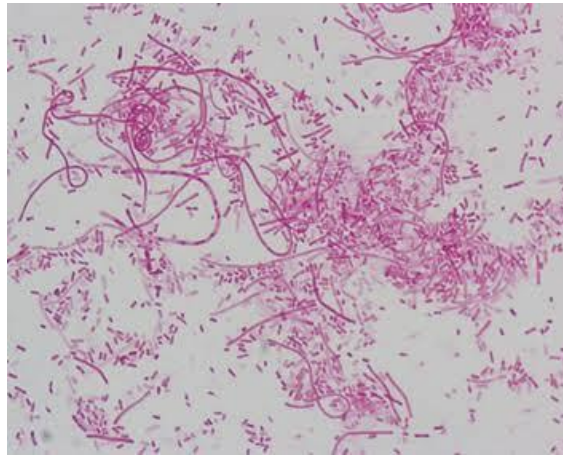
Tableau 06 : Les germes anaérobies prédominants des voies aériennes supérieures.

7.1. Fusobacterium necrophorum :

F. Necrophorum est un organisme anaérobie qui est à l'origine de l'angine de vincent en association à un spirochète du genre Borrelia (Treponema Vincentii). Il est aussi responsable des cas d'otites aiguës et chroniques, de mastoïdite et oro-pharyngite.

Il est de plus en plus reconnu comme une cause de pharyngite chez les adolescents plus âgés et les adultes (âgés de 15 à 30 ans).

La pharyngite à F. necrophorum peut être associée au développement d'une thrombophlébite septique de la veine jugulaire interne, connue sous le nom de syndrome de Lemierre (Fig. 1.8). Environ 80% des cas de syndrome de Lemierre sont dus à cette bactérie, mais la proportion de patients infectés ou colonisés par F. necrophorum qui développent une pharyngite et un syndrome de Lemierre est inconnue. (25)

7.1.1. Etude bactériologique :**Figure 19 :** Coloration de gram de *F. necrophorum*.

L'examen direct après coloration de Gram montre que le *F. necrophorum* est une bactérie à Gram négatif, non sporeformante, non mobile. Il existe deux sous-espèces, le nécrophorum et le funduliforme, la première étant plus virulente. Tous les membres du genre *Fusobacterium* produisent du butyrate en tant que produit final majeur de l'utilisation des acides aminés et sont de mauvais fermenteurs d'hydrates de carbone. La morphologie de *F. necrophorum* est variable, allant du coccobacillaire au filamenteux (Fig 19), mais les organismes filamenteux sont les plus courants, en particulier dans les nouvelles cultures. Culture en anaérobie sur gélose a sang cuit pendant 48 heures. Les colonies sont petites, presque coniques, jaunâtres et ont une surface mate (Fig 20).

**Figure 20 :** Culture de *F. Necrophorum* sous espèce funduliforme sur gélose a sang cuit.

L'identification dépend de quelques réactions positives telles que la formation d'indole, la présence de lipase, la DNase, et la phosphatase alcaline, oxydase et catalase négative. *Fusobacterium necrophorum* est la seule espèce de *Fusobacterium* qui fermente le lactate en propionate. Cette méthode est utilisée pour confirmer l'identification de *F. necrophorum* par chromatographie gaz-liquide. Cependant, la chromatographie gaz-liquide n'est pas couramment disponible. Lorsqu'il est soumis à des kits commerciaux (par exemple, l'API rapide ID 32A). (26)

7.1.2. Résultats d'Antibiogramme :

Il présente des résistances à certains antibiotiques, il est résistant au triméthoprim-sulfaméthoxazole, aux amino-glycosides, aux glycopeptides, il présente une sensibilité diminuée à l'érythromycine (15% des cas), tetracyclines (2% des cas) et les pénicillines (jusqu'à 17% par production des bêta-lactamases) mais reste sensible au métronidazole, à la colistine, à la clindamycine et à l'association amoxicilline-acide clavulanique. (27)

7.2. Peptostreptocoques spp :

Les peptostreptocoques font partie de la flore microbienne normale de la bouche, des voies respiratoires supérieures, du tube digestif, du système génito-urinaire de la femme et de la peau (30). Ce type de bactérie entraîne une grande variété d'infections, dont des infections touchant l'oropharynx, les sinus, les oreilles, l'appareil musculosquelettique, l'abdomen, les voies génito-urinaires et les tissus dentaires, périamygdaliens, superficiels et mous (28/30). Il s'est avéré plus répandu dans la gorge des patients atteints d'un cancer du larynx que des individus en bonne santé.

7.2.1. Etude bactériologique :

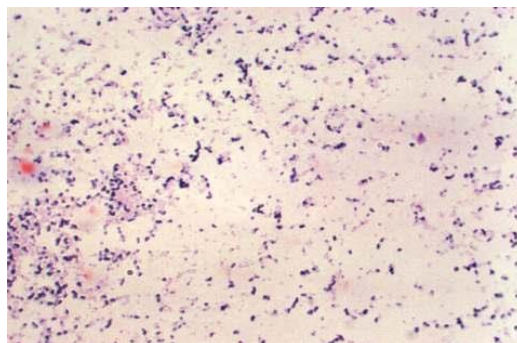


Figure 21 : Coloration de gram de peptostreptocoque

Les peptostreptocoques sont des Cocci à gram positif anaérobies, non sporulées, mesurant 0,3 à 1,8 µm de diamètre, selon l'espèce (26) (27). Ils se présentent habituellement en chaînes, en paires, en tétrades ou en grappes (26) (27) (Fig21).

7.2.2. Résultats d'Antibiogramme :

Sensible à la pénicilline, aux céphalosporines, aux carbapénems, à la trovafloxacin, à la clinafloxacin et au métronidazole (des cas de résistance ont été signalés) (27) (28), La réponse aux autres antibiotiques varie selon l'espèce (27).

7.3. Prevotella et Porphyromonas :

Prevotella et Porphyromonas étaient auparavant considérés comme faisant partie du genre Bacteroides.

Leur habitat est différent de celui des Bacteroides. On les retrouve plus fréquemment au niveau de la flore buccale ou au niveau des voies aéro-supérieures digestives. Ceci va expliquer leur pouvoir pathogène : pharyngites, otites, pneumopathies de déglutition, abcès du poumon, du cerveau, et contrairement aux Bacteroides très rarement des infections situées au diaphragme. (31)

7.3.1. Etude bactériologique :

Ces GNAR pigmentés peuvent être distingués les uns des autres sur le plan métabolique car le saccharolytique Prevotella spp et l'asaccharolytique Porphyromonas spp. Environ 20 Prevotella spp ont été impliqués dans l'apparition de maladies humaines. Prevotella forme des colonies circulaires, convexes, de 1 à 2 mm, brillantes et grises. Sur coloration de Gram, ils forment de courts bâtonnets Gram-négatifs et peuvent prendre des formes de coccobacilles. Prevotella pousse bien sur une gélose au sang lactée avec de la kanamycine et de la vancomycine (LKV) et a une résistance variable à la colistine. Bien que Prevotella spp sont largement considérés comme des GNAR pigmentés, ils peuvent également être non pigmentés. Pigmenté Prevotella spp forment des colonies brunes ou noires après une semaine de croissance sur LKV. Avant que ce pigment brun ou noir ne se développe, Prevotella peut produire une fluorescence rouge foncé lors de l'exposition à une lampe de Wood (lumière UV à ondes longues). D'après la morphologie des colonies et la coloration de Gram, Porphyromonas spp ont tendance à former des colonies plus petites et se présentent sous forme de bâtonnets plus courts ou de coccobacilles sur coloration de Gram, mais peuvent être difficiles à distinguer de Prevotella. Porphyromonas se développe généralement sous forme de colonies

pigmentées, formant initialement des colonies grises qui s'assombrissent en colonies noires dans la semaine suivant l'étalement sur gélose au sang laqué. *Porphyromonas* ne se développe pas sur les milieux LKV en raison de sa sensibilité à la vancomycine, mais il est résistant à la colistine. (32)

Leur culture est, en général, difficile et lente (plusieurs jours), le plus souvent obtenue sur des milieux gélosés au sang avec quelquefois des aspects caractéristiques tels pigmentation noire (fig 22).



Figure 22 : Colonies pigmentées de noir d'agent pathogène parodontal *Porphyromonas gingivalis* sur gélose au sang.

7.3.2. Résultats d'Antibiogramme :

a) *Prevotella* :

Le genre *Prevotella*, séparé du genre *Bacteroides* depuis la fin des années 1980, est naturellement résistant aux sulfamides, à la fosfomycine, à l'acide fusidique, et aux glycopeptides.

Ce genre ne possède pas de pénicillinase constitutive, et peut donc être sensible aux pénicillines sans inhibiteurs. Comme pour le genre *Bacteroides*, des gènes de résistances aux macrolides et apparentés (Erythromycine) et aux cyclines (Tétracycline) ont été décrits.

Cette bactérie est fréquemment sensible aux associations pénicilline-inhibiteur, à la cefoxitine, aux carbapénèmes, au métronidazole et à la tygécycline. (33)

b) *Porphyromonas* :

Le genre *Porphyromonas*, lui aussi distingué du groupe *Bacteroides* depuis la fin des années 1980, est naturellement résistant à la fosfomycine et aux polymixines.

Peu de résistances ont été décrites en Europe chez les différentes espèces de *Porphyromonas*. Seule la présence d'une bêta-lactamase de type CfxA a été décrite.

Les études rapportent de très faibles taux de résistance pour l'amoxicilline, les associations pénicilline-inhibiteurs, la clindamycine et le métronidazole. Il faut cependant noter que des résultats radicalement différents ont été obtenus dans une étude Colombienne, où des taux de résistance de 20 à 25 % ont été observés pour l'amoxicilline, la clindamycine et surtout le métronidazole. (34)

NB : Un traitement antibiotique seul ne suffit pas à traiter une infection ou des anaérobies stricts sont présents. Il faudra presque toujours avoir recours au chirurgien qui devra mettre à plat les lésions, éliminer les tissus nécrosés et drainer le foyer infectieux.

CHAPITRE IV : Biofilms

1. Historique :

L'origine de la recherche en microbiologie est souvent associée aux observations d'Antone Van Leeuwenhoek qui, au XVII^e siècle et grâce à un microscope de son invention, mit en évidence la présence d'organismes microscopiques à la surface de ses dents. Bien que d'abord identifiés fixés sur un support solide, ce sont les formes libres et planctoniques des microorganismes, qui ont été les plus étudiées ; dès lors, l'essentiel des connaissances acquises résulte de travaux principalement réalisés sur ces formes, cultivées dans des milieux nutritifs liquides et agités. Quelques travaux attirent cependant l'attention sur les interactions existantes entre les microorganismes et les surfaces. En 1933, Arthur Henrici plonge des lames de microscopie en verre dans son aquarium et observe un dépôt de microorganismes qui s'épaissit progressivement (HENRICI, 1933). En 1943, Claude Zobell montre que, dans un récipient rempli de liquide, les bactéries colonisant les parois sont plus nombreuses que celles en suspension (ZOBELL, 1943). Enfin, dans les années 1980, les travaux de William Costerton mettent en évidence que l'essentiel de la biomasse microbienne est fixé sur des surfaces et constitue des populations hétérogènes englobées dans une matrice extra cellulaire riche en eau, en sucres et en protéines. Présentes dans tous les environnements et associées à des surfaces minérales, végétales (surface des feuilles) ou animales (surfaces des muqueuses, surfaces dentaires etc.), elles sont appelées biofilms. Le plus souvent inoffensifs, les biofilms jouent un rôle écologique capital et contribuent très largement au bon fonctionnement de la plupart des écosystèmes. Ils représentent également une importante source de nuisance en médecine humaine ou vétérinaire, ainsi que dans l'industrie et les environnements humains industriels, où, particulièrement tolérants à toutes sortes de stress (dessiccation, carence en nutriments, exposition aux acides, agents antibactériens, etc.), ils sont très difficiles à éliminer. L'objectif de cette revue est de définir succinctement la notion de biofilm bactérien, de présenter leurs propriétés biologiques particulières et de fournir quelques clés pour comprendre l'étendue de leur impact dans tous les environnements, ainsi que l'intérêt de la communauté scientifique pour ce mode de vie complexe dont l'étude contribue au renouveau actuel de la microbiologie (35).

2. Caractéristiques des biofilms :

Les biofilms bactériens sont généralement définis comme des agrégats de cellules bactériennes attachés à une surface et enrobés d'une matrice polymérique). Les bactéries peuvent tout aussi bien

adhérer à une surface biotique (e.g. cellules de la muqueuse) qu'à une surface abiotique (e.g. plancher ou équipement à la ferme, à l'abattoir ou à l'usine de transformation). La formation d'un biofilm se fait en plusieurs étapes selon un modèle bien établi (figure 23). La capacité de former un biofilm est maintenant reconnue comme une caractéristique propre à plusieurs microorganismes. On estime d'ailleurs que 80 % de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme d'un biofilm. (36)

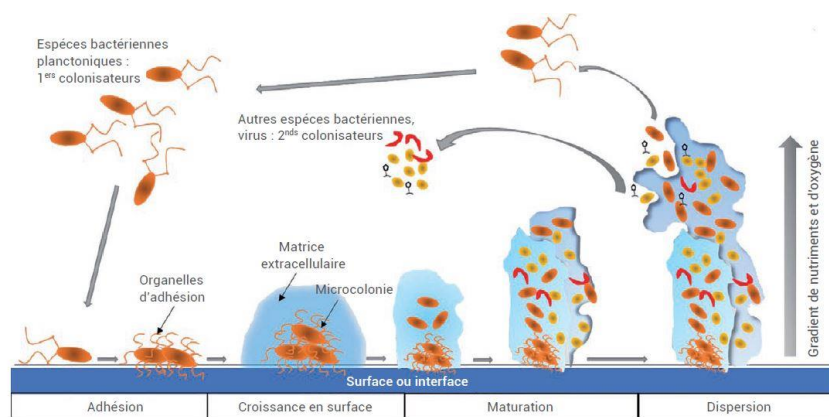


Figure 23 : Etapes de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérien.

Les biofilms bactériens isolés de divers environnements partagent des caractéristiques communes : les cellules bactériennes sont retenues ensemble par une matrice polymérique composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques; le développement du biofilm survient en réponse à des signaux extracellulaires, soit présents dans l'environnement ou produits par les cellules bactériennes; le biofilm protège les bactéries contre le système immunitaire de l'hôte, la dessiccation et les biocides (antibiotiques et désinfectants).

3. Composition de la matrice du biofilm :

La matrice du biofilm est hautement hydratée et peut contenir jusqu'à 97 % d'eau. Elle peut être constituée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, d'agents tensioactifs, de lipides, de glycolipides et de cations. La composition de la matrice varie selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance. Un des exopolysaccharides le plus souvent retrouvés est un polymère de β -1,6-N-acétyl-D-glucosamine (polyglucosamine, PGA ou PNAG). On retrouve ce polymère chez plusieurs espèces bactériennes, dont *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, *Yersinia pestis*, *Bordetella* spp. et *Actinobacillus* spp. La cellulose, un polymère linéaire de glucose, est également retrouvée fréquemment chez diverses espèces et genres bactériens, dont *E.*

coli, *Salmonella*, *Enterobacter* et *Pseudomonas*. Il existe plusieurs autres polysaccharides dont le glucane chez *Streptococcus mutans* et l'alginate retrouvé chez *Pseudomonas*. (36)

4. Résistance des biofilms à divers agents antimicrobiens :

Les biofilms retrouvés dans des environnements naturels ou industriels sont résistants aux bactériophages, aux amibes ainsi qu'aux biocides utilisés dans les procédés industriels. Comme indiqué précédemment, les biofilms permettent aux bactéries pathogènes de résister à la réponse immunitaire de l'hôte. De plus, les bactéries d'un biofilm sont généralement moins sensibles aux antibiotiques et aux désinfectants que ces mêmes bactéries sous forme planctonique. En fait, les bactéries d'un biofilm peuvent être de 10 à 1000 fois plus résistantes aux agents antimicrobiens. Plusieurs facteurs peuvent expliquer la plus grande résistance (certains auteurs préfèrent plutôt parler d'une tolérance) des biofilms aux agents antimicrobiens. Un de ces facteurs est la matrice polymérique qui agit comme barrière réduisant ou empêchant la diffusion des agents antimicrobiens. Les charges électrostatiques à la surface de la matrice polymérique peuvent aussi lier certains agents antimicrobiens. Le métabolisme des bactéries d'un biofilm joue également un rôle très important. Étant donné la faible concentration de certains nutriments et le gradient en oxygène, certaines cellules du biofilm seront peu actives métaboliquement et pourront même être sous forme dormante ; ces cellules bactériennes dormantes sont d'ailleurs probablement responsables d'une grande partie de la tolérance associée aux biofilms. La proximité spatiale des bactéries au sein d'un biofilm mature favorise probablement le transfert horizontal de gènes et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques.

La résistance élevée des biofilms aux agents anti-bactériens pourrait également reposer sur la présence d'une sous-population de bactéries résistantes, capables de résister à de fortes concentrations d'antibiotiques.

Ainsi, alors que les progrès de la médecine moderne permettent de lutter efficacement contre de nombreuses maladies infectieuses, celles qui sont liées à la présence de biofilms, échappent largement à ce type de traitements. Les antibiotiques sont en effet très peu efficaces contre les biofilms et les symptômes peuvent réapparaître une fois le traitement fini.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) demeure la mesure de référence pour déterminer la sensibilité des bactéries planctoniques à divers agents antimicrobiens. Cependant, il faut être conscient qu'il n'existe pas une bonne corrélation entre la CMI de cultures bactériennes planctoniques et la concentration de l'agent antimicrobien requise pour éradiquer un biofilm. Il est

maintenant possible de déterminer la concentration minimale d'un antibiotique pouvant éradiquer un biofilm (ou « minimal biofilm éradication concentration », MBEC). En effet, un groupe de chercheurs de l'University of Calgary a développé une technologie permettant de déterminer la sensibilité de biofilms à divers antibiotiques et désinfectants. L'appareil originalement connu sous le nom de « Calgary Biofilm Device » est maintenant appelé « MBEC Assay » et est disponible commercialement (Innovotech inc., Edmonton, AB). Son format de 96 puits, bien que ne reproduisant évidemment pas à la perfection l'environnement normal d'un biofilm ou d'un biofilm formé dans une cuve à flux continu, permet le criblage rapide d'agents antimicrobiens (seuls ou en combinaison). Ces chercheurs ont été les premiers à démontrer une augmentation de la résistance aux antibiotiques lors de la croissance sous forme d'un biofilm d'une vaste gamme de bactéries pathogènes.

5. Protection vis-à-vis du système immunitaire :

En plus de leur résistance accrue aux antibiotiques, les biofilms sont protégés vis-à-vis du système immunitaire des hôtes infectés. La taille des biofilms est tout d'abord un frein important au processus de phagocytose. Les cellules phagocytaires libèrent des enzymes qui ont très peu d'effet sur le biofilm et qui peuvent endommager les tissus. La matrice extracellulaire est également une barrière au système immunitaire de l'hôte car elle empêche la reconnaissance des antigènes bactériens par les anticorps.

6. Biofilms et infections ORL :

Le rôle des biofilms dans la persistance des infections ORL chroniques muqueuses a été reconnu pour la première fois dans l'otite moyenne. Les preuves définitives faisaient défaut jusqu'à la mise en évidence de biofilms bactériens sur la muqueuse de l'oreille moyenne des enfants, non seulement avec une otite moyenne chronique avec épanchement, mais aussi avec une otite moyenne récurrente. Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées du cholestéatome sont des formateurs avides de biofilm. Des biofilms ont été signalés dans les végétations adénoïdes d'enfants atteints de rhinosinusite chronique, contribuant à expliquer l'observation clinique selon laquelle l'adénoïdectomie peut être bénéfique pour les enfants atteints d'otite chronique ou de rhinosinusite chronique. Des études supplémentaires ont confirmé la présence de biofilms dans l'amygdalite chronique. Il a également été démontré que les biofilms sont impliqués dans les implants cochléaires infectés et les tubes de trachéotomie. (37)

7. Otite moyenne avec épanchement :

Le comportement des agents pathogènes dans l'otite moyenne aiguë s'inscrit dans assez bien avec les principes microbiologiques classiques ; les bactéries sont cultivables dans la plupart des cas, et la thérapie antimicrobienne a un effet significatif sur les symptômes aigus de douleur et de fièvre. Dans l'otite moyenne avec épanchement, en revanche, le comportement des agents pathogènes n'est pas aussi clair. Les cultures ne montrent souvent aucune croissance, l'antibiothérapie a peu ou pas d'effet sur la résolution, et la durée de la maladie est souvent prolongée. Preuve de la formation de biofilm dans l'oreille moyenne chronique l'effusion commence à faire la lumière sur nombre de ces mystères.

Dans le passé, de l'ADN bactérien a été identifié dans des épanchements de l'oreille moyenne à culture négative. Cependant, des questions restent quant à la viabilité et la pathogénicité de ces bactéries. Des études récentes sur l'ARN messager bactérien (de courte durée et nécessaires à la transcription de l'ADN) et les endotoxines bactériennes dans les épanchements de l'oreille moyenne non cultivés impliquent des biofilms dans la pathogénèse de ces infections. Un modèle animé de formation de biofilm de l'oreille moyenne a également été créé. Si les biofilms sont impliqués dans maladie chronique de l'oreille moyenne, il est logique de supposer qu'ils jouent également un rôle dans d'autres voies respiratoires supérieures chroniques maladies, telles que la sinusite, l'amygdalite et l'adénoïdite.

8. Modèles de laboratoire pour l'étude des biofilms :

❖ Comment étudie-t-on les biofilms bactériens au laboratoire ?

Les approches expérimentales classiques pour étudier les microorganismes ne sont pas adaptées à l'étude de leur mode de vie complexe en biofilms. Au cours des dernières années, les chercheurs ont donc développé différents modèles expérimentaux associant analyse moléculaire et microscopie.

8.1. Les bactéries modèles :

La majorité des espèces bactériennes étudiées en laboratoire forment des biofilms. Les bactéries modèles les plus étudiées sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Vibrio cholerae*. Ces bactéries pathogènes ou commensales à Gram négatifs sont facilement manipulables et ont permis l'identification et l'étude de nombreux facteurs moléculaires impliqués dans la formation des biofilms. Plusieurs équipes travaillent également avec la bactérie à Gram positif *Staphylococcus aureus* qui est impliquée dans de nombreuses infections nosocomiales.

8.2. Les modèles de culture :

8.2.1. Étude des biofilms en microplaques :

L'utilisation des modèles statiques de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, a permis d'avancer considérablement dans la compréhension de ce mode de vie. La technique des micro plaques multi-puits, couplée à l'analyse de mutants de transposition, a permis d'identifier de nombreux gènes impliqués dans la formation des biofilms sur des surfaces abiotiques. Un grand nombre de laboratoires utilisent ce modèle pour étudier les étapes précoces de la formation des biofilms. (38)

8.2.2. Étude des biofilms matures :

Afin d'identifier et d'étudier les facteurs moléculaires impliqués dans la maturation et la structuration du biofilm, on utilise des modèles de culture continue comme les microfermenteurs ou les chambres en flux (flow-cell), inoculés avec des souches bactériennes exprimant des protéines fluorescentes. Le développement de la structure tridimensionnelle du biofilm est ensuite suivi par microscopie confocale laser. (38)

8.3. Mode de développement d'un biofilm :

L'observation directe des biofilms par microscopie, ainsi que les nombreuses études génétiques réalisées sur les biofilms, ont conduit à un modèle de développement en cinq étapes. Après le conditionnement très rapide de la surface, les bactéries se déplacent dans le milieu liquide grâce à la force du flux, à la gravitation et/ou aux mouvements de leurs flagelles. Lorsque les bactéries sont au voisinage d'une surface, des forces d'attraction physico-chimiques interviennent et conduisent à une interaction réversible avec la surface. Dans un second temps, à mesure que les cellules se divisent, le nombre de bactéries associées à la surface augmente et l'adhésion devient irréversible. Cette transition vers une adhésion irréversible correspond à la synthèse de structures à la surface de la bactérie, qui s'accompagne d'une profonde modification du profil d'expression des gènes. Les bactéries forment alors des amas à la surface et produisent des polysaccharides extracellulaires. La troisième étape est caractérisée par la formation de microcolonies composées à la fois des bactéries initiales qui se divisent et de bactéries qui s'attachent sur le biofilm en formation. Enfin le stade de maturation correspond au développement des microcolonies et à la structuration du biofilm : les microcolonies se développent en piliers d'épaisseur variable au sein desquels les cellules sont englobées dans la matrice extracellulaire. Les espaces séparant les microcolonies deviennent les

canaux du biofilm à l'intérieur desquels les fluides nutritifs peuvent circuler. Certaines bactéries peuvent se détacher du biofilm mature et rentrer dans la phase de dissémination. Cette dernière étape permet la colonisation de nouvelles surfaces. (38)

9. Molécules pouvant interférer avec la formation du biofilm :

Il existe différentes stratégies permettant d'inhiber la formation du biofilm. Celles-ci peuvent prévenir l'adhérence initiale du microorganisme, prévenir la croissance microbienne, empêcher la communication entre les cellules bactériennes, inhiber la synthèse de la matrice polymérique ou bien dégrader cette matrice. Le criblage à haut débit de banques de composés chimiques (naturels ou synthétiques) est utilisé afin d'identifier des produits capables d'interférer avec la formation d'un biofilm ou capables de disperser un biofilm existant. Bien que la plupart de ces produits antibiofilm ne tuent pas les bactéries, elles peuvent toutefois les rendre plus susceptibles à l'action des agents antimicrobiens ou à la réponse immunitaire de l'hôte. La grande majorité de ces produits est toujours au stade expérimental. Nous donnerons ici quelques exemples démontrant la diversité des molécules antibiofilm et de leurs cibles potentiels.

Davies et Marques ont identifié une petite molécule signal (acide *cis*-2-décénoïque) produite par *Pseudomonas aeruginosa* et capable d'inhiber le développement d'un biofilm et d'induire sa dispersion. Cette molécule s'est également montrée efficace contre des biofilms produits par d'autres bactéries à Gram-négatif, à Gram-positif et par des levures. Certains acides aminés D (dextrogyres) produits par les bactéries (e.g. *Bacillus*) sont capables de disperser les biofilms produits par différentes bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif. Il a été récemment rapporté que certains polysaccharides bactériens avaient la capacité d'inhiber la formation de biofilms chez un vaste spectre de bactéries et de champignons.

La bromoageliférine, molécule d'origine marine de la famille des 2-amino-imidazoles, a démontré une activité antibiofilm chez *P. aeruginosa* et d'autres bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif. Une molécule synthétique, le 2-amino-imidazole/triazole (ou 2-AIT), a démontré une activité antibiofilm chez les bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif ainsi qu'une activité synergique avec des antibiotiques traditionnels. Truchado et coll. ont démontré que le miel de châtaignier contient un inhibiteur du *quorum sensing* pouvant réduire la formation d'un biofilm chez diverses bactéries à Gram-négatif. Une approche chémoinformatique a permis à Dürig et coll. d'identifier des produits naturels d'origine végétale (acide ellagique, esculétine et fisétine) inhibant la formation de biofilm chez *S. aureus* et *Streptococcus dysgalactiae*. Les peptides cationiques antimicrobiens peuvent

également affecter la formation du biofilm. Par exemple, le peptide LL-37, membre de la famille des cathélicidines retrouvées chez les vertébrés, peut inhiber la formation d'un biofilm chez *Francisella novicida*.

Plusieurs enzymes se sont montrées efficaces à dégrader la matrice polymérique du biofilm. Ainsi, l'alginate lyase est capable de dégrader l'alginate contenu dans la matrice du biofilm de *P. aeruginosa*. La dispersine B est une enzyme bactérienne capable de dégrader le polymère de N-acétyl-glucosamine de la matrice du biofilm de plusieurs espèces bactériennes dont *S. aureus*, *S. epidermidis* et *E. coli*. La DNase quant à elle peut hydrolyser les acides désoxyribonucléiques contenus dans la matrice de certains biofilms. Les bactériophages produisent certaines enzymes capables de dégrader les polysaccharides de la matrice du biofilm et provoquer sa dispersion. La spécificité des bactériophages pour un groupe de bactéries bien précis suggère par contre qu'un cocktail composé de plusieurs bactériophages soit nécessaire afin d'être efficace.

Finalement, l'interférence avec des signaux bactériens représentent une approche privilégiée par plusieurs chercheurs. Par exemple, la furanone (molécule extraite d'une algue marine) et des molécules analogues sont capables d'inhiber le *quorum sensing* et donc d'interférer par la même occasion avec la formation/dispersion du biofilm. Le sulfathiazole est un antibiotique pouvant interférer avec la biosynthèse de la molécule signal c-di-GMP jouant un rôle important dans la formation/dispersion de biofilm chez plusieurs espèces bactériennes. (36)

CHAPITRE V : Les infections bactériennes en ORL

1. Angine aiguë :

Le terme « d'angine » désigne une inflammation d'origine infectieuse des amygdales palatines, alors que le terme de « pharyngite » est plus large et désigne une inflammation diffuse de l'oropharynx. Cette subtilité est plus théorique que réelle puisque toute angine est accompagnée d'une pharyngite, le terme pharyngite ayant, dans l'inconscient collectif médical, une connotation virale (38).

L'angine streptococcique ne représente que 25 à 40 % des cas d'angine de l'enfant et 10 à 25% des angines de l'adulte (39). L'angine à SGA peut survenir à partir de l'âge de 3 ans ; son pic d'incidence se situe chez l'enfant entre 5 et 15 ans (40).

D'autres bactéries, en particulier d'autres streptocoques bêta-hémolytiques (notamment C et G) peuvent être en cause mais de façon plus rare ; *Arcanobacterium haemolyticum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Chlamydia pneumoniae* et *Mycoplasma pneumoniae* quoique le rôle pathogène de certaines de ces bactéries dans les angines aiguës n'est pas clairement établi. Ils ne partagent pas le risque de rhumatisme articulaire aigu (RAA) du streptocoque α -hémolytique du groupe A.

- ❖ L'angine de Vincent (association fusospirillaire), forme la plus fréquente, est favorisée par une mauvaise hygiène bucco-dentaire et touche surtout l'adulte.

Les signes cliniques associent une fièvre d'intensité modérée, une haleine fétide, et surtout une asthénie avec odynophagie latéralisée et hypersialorrhée. L'examen clinique retrouve une ulcération profonde recouverte de membranes grisâtres non adhérentes, souple au toucher, et une adénopathie sous angulo-maxillaire unilatérale. Le diagnostic est affirmé par la mise en évidence de l'association fusospirillaire à l'examen direct du prélèvement de gorge. Le traitement est la pénicilline V ou, en cas d'allergie, le métronidazole. L'éventuelle cause bucco-dentaire doit être traitée.

2. Sinusite aiguë :

La sinusite aiguë est une inflammation de la muqueuse d'une ou plusieurs cavités sinusiennes, d'origine virale ou bactérienne (41).

Les sinusites bactériennes aiguës sont une complication rare des rhinopharyngites (< 1%). Dans les sinusites maxillaires, frontales et sphénoïdales, les deux principales bactéries responsables sont *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* suivies de *Moraxella catarrhalis* et *Staphylococcus aureus*.

Dans l'ethmoïdite, la bactériologie est dominée par *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* et *Streptococcus pneumoniae*.

Les sinusites maxillaires peuvent également avoir une origine dentaire. Des bactéries anaérobies peuvent alors être impliquées, ainsi que l'*Aspergillus* en cas de migration intra-sinusienne d'amalgame dentaire. Ces sinusites ont le plus souvent une présentation subaiguë ou chronique, avec atteinte unilatérale. (42)

3. Otite :

3.1. L'otite moyenne aiguë (OMA) :

L'otite moyenne aiguë (OMA) est une inflammation aiguë d'origine infectieuse de la muqueuse de l'oreille moyenne. La contamination infectieuse provient du rhinopharynx et des cavités nasales par l'intermédiaire de la trompe d'Eustache. (43)

Dans 10% des cas, il s'agit d'une infection bactérienne qui pourra évoluer vers une otite collectée.

Au contraire, dans le cas des OMA purulentes, collectées ou perforées, 100% des infections sont d'origine bactérienne. (43)

Les principaux agents pathogènes retrouvés sont : *Streptococcus pneumoniae* (25 à 40%), *Haemophilus influenzae* (30 à 40%), *Branhamella catarrhalis* (5 à 10%).

Streptococcus pyogenes, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et les entérobactéries jouent un rôle mineur (<5%). (44)

La symptomatologie clinique peut orienter vers le germe responsable : une otite hyperalgique associée à une fièvre supérieure à 38,5 °C fait suspecter *S.pneumoniae* ; une OMA associée à une conjonctivite purulente évoque *H.influenzae*.

8.2. L'otite externe :

L'otite externe est une infection aiguë, généralement bactérienne, du conduit auditif, L'otite externe diffuse aiguë est habituellement due à des bactéries, telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, ou *Escherichia coli*. L'otite externe fongique (otomycose), généralement provoquée par *Aspergillus niger* ou *Candida albicans*, est moins fréquente. Les furoncles sont habituellement provoqués par *S. aureus* (et par *S. aureus* [MRSA] résistant à la méthicilline au cours des dernières années).

Les facteurs prédisposants comprennent :

- Blessure accidentelle dans le canal causée par un nettoyage avec des cotons-tiges ou d'autres objets.
- Allergies.
- Psoriasis.
- Eczéma.
- Dermite séborrhéique.
- Diminution de l'acidité du canal (peut-être due à la présence répétée d'eau).
- Irritants (p. ex., laque pour cheveux, colorants capillaires). (45)

4. La rhinopharyngite :

La rhinopharyngite est définie comme une atteinte inflammatoire de l'étage supérieur du pharynx (cavum) à laquelle vient s'associer de façon variable une atteinte nasale. (46)

Les bactéries retrouvées dans les sécrétions bactériennes rhinopharyngées (notamment *S. pneumoniae*, *Hæmophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, staphylocoque) font partie de la flore commensale du rhinopharynx de l'enfant. (47)

Les mêmes bactéries sont retrouvées chez l'enfant sain et chez l'enfant présentant une rhinopharyngite. Elles sont mises en évidence par le prélèvement nasopharyng.

CHAPITRE VI : Prélèvements bactériologiques en ORL

1. Introduction :

Les prélèvements bactériologiques en ORL, dédiée à la prise en charge de toute infection touchant les voies respiratoires supérieures (oreille, nez et gorge). Ces infections ORL représentent avec les infections respiratoires basses la majorité des infections communautaires, pour ces infections la prescription des antibiotiques est essentiellement probabiliste et repose sur les données épidémiologiques, donc sur la connaissance, par des études cliniques avec prélèvement bactériologique, des germes en cause et de leur sensibilité aux antibiotiques.

2. Prélèvement de l'oreille :

2.1. Généralités :

2.1.1. Matériel :

Adaptateur conique auriculaire en inox, auriculoscope à piles, Gants, écouvillon très fin, pipette pasteur stérile. (48)



Adaptateur conique auriculaire



écouvillons



Gants

Figure 24 : Matériel de prélèvement auriculaire.

2.1.2. Renseignement des patients :

Une fiche d'exploitation a été établie pour permettre la collecte des informations des patients concernant l'âge, le sexe, les antécédents et éventuellement l'examen clinique.

2.1.3. Mode opératoire :

Analyse à effectuer de préférence à distance de tout traitement antibiotique (48h) sauf urgence de diagnostic. Noter le contexte clinique (otite externe, otite moyenne aigüe, otite moyenne récidivante, prélèvement post-paracentèse, présence de drain trans-tympanique...).

Après nettoyage du conduit auditif externe à l'aide d'un premier écouvillon humide placer l'adaptateur dans le conduit auditif observer grâce à l'auriculoscope. Prélever le pus sur écouvillon (Fig 25), (ou pipette pasteur si très liquide). (48)



Figure 25 : Prélèvement d'un écoulement auriculaire.

- Le prélèvement se réalise avec deux écouvillons fins montés sur tige métallique. Le premier sert à préparer un frottis, le second à ensemer des milieux de culture.
- Désinfecter l'adaptateur dans la javel avant stérilisation.

2.1.4. Transport :

Transmission < à 2 heures à + 20°C si pas de milieu de transport

Conservation avant analyse (température ambiante)

- délai d'acheminement < 4 heures sans milieu de transport

- délai d'acheminement < 24 heures avec milieu de transport

L'horodatage du prélèvement ou du recueil, de l'acheminement et de la réception de chaque échantillon au laboratoire ainsi que l'identification de toutes les personnes qui accomplissent ces tâches sont essentiels.

2.2. Particularités :

2.2.1. Otite externe :

- Patient en position couchée, tête immobilisée s'il s'agit d'un enfant
- Eclairage direct : lampe, spéculum auriculaire si besoin
- Nettoyer le conduit avec un écouvillon sec imbibé d'eau stérile
- Ecouvillonner doucement le conduit avec les écouvillons fins
- En mettre un dans le milieu de transport et jeter l'écouvillon inutilisé. Acheminer au laboratoire dans un milieu de transport NCVP (Neuw Copan Vi-Pak Amies Gel). Conserver au frigo maximum 24 heures.

2.2.2. Otite moyenne :

- **Tympan intact** : nettoyer le conduit auditif externe avec une solution antiseptique puis collecter le liquide à l'aide d'une seringue.
- **Tympan perforé** : collecter le liquide à l'aide d'un écouvillon fin le plus près possible du tympan, après mise en place d'un spéculum d'oreille. Acheminer dans un milieu de transport NCVP à température ambiante.

2.2.3. Paracentèse :

Pour les pus de paracentèse, il est également possible d'utiliser un cathlon® (court cathéter) monté sur seringue ou sur une pompe à vide. Dans le cas de paracentèse, c'est l'oto-rhino-laryngologiste qui réalise le prélèvement.

Si son analyse ne peut être immédiate, il prépare le frottis avec le premier écouvillon puis dépose en milieu de transport (type Stuart ou Amies) l'écouvillon prévu pour les cultures.

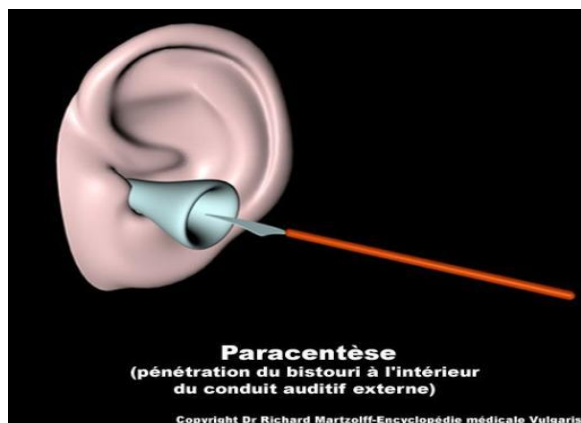


Figure 26 : Bistouri et écouvillon avec milieu de transport Amies.

3. Prélèvement nasal :

3.1. Généralités :

3.1.1. Modalités :

Analyse à effectuer de préférence à distance de tout traitement antibiotique (48h) sauf urgence de diagnostic. Noter le contexte clinique (rhinite, dépistage de staphylocoque doré...). (49)

3.1.2. Matériel :

1 ou 2 écouvillons, lames, gants

3.1.3. Mode opératoire :

Faire asseoir le patient, tête légèrement renversée en arrière Frotter soigneusement la cloison internasale en haut du nez (attention au risque de perforation). (48)

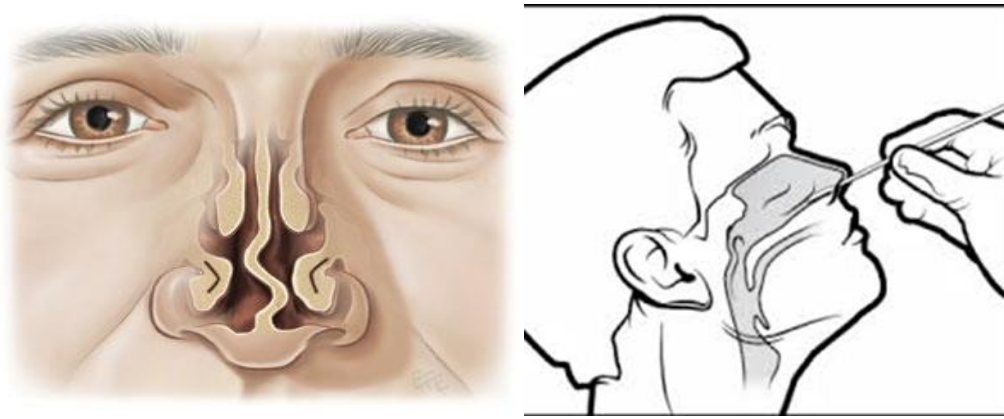


Figure 27 : La cloison inter nasale (Dr. RAY NICHALSON) et le prélèvement nasal.

Prélever avec un écouvillon adapté en allant à travers les fosses nasales selon différents sites, et casser l'écouvillon dans le milieu liquide adéquat (Fig. 27). (49)

NB : Le même écouvillon peut être utilisé pour les deux narines.

3.1.4. Transport :

Si le délai avant l'analyse dépasse 2 heures, on place les prélèvements dans un milieu de transport. Ce milieu doit en particulier convenir aux bactéries anaérobies (type Amies).

Acheminement au laboratoire dans un milieu de transport (NCVP) conservé à température ambiante maximum 24.

L'horodatage du prélèvement ou du recueil, de l'acheminement et de la réception de chaque échantillon au laboratoire ainsi que l'identification de toutes les personnes qui accomplissent ces tâches sont essentiels.

NB : En raison de l'existence de la flore commensale du rhinopharynx, ce type de prélèvement n'a d'utilité que dans le cadre des études de portage. (Bilan de staphylocoques récidivants - Portage de SARM (Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline) dans les établissements de soins - Enquêtes épidémiologiques).

3.2. Particularités :

3.2.1. Sinusites :

Pour le diagnostic d'une sinusite, l'idéal est de disposer d'une aspiration de pus de sinus au méat moyen. Ce type de prélèvement est réalisé par l'ORL. Par défaut le prélèvement se fait par écouvillonnage des fosses nasales (prévoir 2 écouvillons).

3.2.2. Prélèvement nasopharyngé et endonasal au méat moyen :

Le prélèvement nasopharyngé est à privilégier. Toutefois, s'il n'est pas possible de se rendre au nasopharynx à cause du type d'écouvillons ou de l'anatomie du patient, procéder au prélèvement nasal

- Frotter en premier le fond du pharynx avec l'écouvillon.
- Insérer délicatement à l'intérieur du nez jusqu'à ce qu'une légère résistance se fasse sentir soit au nasopharynx ou cornet moyen dépendamment du type d'écouvillons : effectuer 5 rotations.
- Retirer l'écouvillon.
- Répéter avec la narine suivante s'il ne s'agit pas d'un écouvillon floqué nasopharyngé.
- Insérer l'écouvillon à l'intérieur du tube de transport dans le liquide ; agiter l'écouvillon 5 secondes, puis essorer l'écouvillon sur les parois du tube avant de le retirer du tube.
- Jeter l'écouvillon dans le bac prévu à cet effet.
- Bien recapuchonner et visser le tube ; identifier.
- Conserver et transporter entre 2 et 8 °C. Acheminer au laboratoire en moins de 48 h.
- Congeler les échantillons au-delà de ce délai. (6)

4. Prélèvement de gorge :

4.1. Généralités : Il doit être réalisé avant toute antibiothérapie locale ou générale.

4.1.1. Matériel :

Abaisse-langue en bois à usage unique, écouvillons, gants, lames. (48)

4.1.2. Mode opératoire :

Appuyer à la base de la langue pour découvrir la gorge. Prélever au niveau des endroits inflammatoires (points blancs) ou en périphérie des fausses membranes (48)

L'émission du son "aaah" par le patient a pour but de diminuer le réflexe nauséux. (50)

On procède à l'écouvillonnage des amygdales (ou de l'amygdale atteinte en cas d'amygdalite unilatérale) ou, en leur absence, des piliers du voile du palais et de la paroi postérieure du pharynx (Fig 28).

On réalise deux écouvillons dont l'un sert à effectuer extemporanément un étalement sur lame, l'autre étant destiné à la mise en culture.

4.1.3. Transport :

Si la mise en culture est différée de plus de 2 heures, l'utilisation d'un milieu de transport de type Stuart ou Amies est nécessaire. (50)

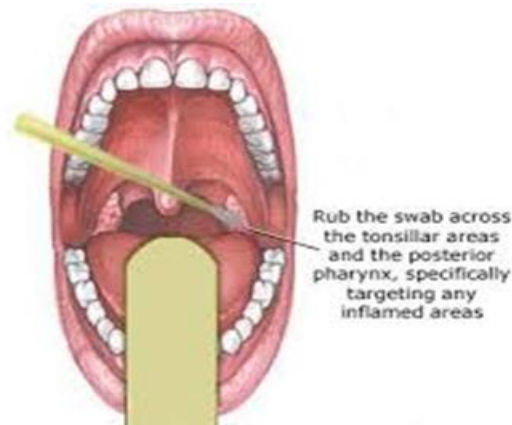


Figure 28 : Prélèvement de la gorge par écouvillonnage.

L'horodatage du prélèvement ou du recueil, de l'acheminement et de la réception de chaque échantillon au laboratoire ainsi que l'identification de toutes les personnes qui accomplissent ces tâches sont essentiels.

NB :

- Il n'est pas indispensable d'être à jeun, sauf pour le nourrisson.
- Ne pas effectuer de prélèvement s'il vient de boire un biberon.
- Ne pas effectuer le prélèvement en position couchée. (49)

4.2. Particularités :

- ❖ **Le phlegmon péri-amygdalien :** ponctionné au travers le pilier antérieur à l'aide d'une aiguille fine qui aspire le pus, ce qui permet un prélèvement bactériologique du pus. Si la guérison tarde ou si l'abcès ne peut être vidé au moyen d'une aiguille, le phlegmon est incisé au travers le pilier antérieur, l'ouverture est agrandie avec une pince pour faciliter l'évacuation de la collection purulente. (Fig 29)

NB : Si nécessaire, cette intervention sera répétée.

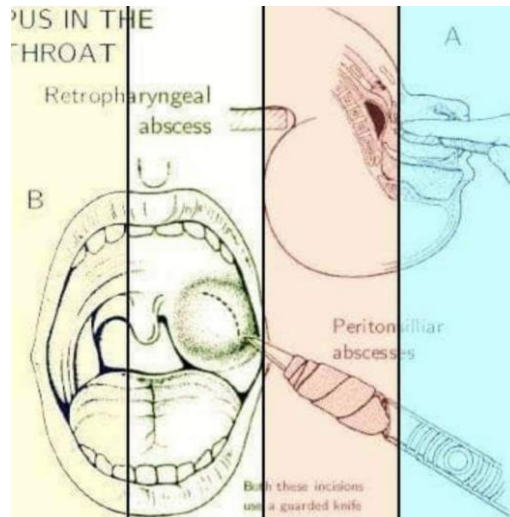


Figure 29 : Ponction exploratrice suivie d’une incision d’un phlegmon péri-amygdalien.

Quelques **points particuliers**, fonction du contexte, sont à signaler :

- En présence d'une **ulcération** ou d'un **exsudat**, le prélèvement doit s'effectuer à leur niveau.
- Lors d'une suspicion de **diphthérie**, le prélèvement doit porter sur la périphérie des fausses membranes.
- Pour la recherche de **N. gonorrhoeae**, si la mise en culture ne peut être immédiate, l'utilisation d'un milieu de transport de type Stuart ou Amies est indispensable,
- Pour la recherche de **Candida**, le prélèvement s'effectue au niveau de la langue, du palais et de la face interne des joues. **(50)**
- Écouvillon sec ou, au mieux, écouvillon de type Culturette® EZ II adressé en bactériologie en précisant la mention “prélèvement pharyngé” et le contexte clinique (la seule indication “**angine**” induit une recherche de streptocoques β -hémolytiques du groupe A : préciser si suspicion d’angine de Vincent ou de diphthérie).
- Écouvillon nasal associé si suspicion de **diphthérie**. Délai de transport : < 4 heures, sachant que plus le délai est court et plus on a de chances de récupérer les germes fragiles (pneumocoque, Haemophilus, etc.). **(51)**

NB : Au cours des angines aiguës, la prescription de l'examen cyto-bactériologique d'un prélèvement de gorge est devenu rare.

4.3. TDR (Test de Diagnostic Rapide) :

4.3.1. Introduction :

Quinze ans après leur apparition, les TDR sont intégrés dans le schéma de prise en charge des angines aux Etats-Unis. Réalisables au cabinet du médecin, ils permettent, dans la quasi-totalité des cas, de poser le diagnostic d'angine Streptococcique en quelques minutes.

4.3.2. Principes généraux de TDR :

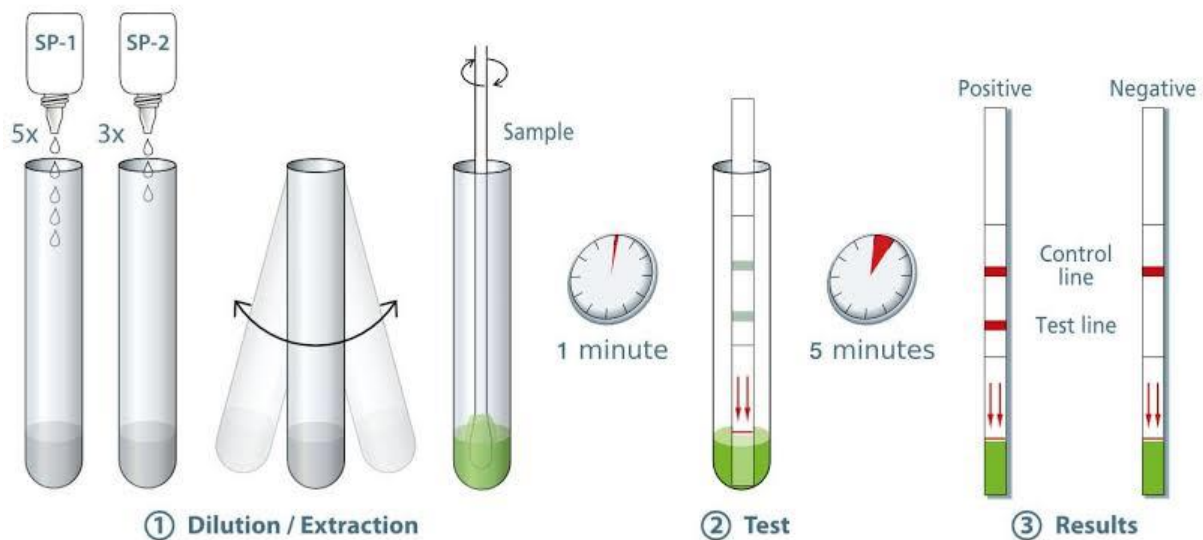


Figure 30 : Test de diagnostic rapide.

Le principe des TDR repose sur la détection d'un antigène spécifique : un polysaccharide constituant de la paroi bactérienne (ou plus rarement une enzyme), spécifique du SGA. Cette technique dérive de procédures utilisées pour le groupage des colonies de streptocoques beta-hémolytiques isolés après culture. La difficulté d'appliquer ces méthodes directement au niveau du produit pathologique : le prélèvement de gorge. Après extraction du prélèvement, l'antigène est mis en présence d'anticorps spécifiques ; la réaction antigène-anticorps est ensuite visualisée par différentes méthodes. L'une des premières conditions pour ces tests est que l'antigène cible soit soluble et bien accessible dans la solution qui sera mise en contact ultérieurement avec les anticorps. L'antigène spécifique de groupe est situé à l'intérieur de la paroi bactérienne et recouvert par la capsule. Au niveau du produit pathologique, le problème est encore plus complexe puisque la bactérie se trouve dans les sécrétions pharyngées qui renferment d'autres bactéries, des leucocytes, des débris cellulaires et des mucines. Plusieurs techniques ont été développées pour extraire cet antigène d'un prélèvement de gorge : hydrolyse par des acides, extraction par des solvants, enzymes lytiques.

La méthode la plus couramment employée est la dissolution par l'acide nitrique. Un inconvénient de cette méthode est la création, dans le milieu, d'un pH incompatible avec une réaction antigène-anticorps ; il est donc nécessaire d'ajouter un réactif pour restaurer un pH optimal avant la mise en présence des anticorps. Les anticorps sont obtenus par immunisation de la souris ou du lapin, avec des antigènes du SGA traités par la trypsine pour bien exposer le déterminant polysaccharidique. La spécificité de ces anticorps permet de distinguer des antigènes aussi proches que les déterminants des streptocoques des groupes C qui ne diffèrent que par la substitution d'un galactose en glucose.

La visualisation de la réaction antigène-anticorps peut se faire grâce à différentes techniques : agglutination de particules de latex pour les premiers tests commercialisés, techniques immuno-enzymatiques et enfin, plus récemment, techniques immuno-optiques. Ces deux derniers types de tests sont plus sensibles, plus faciles à réaliser et à lire. La mise en évidence d'un complexe antigène-anticorps par ces techniques se fait grâce à la prise en "sandwich" de l'antigène entre deux anticorps : l'un des deux anticorps est fixé sur un support solide ; c'est l'anticorps de capture, l'autre est conjugué à un marqueur ; c'est l'anticorps de détection.

Les marqueurs les plus largement utilisés sont des enzymes capables de catalyser la conversion d'un substrat incolore en un produit coloré ; les plus usuelles sont la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline et la bêta-galactosidase. Dans les premiers tests immuno-enzymatiques commercialisés, une phase de rinçage, capitale pour les performances du TDR, était nécessaire pour éliminer les anticorps marqués non liés. Pour les TDR immuno-enzymatiques les plus récents, cette phase délicate a été supprimée, ce qui a simplifié leur réalisation.

Le Testpack Strep A ® (Abbott) en est un. Sa réalisation demande 4 manipulations et moins de 6 minutes. Les résultats apparaissent sous la forme d'un signe "+" si le test est positif, un signe "-" si le test est négatif. La bague verticale correspond au test du patient, l'horizontale au contrôle assurant que le test a été bien réalisé. Les tests immuno-optiques, Strep A OIA ® (Biostar), sont les tests les plus récemment commercialisés. La technique immuno-optique permet la détection visuelle directe de tout changement physique dans l'épaisseur d'un film fin.

A l'état de base, une lumière blanche réfléchiée à travers le film donne à celui-ci une couleur dorée. Si une réaction d'agglutination a lieu entre antigène et anticorps, cela entraîne une augmentation d'épaisseur du film. Le chemin optique d'une lumière à travers celui-ci est modifié, ce qui provoque un changement de couleur du doré au violet. Au centre du test, se situe un contrôle positif, matérialisé par un point violet qui confirme la bonne procédure du test. Une phase de rinçage est nécessaire et constitue l'un des principaux inconvénients.

De plus, ils sont plus longs et réalisés (15 minutes) et nécessitent 11 manipulations. L'Étude de la performance des TDR se fait par comparaison à la culture qui constitue la méthode de référence. Cette performance s'évalue sur quatre paramètres : sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive, valeur prédictive négative. (52)

Leur bonne spécificité autorise à traiter une angine à la seule constatation d'un test positif. En revanche, leur sensibilité variable (en moyenne 80 à 90 %) impose la réalisation d'une culture de contrôle si le test est négatif et si le sujet est susceptible de développer un rhumatisme articulaire aigu.

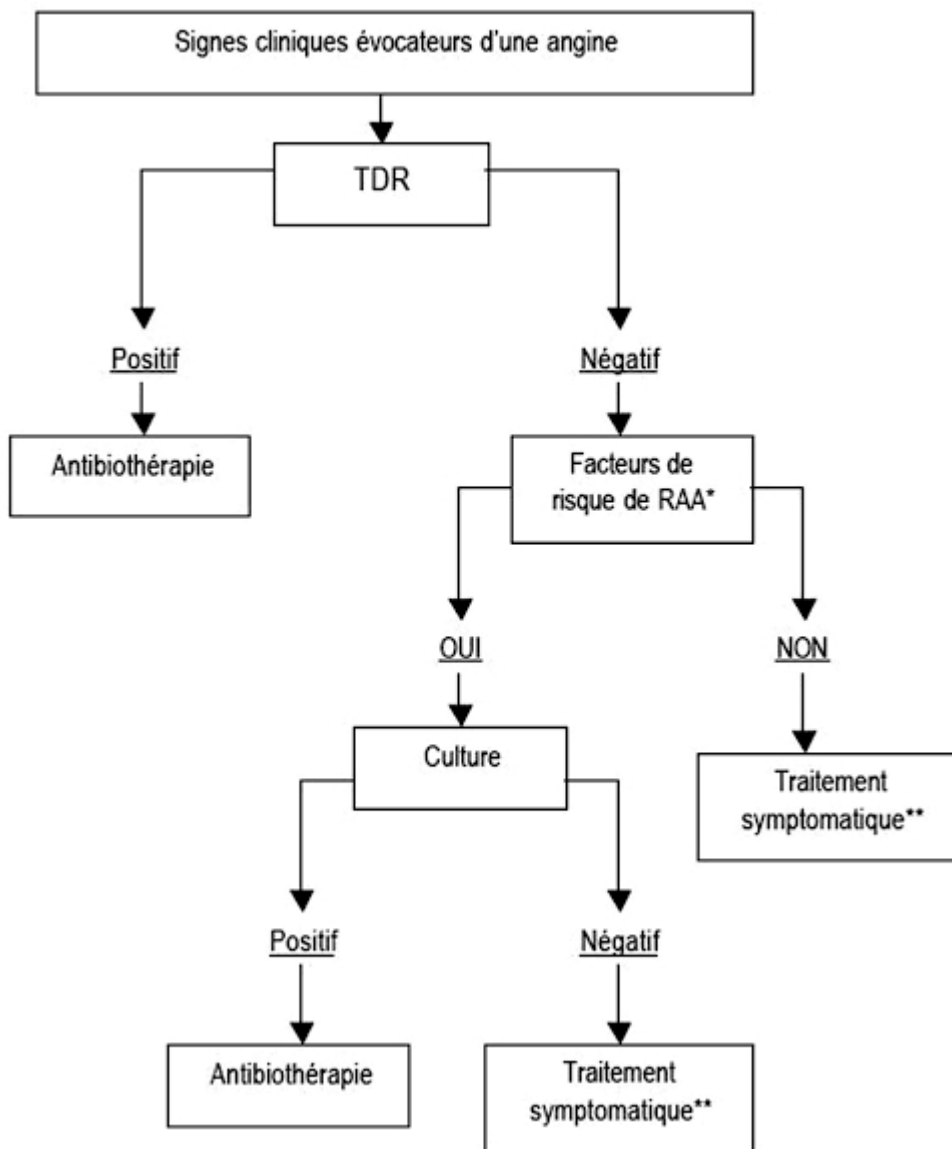


Figure 31 : Signes cliniques évocateurs d'une angine.

4.3.3. Les inconvénients de TDR par apport de la culture systématique :

Le premier inconvénient est la perte d'information épidémiologique. Si les TDR étaient amenés à remplacer complètement les cultures dans la prise en charge des angines, certaines informations épidémiologiques seraient perdues : autres espèces pathogènes, détection de sérotype de SGA très "rhumatogène" et surtout sensibilité aux antibiotiques. Ne rechercher que les SGA par un TDR laisse la crainte de ne pas traiter une angine due à une autre bactérie. Dans les résultats des prélèvements de gorge en effet, on signale souvent la présence de staphylocoques dorés, d'*Haemophilus influenzae*, d'entérobactéries ; mais leur rôle pathogène reste très discutable. (52)

4.3.4. Défauts de la sensibilité de TDR :

- **Le nombre de colonies de SGA**

Dans de nombreuses études, la variation de la sensibilité en fonction du degré de positivité des cultures a été évaluée ; les tests faussement négatifs correspondaient souvent à des cultures comportant peu de colonies de SGA. Gerber a recensé 5 études sur des tests au latex ou une telle classification avait été faite. Sur les résultats globaux, la sensibilité variait de 83 à 95 % ; si l'on ne prenait pas en compte les cultures faiblement positives (+), la sensibilité augmentait pour atteindre 95 à 100 %. Dale a calculé la sensibilité de deux TDR en fonction du nombre de colonies, il confirme la variation de la sensibilité en fonction de l'importance de l'inoculum. Il existe de nombreuses discussions sur la signification de ces cultures faiblement positives : correspondent-elles ? A des patients simplement porteurs ou bien réellement infectés par le SGA ? Pour la plupart des auteurs le nombre de colonies retrouvés sur une culture ne permet pas de distinguer de façon suffisamment fiable les sujets porteurs des sujets infectés.

- **La qualité du prélèvement :**

C'est un des éléments essentiels pour la réalisation du test et de la culture. Il est obtenu en frottant l'écouvillon sur les amygdales et la paroi postérieure du pharynx sans toucher, si possible, le reste de l'oropharynx ni la cavité buccale. Si le prélèvement n'est pas réalisé dans des conditions optimales, la distribution des germes à la surface de l'écouvillon, ou sur chaque tampon en cas de double prélèvement, peut ne pas être homogène et donner des résultats discordants. (52)

4.3.5. Conclusion :

L'attitude consistant à traiter toutes les angines dans l'éventualité d'une origine streptococcique conduit une surconsommation d'antibiotiques. L'utilisation des TDR ne peut se concevoir que si elle a

comme objectif de diminuer la prescription d'antibiotiques dans cette affection. Ceci pourrait servir de "starter" à une diminution globale de la consommation d'antibiotiques dans l'ensemble des infections ORL en montrant aux praticiens et aux familles que sans antibiotique la grande majorité de ces infections évoluent vers la guérison. A notre sens, l'intégration systématique ou quasi systématique des TDR dans la prise en charge des angines du jour au lendemain dans notre pays est une illusion. Par contre, il paraît souhaitable de favoriser la diffusion de ces tests et que les médecins qui le désirent puissent y avoir librement accès dans l'objectif de mieux contrôler leur prescription antibiotique. Cependant deux faits demeureront :

- Aucun test de diagnostic rapide ne sera (tant que les SGA resteront sensibles aux bêta-lactamines) aussi sensible que la prescription systématique d'une bêta-lactamine. Par contre, certains sont déjà aussi sensibles qu'un traitement par un macrolide et tous sont plus spécifiques qu'un traitement antibiotique systématique.
- Aucun test de diagnostic rapide ne sera aussi rapide que la prescription d'un antibiotique sur une ordonnance. (52)

CHAPITRE VII : Examens bactériologiques

1. Introduction :

L'examen bactériologique est un type d'analyse médicale qui consiste à prélever un échantillon de sécrétion corporelle pour en analyser la teneur bactériologique au microscope. L'objectif est de mettre en évidence certaines bactéries responsables d'une pathologie infectieuse ou de surveiller l'état d'une maladie.

2. Examen bactériologique des prélèvements :

Prélèvements en fonction du site de l'infection ORL :

a. Angines et rhinopharyngites : écouvillonnage des amygdales et/ou du rhinopharynx

b. Sinusites : liquide de drainage sinusien

c. Otites moyennes : Liquide de paracentèse ou d'otorrhée si perforation tympanique

d. Otites externes : écouvillonnage du conduit auditif externe

2.1. Schéma de la démarche : La démarche classique de l'analyse effectuée au laboratoire pour la mise en évidence d'une bactérie à partir d'un prélèvement est schématisée à la (figure 32).

2.2. Examen microscopique : L'analyse d'un prélèvement effectué dans un but diagnostique est en règle générale une analyse à la fois cytologique et bactériologique. Ainsi, l'examen microscopique est une étape clé dans la démarche diagnostique des infections bactériennes.

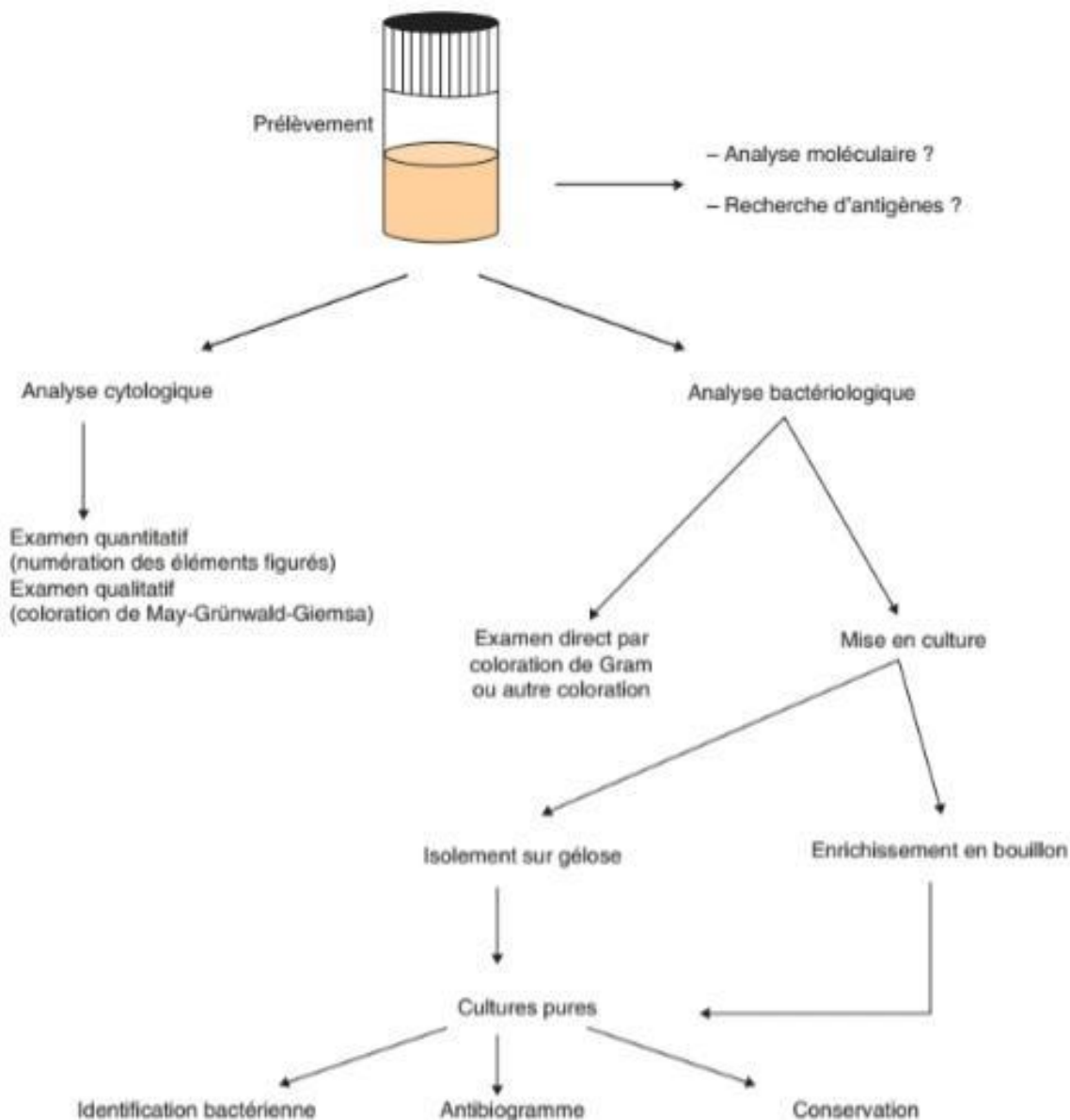


Figure 32 : Schéma général de la démarche de l'analyse bactériologique.

2.2.1. Analyse cytologique

L'analyse cytologique doit répondre à un ou deux objectifs en fonction de la nature de l'échantillon. Il peut s'agir d'une analyse quantitative qui va permettre de répondre en nombre d'éléments figurés par unité de volume (millimètre cube ou microlitre, millilitre). Cette numération est effectuée pour les prélèvements de nature liquide (liquides céphalorachidiens, urines, liquides articulaires, liquides pleuraux, etc.). Une analyse qualitative précisant la nature des éléments figurés observés sera effectuée sur la plupart des prélèvements précédemment cités lorsqu'une réaction cellulaire aura été

mise en évidence. Cette analyse qualitative sera quant à elle également effectuée pour les prélèvements de nature solide (biopsies, tissus, écouvillonnages, etc.). Lorsque des éléments figurés seront présents, la richesse en ces éléments sera évaluée (rares, présence, nombreux) et leur nature sera précisée.

Dans le cas particulier des prélèvements respiratoires, l'appréciation de la qualité du prélèvement sera fondée sur une évaluation quantitative du nombre de leucocytes et de cellules épithéliales par champ microscopique.

2.2.2. Analyse bactériologique :

❖ Examen microscopique bactériologique :

L'examen microscopique en bactériologie peut être effectué sans coloration de l'échantillon par observation directe entre lame et lamelle (technique de l'état frais), ou bien après coloration de l'échantillon, ou encore après réaction d'immunofluorescence. Cet examen renseigne sur la présence de bactéries confirmant l'origine bactérienne d'une infection (morphologie, propriétés tinctoriales particulières après coloration de Gram ou coloration de ZiehlNeelsen), ce qui représente un élément majeur pour une prise en charge thérapeutique adaptée. Ainsi, cet examen oriente sur une famille de bactéries ou un genre bactérien, permettant d'adapter ou de modifier une antibiothérapie.

En fonction du prélèvement ou du contexte clinique, il peut dans certains cas, en quelques minutes, identifier de façon quasi certaine un pathogène.

• Examen direct à l'état frais :

Les méthodes fondées sur la technique de l'état frais correspondent à l'observation d'un matériel biologique ou d'une suspension bactérienne entre lame et lamelle sans fixation préalable du matériel par la chaleur ou l'alcool. Le but de cette étape est de déterminer la forme des bactéries ainsi que le type de leur mobilité.

L'état frais est réalisé comme suit : une petite goutte d'eau physiologie stérile est déposée avec une pipette Pasteur au centre d'une lame stérile. Une partie d'une colonie bactérienne pure et prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée et dissociée dans la goutte d'eau physiologique.

Une lamelle stérile est ensuite appliquée sur la goutte de manière à éviter la formation des bulles d'air. Puis l'observation se fait au microscope optique à l'objectif 40. (53)

• Examen microscopique après coloration :

Les techniques les plus communément utilisées au laboratoire de bactériologie médicale font appel à des colorations. La préparation est fixée sur une lame puis colorée. Plusieurs types de coloration

existent. Les colorations non différentielles, anciennes, peu utilisées en pratique, colorent toutes les bactéries de la même façon sans distinction, si ce n'est qu'elles permettent de mieux visualiser les morphologies bactériennes et de préciser les agencements des bactéries les unes avec les autres. Les colorations différentielles distinguent les bactéries en fonction de la structure de leur paroi. Deux colorations de référence sont employées, la coloration de Gram distinguant bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif, et la coloration de Ziehl-Neelsen mettant en évidence les bacilles acido-alcool-résistants. Certaines colorations spéciales seront ensuite abordées. Coloration non différentielle.

a) **Coloration simple** : Le frottis fin est traité par un seul colorant basique (bleu de méthylène). Cette technique est simple et rapide, peu courante, à l'exception de l'examen de pus urétral pour la recherche de gonocoque : diplocoques en grain de café intracellulaires. (54)

b) **Coloration différentielle** :

❖ **Coloration de Gram** :

La coloration de Gram est une coloration différentielle permettant de classer les bactéries en deux groupes selon la structure de leur paroi : Gram positif et Gram négatif. En effet, quand la bactérie est mise au contact du violet de gentiane et ensuite soumise à l'action du lugol, il se forme un complexe colorant qui colore en violet tout le cytoplasme des bactéries. Cependant lorsque ces bactéries colorées sont lavées à l'alcool, seules celles à Gram négatif (présence de membrane externe et couche mince de peptidoglycane), qui perdent leur coloration et prennent la couleur rose après la coloration par la fushine. Les bactéries à Gram positif possèdent une couche épaisse de peptidoglycane qui empêche la pénétration de l'alcool et donc restent en couleur violette. Le protocole est le suivant :

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile à l'aide d'une pipette Pasteur stérile sur une lame bien propre.
- Prélever une colonie bien isolée avec une pipette Pasteur boutonnée et la dissocier dans la goutte d'eau. Le frottis obtenu est séché dans l'étuve.
- Recouvrir totalement avec du violet de gentiane pendant 1 min, rincer ensuite à l'eau de robinet. Le frottis est ensuite recouvert de lugol pendant 1 min.
- Décolorer par l'alcool et laver rapidement à l'eau du robinet. Le frottis est enfin recouvert de fushine pendant 30 secondes, puis lavé à l'eau, séché à température ambiante et fixé au bec benzène.
- Examiner le frottis au microscope optique à l'objectif 100 et à l'immersion à l'huile de cèdre. (55)

NB : L'examen microscopique des colorations de Gram demeure la première Analyse diagnostique dans le traitement des échantillons en microbiologie. Le résultat d'une coloration de Gram sur un échantillon clinique peut avoir un Impact important pour le traitement du patient. Il est alors primordial de standardiser l'évaluation semi-quantitative des cellules et des bactéries observées. Pour contrôler la qualité de la coloration de Gram, les critères suivants devraient être adoptés :

- ❖ Les technologistes médicaux qui effectuent la coloration de Gram doivent Avoir suivi une formation et bénéficier d'un soutien adéquat, et ils doivent Tenir à jour leurs connaissances pratiques ainsi que leur expertise en Utilisant des lames ayant des coefficients de difficulté variables, par exemple :
 - un frottis mince : LCR.
 - un frottis épais : expectorations, sécrétions vaginales.
 - une souche à Gram positif facilement décolorable : Lactobacille.
 - une souche à Gram négatif difficilement décolorable : Acinetobacter.
 - Les réactifs pour la coloration de Gram doivent être contrôlés à l'aide d'une souche de contrôle connue positive et négative, pour chaque nouveau lot de colorant et chaque semaine. **(56)**

CHAPITRE VIII : Culture et isolement des bactéries

Les bactéries d'intérêt médical les plus fréquemment responsables d'infection arrivent à se développer sur des milieux de culture. Ces milieux de culture sont indispensables à la multiplication bactérienne, ce qui permet par la suite une identification bactérienne ainsi que l'étude de la sensibilité aux antibiotiques lorsque la bactérie est isolée en culture pure.

1. Milieux de culture :

Les milieux de culture utilisés en bactériologie doivent contenir les éléments nécessaires à la survie et à la multiplication des bactéries, et doivent posséder les propriétés physicochimiques convenant à cette culture (pH en particulier). Les milieux sont de différents types. Il s'agit soit de milieux de base, permettant la croissance d'espèces non ou peu exigeantes, soit de milieux enrichis par l'addition de diverses substances (sérum, œuf, sang, vitamines, etc.) qui autorisent la croissance de bactéries plus exigeantes. Il peut s'agir également de milieux rendus sélectifs par addition d'antibiotiques, d'antiseptiques ou de colorants qui vont inhiber les bactéries sensibles à ces composés.

1.1. Milieux de base :

Appelés aussi milieux usuels non sélectifs, on regroupe sous ce vocable tous les milieux ne contenant aucune molécule inhibitrice. Ils sont en général de préparation assez simple et généralement peu coûteuse, ces milieux contiennent une base nutritive constituée de molécules azotées (acides aminés, molécules organiques diverses...) provenant de l'hydrolyse de produit d'origine vivante (animale, végétale, mycélienne) comme les peptones, les extraits de viande ou de levure exemple **gélose et Bouillon nutritif, gélose et Bouillon Muller-Hinton**.

1.2. Milieux d'enrichissement :

Ces milieux permettent de favoriser une croissance bactérienne à partir de prélèvements paucimicrobiens. Il s'agit en général de milieux liquides riches permettant le développement d'un maximum de bactéries, y compris des milieux permettant le développement de bactéries anaérobies strictes. Parmi les plus utilisés, on trouve le bouillon nutritif, le milieu de Schaedler, le milieu cœur-cerveau (brain heart infusion [BHI]), le milieu de Rosenow. Des milieux d'enrichissement peuvent également être utilisés pour favoriser le développement de certaines bactéries de façon préférentielle aux bactéries présentes dans des flores. Il s'agit dans ce cas de milieux d'enrichissement sélectifs.

Ainsi, la recherche par exemple de bactéries entéropathogènes dans les coprocultures utilise ces milieux (milieu de Muller-Kauffmann, eau peptonée alcaline, etc.). Le milieu de Muller-Kauffmann ou bouillon de base au tétrathionate est un milieu d'enrichissement sélectif pour les salmonelles contenant de la bile et du vert brillant.

1.3. Milieux d'isolement :

Les milieux d'isolement, contrairement aux précédents, sont des milieux solides qui permettent d'obtenir des colonies isolées permettant d'effectuer les tests d'identification ou d'étudier la sensibilité aux antibiotiques des bactéries.

1.3.1. Géloses de base :

Les géloses de base sont constituées par les géloses nutritives ordinaires et les géloses tryptone soja (ou trypticase soja [TS]). Ces milieux permettent la culture des bactéries non exigeantes.

La gélose de base Columbia est un milieu hautement nutritif permettant la culture des germes exigeants.

1.3.2. Géloses au sang frais :

Les géloses au sang frais, en général sang de mouton ou de cheval, sont obtenues en ajoutant à des géloses ordinaires du sang frais dans des proportions de 5 à 10 % en volume. Ce sont des géloses qui permettent la croissance des bactéries exigeantes. Les géloses au sang sont en général fabriquées à partir soit de géloses TS additionnées de sang de cheval, soit de gélose de base Columbia, plus riches, additionnées de sang de mouton. (57)

1.3.3. Géloses au sang cuit :



Figure 33 : Gélose a sang cuit (Chocolat).

Les géloses au sang cuit, appelées géloses « chocolat », permettent de libérer par la cuisson des facteurs de croissance supplémentaires. Néanmoins, ces géloses sont souvent supplémentées en vitamines. Elles permettent la croissance des bactéries exigeantes, en particulier celles du genre *Haemophilus* (fig.33.)

1.3.4. Géloses sélectives :

a. Pour *Pseudomonas* : Les géloses de base sont rendues sélectives par addition de cétrimide, éventuellement associé à l'acide nalidixique.

b. Pour l'isolement des staphylocoques :



Figure 34 : Milieu de chapman

Le milieu de Chapman (fig 34) est un milieu au mannitol qui est sélectif pour les staphylocoques à l'exception de quelques espèces halophiles appartenant à d'autres genres bactériens.

c. Pour l'isolement de *Staphylococcus aureus*, des *Streptocoques* hémolytiques et des *Entérocoques* :

Les géloses Columbia ANC (acide nalixidique-colistine) ou CAP (colistine-aztréonam) sont des géloses de base Columbia rendues sélectives par addition d'antibiotiques. Elles sont en particulier utilisées à partir de prélèvements rhinopharyngés.

1.3.5. Géloses pour étude de la sensibilité aux antibiotiques :

Des géloses adaptées et recommandées pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries ont également été développées. La gélose la plus communément utilisée est la gélose de Mueller-Hinton (MH). Cette gélose MH peut être supplémentée en sang frais ou en sang cuit lorsque les bactéries testées nécessitent ces milieux enrichis. La gélose HTM (Haemophilus Test Medium) a été développée pour tester la sensibilité des souches d'Haemophilus aux antibiotiques. Ce milieu est supplémenté en hémine et en NAD indispensables à la croissance de *H. influenzae*. (18)

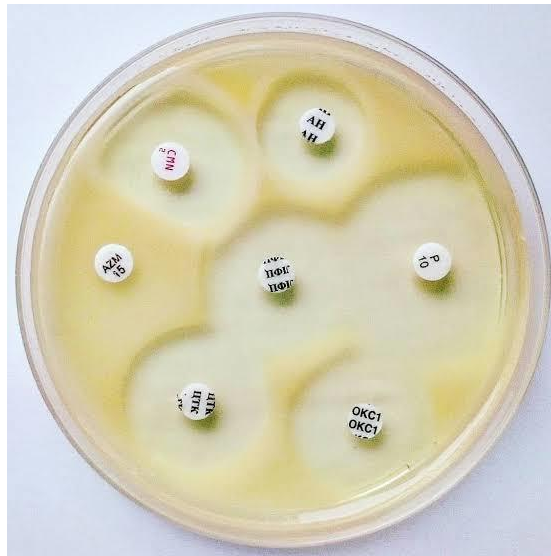


Figure 35 : Antibiogramme sur gélose de MH

2. Identification biochimique :

Elle se réalise par un test biochimique API Staph (bioMérieux) et/ou API 20 E. La galerie API comprend 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique et d'un logiciel d'identification (fig.36).

Microtube contenant des substrats

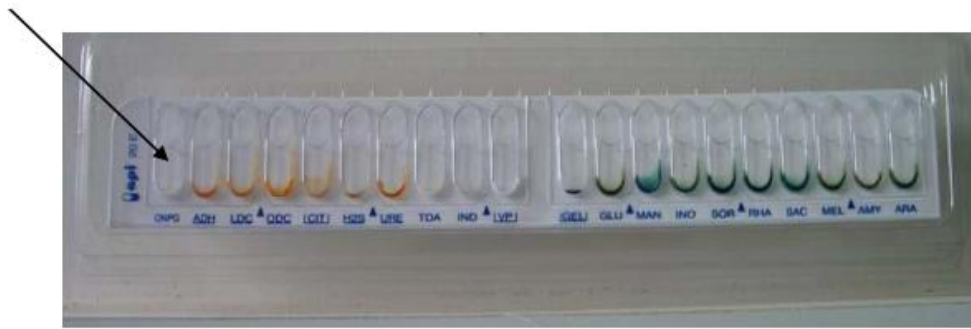


Figure 36 : La galerie Api 20 E pour l'identification des entérobactéries Microtube contenant des substrats.

3. Tests biochimiques utilisés dans l'identification des bactéries (Galerie classique) :

En fonction de l'aspect morphologique des colonies bactériennes, de la morphologie des bactéries après coloration, de leurs caractéristiques de croissance (vitesse, type respiratoire, exigences culturales, etc.), de leur pigmentation, de leur odeur, de leur caractère hémolytique sur gélose au sang, le bactériologiste s'oriente sur une famille bactérienne ou un genre bactérien en particulier. Il peut le cas échéant compléter sa présomption de genre bactérien par des tests d'orientation (type respiratoire, catalase et oxydase). Un certain nombre d'épreuves biochimiques de base sont utilisées dans l'élaboration des galeries d'identification des souches bactériennes. Après avoir rappelé les tests d'orientation, un certain nombre d'épreuves métaboliques seront détaillées. Celles-ci concernent principalement le métabolisme glucidique, le métabolisme protéique et le métabolisme lipidique. Des tests d'agglutination viennent compléter l'identification bactérienne dans certains cas. **(18)**

4. Principaux tests d'orientation :

4.1. Étude du type respiratoire :

L'étude du type respiratoire d'un micro-organisme permet de définir ses rapports avec l'oxygène (certaines bactéries nécessitent O₂, d'autres l'absence d'O₂). La détermination du type respiratoire est essentielle pour l'identification de la famille ou du genre auquel appartient la bactérie. (Fig 37)

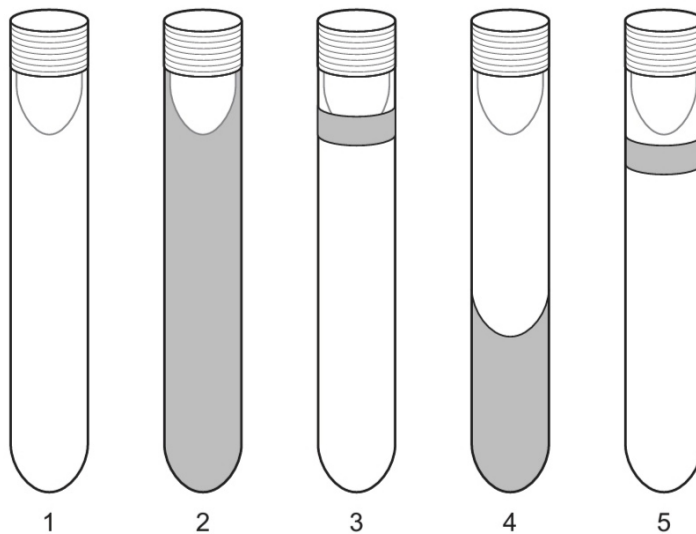


Figure 37 : Étude du type respiratoire bactérien sur gélose viande-foie.

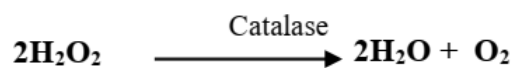
- Tube 1 : tube non ensemencé.
- Tube 2 : croissance sur toute la hauteur du tube, type respiratoire aéroanaérobie (ex. : *Escherichia coli*).
- Tube 3 : croissance dans la zone supérieure du tube, type respiratoire aérobie strict (ex. : *Pseudomonas aeruginosa*).
- Tube 4 : croissance dans la zone profonde du tube, type respiratoire anaérobie strict (ex. : *Clostridium* spp.).
- Tube 5 : croissance dans la zone intermédiaire aéro-anaérobie du tube, type respiratoire microaérophile (ex. : *Campylobacter* spp.).

4.2. Recherche de la catalase :



Figure 38 : Réaction de catalase positive (par exemple *S. aureus*).

Certaines bactéries ont la faculté de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En présence d'une bactérie productrice de catalase, on observe à partir d' H_2O_2 une libération d'oxygène gazeux selon la réaction :



Lecture ; la présence d'une catalase se traduit, en quelques secondes, par la formation de bulles d'oxygène (une effervescence (dû à un dégagement de dioxygène) signe la présence d'une catalase). Si rien n'est observable, la bactérie ne possède pas l'enzyme.

4.3. Recherche d'un cytochrome oxydase :

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à Gram négatif (fig .39.)

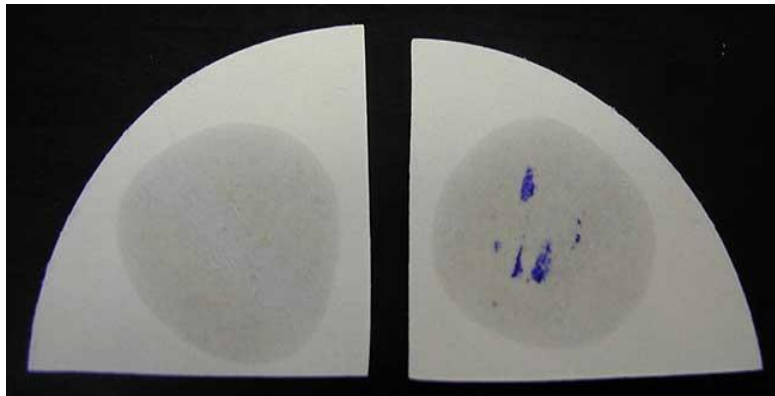


Figure 39 : À droite, réaction d'oxydase positive (par exemple *P. aeruginosa*). À gauche, réaction négative (par exemple *E. coli*).

4.4. Étude des accepteurs minéraux, recherche d'une nitrate réductase :

Les bactéries, lorsqu'elles possèdent une nitrate réductase, sont capables de transformer les nitrates (NO_3^-) en nitrites (NO_2^-) et éventuellement en azote (N_2) (fig. 40).

Un bouillon nitraté est ensemencé avec la bactérie à étudier et incubé 18 heures à 37°C (fig. 40 tube 1). Après incubation, 3 gouttes d'une solution d'acide sulfanilique (Griess A) et 3 gouttes d'une solution de naphtylamine (Griess B) sont ajoutées au bouillon. Si une coloration rose fugace apparaît (fig.40 tube 2), les nitrates ont été réduits au stade nitrites. En l'absence de coloration, soit les nitrates ont été réduits au stade azote, soit la bactérie ne possède pas de nitrate réductase. L'addition de poudre de zinc (réactif de Zobell, qui va réduire les nitrates en nitrites) permet de trancher. Si une coloration rose apparaît, alors la bactérie ne possède pas de nitrate réductase (fig. 40 tube 4). Si aucune modification de coloration n'est visible après ajout de zinc, alors les nitrates avaient été réduits au stade azote (fig. 40 tube 3).

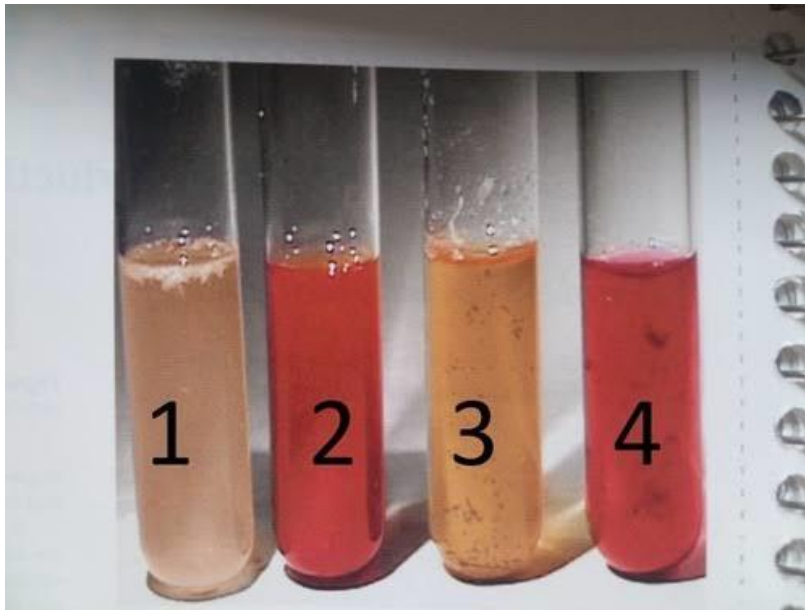


Figure 40 : Recherche d'une nitrate réductase.

1) Bouillon nitraté après culture avant ajout des réactifs. 2) Après ajout des réactifs Griess A et Griess B, apparition d'une coloration rose (stade nitrites) : présence de nitrate réductase (par exemple *Escherichia coli*). 3) Après ajout de poudre de zinc, absence de coloration (stade azote) : présence d'une nitrate réductase (par exemple *Pseudomonas aeruginosa*). 4) Après ajout de poudre de zinc, apparition d'une coloration rose : absence de nitrate réductase (par exemple *Acinetobacter baumannii*)

4.5. Étude du métabolisme glucidique :

4.5.1. Étude de la voie d'attaque des glucides MEVAG (milieu de Hugh et Leifson) :

Les bactéries peuvent utiliser les glucides selon deux voies. La voie fermentative se déroule en l'absence d'oxygène de l'air et les catabolites formés, acides, entraînent une diminution du pH du milieu. Par voie oxydative, l'oxygène de l'air est utilisé et peu de catabolites acides sont formés. Deux milieux semi-solides contenant un indicateur de pH (par exemple du bleu de bromothymol) sont régénérés au bain-marie bouillant 20 minutes. Ensuite, lorsqu'ils sont refroidis autour de 45 °C, 6 gouttes d'une solution de glucose à 30 % (concentration finale en glucose de 1 %) sont ajoutées. Les milieux sont ensuite refroidis complètement etensemencés par piqûre centrale. L'un des deux tubes est recouvert de 0,5 cm d'huile de paraffine stérile. Ce tube constitue le tube dit « fermé », c'est-à-dire dans lequel les réactions s'effectueront en absence d'oxygène. L'autre tube est dit « ouvert ». Les résultats des deux voies d'attaque des glucides sont présentés à la (figure 41). (18)

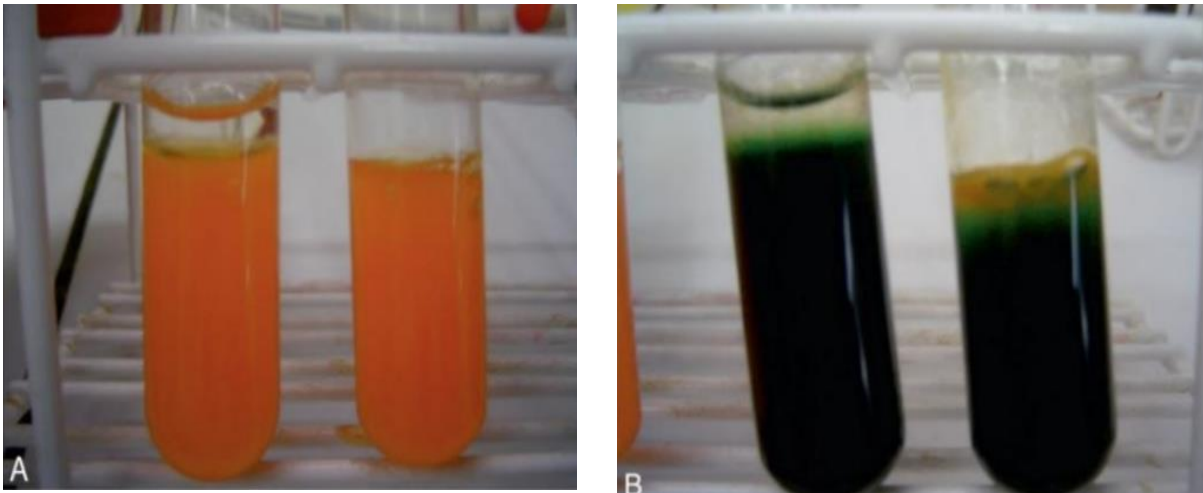


Figure 41: Étude de la voie d'attaque des glucides (MEVAG) . A) Culture positive dans les deux tubes et acidification des tubes : métabolisme fermentatif (par exemple entérobactéries). B) Culture positive et acidification uniquement dans la partie supérieure du tube « ouvert » : métabolisme oxydatif (par exemple *Pseudomonas aeruginosa*).

4.5.2. Recherche de métabolites formés à partir de l'acide pyruvique :

À partir du milieu de Clark-Lubs contenant de l'acide pyruvique, la formation d'acide formique et d'acide acétique (réaction de rouge de méthyle [RM]) et la formation d'acétoïne ou acétylméthylcarbinol (réaction de VogesProskauer [VP]) est étudiée . En pratique, la réaction de VP est fréquemment réalisée, notamment sur les galeries miniaturisées. Sinon, le bouillon Clark-Lubs est ensemencé et incubé 18 heures à 37 °C. À 1 ml de culture, ajouter 0,5 ml d'alpha naphтол à 6 % et 0,5 ml de soude à 16 %. La lecture est à effectuer dans les 10 minutes.

4.6. Étude du métabolisme protéique :

Actuellement, les tests les plus utilisés concernent la mise en évidence d'enzymes intervenant dans la dégradation des acides aminés.

4.6.1. Recherche de décarboxylases :

Trois décarboxylases sont fréquemment recherchées : la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'arginine dihydrolase (ADH). Les tests correspondants sont présents notamment sur les galeries API 20 E®. Le test individuel peut être effectué sur

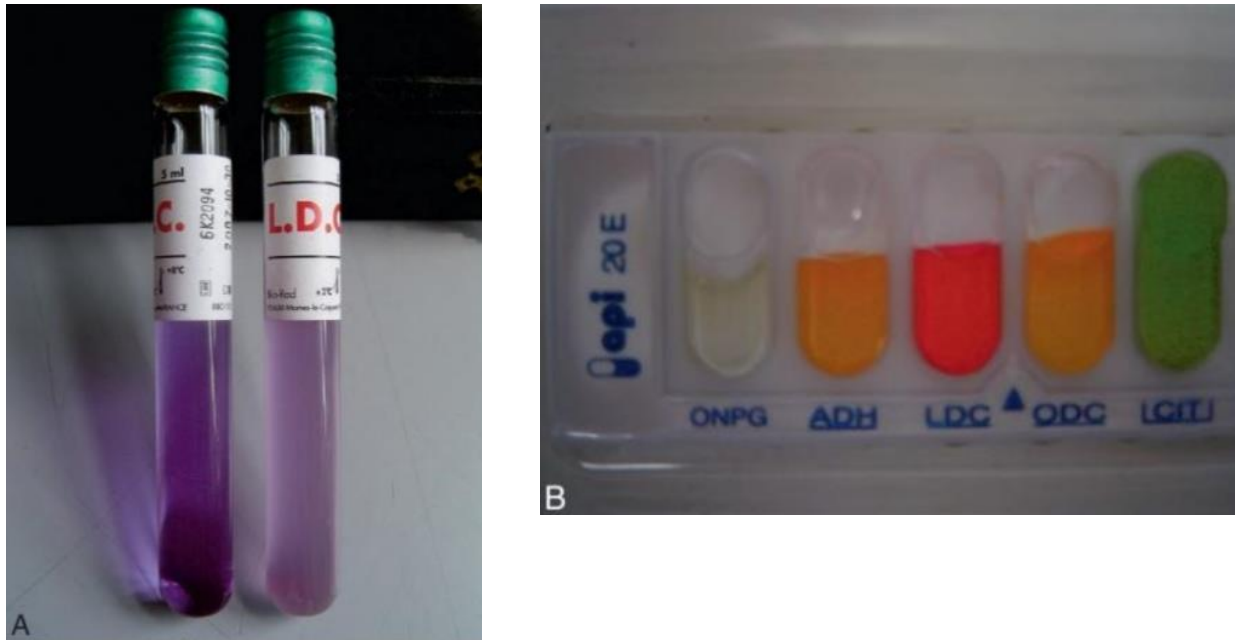


Figure 42 : Exemple de mise en évidence d'une lysine décarboxylase chez *E. coli* . A) Test effectué sur le milieu de Taylor. B) Test effectué sur galerie API 20 E® (test LDC).

Le milieu de Taylor contenant l'acide aminé étudié (soit la lysine, soit l'ornithine, soit l'arginine), du glucose et un indicateur coloré, le bromocrésol pourpre. La réaction s'effectue en deux temps. Lorsque le glucose est fermenté, il y a virage au jaune du bromocrésol pourpre ; lorsque l'acide aminé est décarboxylé, il y a une réalcalinisation du milieu qui vire au violet. Après 18 heures à 37 °C, un milieu violet trouble correspond à une réaction positive. Par exemple, *E. coli* possède une lysine décarboxylase alors que *Proteus vulgaris* n'en possède pas (fig. 42).

4.6.2. Recherche de désaminases

- **Recherche de tryptophane désaminase**

À partir du milieu de Ferguson contenant du tryptophane, du rouge de phénol et de l'urée, il est possible de mettre en évidence une activité tryptophane désaminase (TDA). Une suspension bactérienne dense dans un milieu de Ferguson permet, après incubation à 37 °C pendant 18 heures et ajout d'une goutte de perchlorure de fer à 30 %, de mettre en évidence une coloration brune si la bactérie testée est dite TDA + (fig. 43). Les entérobactéries TDA + appartiennent aux genres *Proteus*, *Providencia* et *Morganella* . (18)



Figure 43 : GALERIE API 20^E :

Coloration jaune = TDA -

Coloration brune = TDA +

- **Recherche d'une phénylalanine désaminase :**

De la même façon, une gélose à la phénylalanine peut être ensemencée pour mettre en évidence une phénylalanine désaminase. Après incubation de 18 heures à 37 °C et ajout de quelques gouttes de perchlorure de fer à 30 %, il apparaît en cas de positivité une coloration verte.

- **Recherche de tryptophanase :**

La production d'indole par hydrolyse du tryptophane peut être effectuée à partir d'une culture de 24 heures de la souche à étudier en milieu de Ferguson ou en eau peptonée dépourvue d'indole. L'indole produit donne une coloration rouge en présence du réactif de Kovacs (fig 44.) (para-diméthylaminobenzaldéhyde + alcool isoamylique) ou du réactif de James. La formation d'un anneau rouge correspond à une réaction positive ; c'est le cas avec *E. coli*. *Proteus mirabilis*, par exemple, n'hydrolyse pas le tryptophane en indole. **(18)**



Figure 44 : GALERIE API 20E : apparition d’anneau rose (indole +)

4.7. Milieu Citrate de Simmons :

La Simmons Citrate Agar est un milieu de culture servant à la différenciation des bactéries Gram négatives qui est basé sur l'utilisation du citrate. (Fig 45)

- **Pincipe :** Les organismes capables d'utiliser le phosphate d'ammonium dihydrogéné et le citrate de sodium comme uniques sources d'azote et de carbone respectivement se développent dans ce milieu et produisent une réaction alcaline, laquelle est mise en évidence par le passage de l'indicateur au bleu de bromothymol du vert (réaction neutre) au bleu (réaction alcaline).

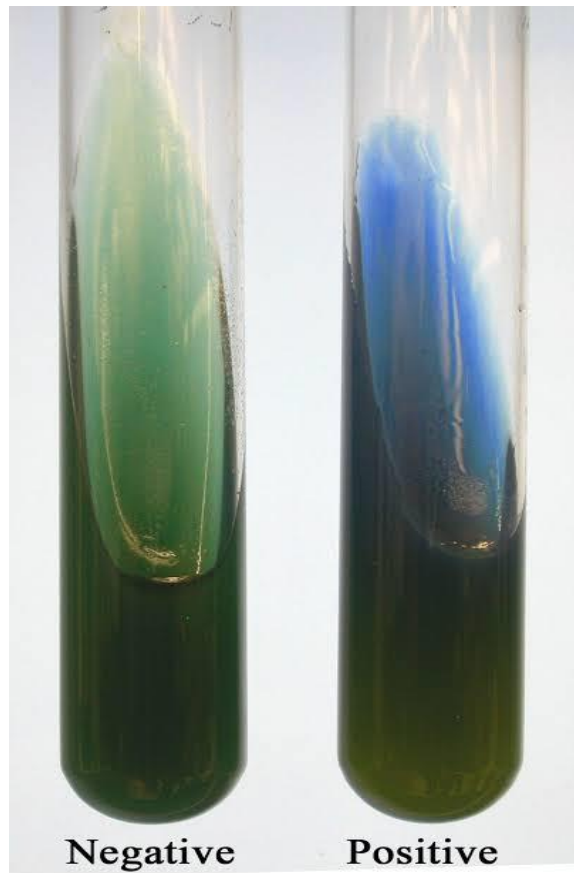


Figure 45 : coloration verte = citrate- coloration bleu= citrate +

- **Resultats :** Une croissance avec une pente d'un bleu intense indique une réaction positive. Aucune croissance, ou la présence de traces de croissance sans changement de couleur (le milieu reste vert sombre) indique une réaction négative. (fig 45). **(18)**

5. Antibiogramme :

5.1. Introduction :

L'antibiogramme est un examen de laboratoire visant à déterminer la sensibilité d'une bactérie à différents antibiotiques. En effet, de nombreuses bactéries sont devenues, avec le temps, résistantes aux antibiotiques. Il n'est donc pas toujours évident de trouver l'antibiotique qui sera efficace pour traiter une souche bactérienne donnée.

En mettant en contact des bactéries (prélevées chez un malade) avec plusieurs antibiotiques, l'antibiogramme permet de voir quels sont les produits qui inhibent la croissance bactérienne et qui seront efficaces pour traiter l'infection.

La méthode de diffusion ou antibiogramme standard est la plus utilisée par les laboratoires de diagnostic. Des disques de papier buvard, imprégnés d'antibiotiques à tester, sont déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface d'un milieu gélosé Mueller-Hinton, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier.

5.2. Méthode de diffusion de disque :

5.2.1. Principe :

Cette méthode consiste à inoculer les bactéries isolées sur une plaque de gélose MuellerHinton, puis à placer des disques en papier imprégnés d'antibiotiques sur la surface de la gélose. En incubant cette plaque, les antibiotiques diffuseront dans la gélose dans un gradient, la concentration d'antibiotique diminuera à mesure que la distance du disque augmente. La sensibilité aux antibiotiques est déterminée en mesurant le diamètre des zones d'inhibition bactérienne autour des disques antibiotiques et en comparant le diamètre aux critères d'interprétation de la diffusion du disque.

La gélose Mueller-Hinton (MHA) est préférée pour cette méthode en raison de ses résultats reproductibles et de ses faibles inhibiteurs de sulfamides, de triméthoprime et de tétracycline qui donnent une croissance satisfaisante de la plupart des bactéries, mais d'autres milieux tels que le MHA supplémenté en sang peuvent également être utilisés comme certaines bactéries ont des exigences particulières. Le bouillon de soja tryptique ou une solution saline à 0,9% sont des bouillons appropriés utilisés pour l'inoculum de la méthode de diffusion sur disque.

5.2.2. Technique :

- **Incubation :**

1. Retournez les disques et incubez-les à 35 ° C ou à une température de croissance optimale pour le micro-organisme testé. Incuber pendant 16 à 18 heures.
2. Chaque laboratoire doit vérifier les exigences pour la souche bactérienne testée car certains ont des exigences particulières.
3. La zone d'inhibition peut être observée après l'incubation. Lecture et mesure des zones d'inhibition La «zone d'inhibition» est un point auquel aucune croissance bactérienne n'est visible à l'œil nu. (58)

- **Lecture des disques :**

1. Lire et enregistrer le diamètre des zones d'inhibition de préférence à l'aide d'une échelle de Vernier (ou d'une règle graduée à 0,5 mm).
2. Arrondissez la mesure de la zone au millimètre près.

- **Interprétation des résultats :**

1. Comparer le diamètre de la zone d'inhibition des isolats d'essai avec ceux des critères d'interprétation des agents pathogènes vétérinaires du CLSI.
2. Déclarez les résultats comme Résistant (R), Intermédiaire (I) ou Susceptible (S). Exemple de rapport de résultats :

Disque utilisé : Chloramphénicol, 30 µg (C-30)

Zone d'inhibition : 16 mm Résultat

Interprétation : Intermédiaire (Remarque : Basé sur les critères d'interprétation CLSI)

3. Les agents antimicrobiens non encore listés avec leurs propres critères d'interprétation doivent être interprétés uniquement qualitativement (présence ou absence d'une zone définie d'inhibition) jusqu'à ce que ses zones d'interprétation soient établies.

- **Critères de rejet :**

1. Ne lisez pas les zones d'inhibition qui ne sont pas circulaires ou qui présentent une distorsion.

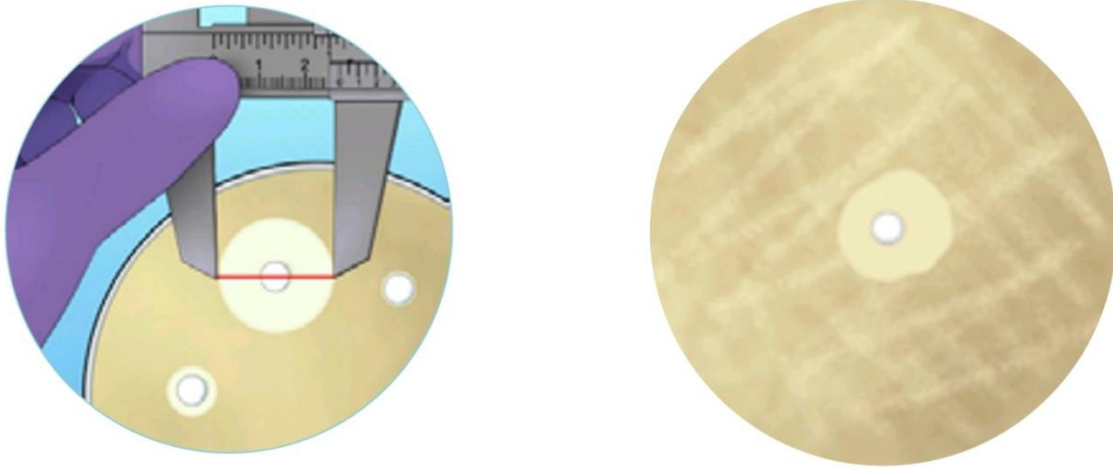


Figure 46 : Zones d'inhibitions des disques d'antibiotiques.

2. Ne lisez pas les zones d'inhibition dans lesquelles deux disques se sont superposés. (fig 47)

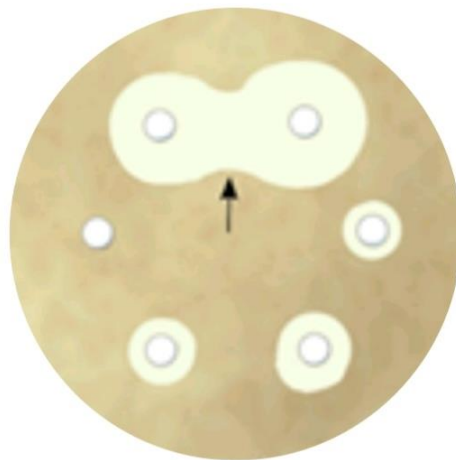


Figure 47 : Superpositions des disques d'antibiotiques.

3. Ne pas lire les plaques qui ont des colonies isolées ou dont la croissance n'est pas uniforme (fig48).

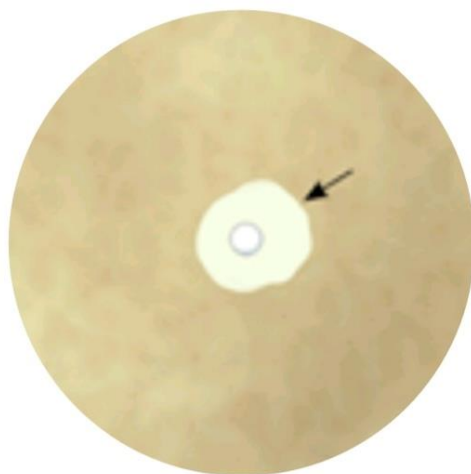


Figure 48 : Croissance uniforme d'une zone d'inhibition.

4. Rejeter toutes les informations d'un lot si les zones d'inhibition d'une plaque de contrainte témoin ne sont pas dans les limites appropriées.

5.3. Test de concentration minimale inhibitrice :

5.3.1. Principe :

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la concentration la plus faible d'un antibiotique qui inhibe la croissance d'un micro-organisme. Cette méthode peut être réalisée sur gélose ou milieu liquide. La méthode traditionnelle pour déterminer la CMI consiste à utiliser une technique de dilution en bouillon, dans laquelle des dilutions en série d'antibiotiques sont incorporées au bouillon. Chaque tube ou puits contient une concentration différente de l'agent antimicrobien et est inoculé avec une quantité fixe de bactéries à tester. Après incubation, la concentration la plus faible qui ne montre aucune croissance visible est considérée comme la CMI. Il s'agit d'un test quantitatif, dans lequel les résultats sont exprimés en $\mu\text{g} / \text{ml}$. (58)

5.3.2. Préparation de la solution mère d'agent antimicrobien :

1. Peser la quantité appropriée d'agent antimicrobien en poudre.
2. Dissoudre la poudre d'agent antimicrobien dans le solvant comme indiqué par le fabricant pour obtenir une concentration d'au moins $1000 \mu\text{g} / \text{ml}$ ou d'au moins 10 fois la concentration la plus élevée à tester.

3. Distribuer de petits volumes de solutions mères stériles dans des flacons stériles en verre, en polypropylène, en polystyrène ou en polyéthylène. Sceller soigneusement et stocker de préférence à -60°C ou moins.

Remarque : les flacons peuvent être décongelés et utilisés le même jour. Toute solution mère non utilisée doit être jetée à la fin de la journée.

4. Préparer des solutions d'agent antimicrobien intermédiaires (10x) en effectuant des dilutions successives (deux fois) 1: 2, 1: 4 et 1: 8 dans un diluant stérile.
5. Mettez de côté pour l'instant.

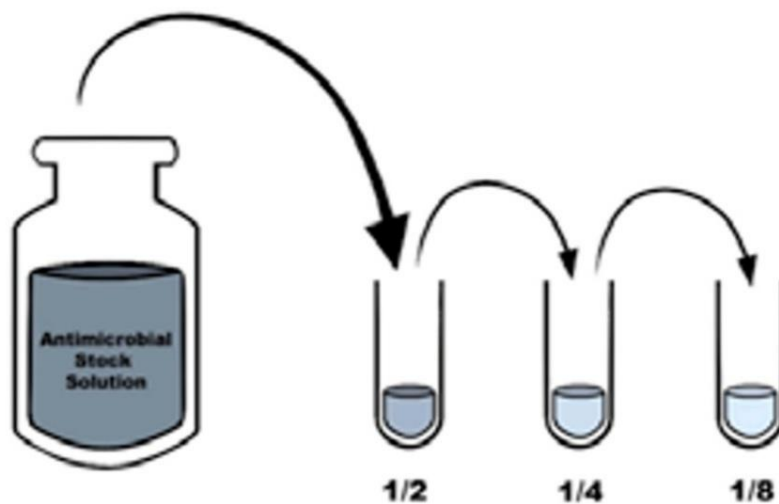


Figure 49 : Préparation de la solution mère d'agent antimicrobien.

5.3.3. Préparation de l'inoculum :

1. Prenez 3 à 5 colonies bien isolées à partir d'une culture bactérienne pure pendant la nuit et repiquez-la dans un tube contenant 4 à 5 ml d'un milieu de bouillon approprié tel que le bouillon de soja tryptique.
2. Incuber le bouillon de culture à $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ jusqu'à ce qu'il atteigne ou dépasse une turbidité McFarland de 0,5
3. Ajuster la turbidité de l'inoculum avec une solution saline stérile ou un bouillon pour obtenir une turbidité d'un standard McFarland de 0,5.
4. Utilisez un appareil photométrique ou une lumière adéquate pour comparer le tube d'inoculum et le standard 0,5 McFarland à un papier avec un fond blanc et des lignes noires contrastées.

Remarque : il en résulte une suspension contenant environ $1 \text{ à } 2 \times 10^8$ UFC / ml.

- **Incubation :**

1. Laisser les plaques inoculées se reposer à la température ambiante jusqu'à ce qu'aucune humidité de l'inoculum ne soit visible ou jusqu'à ce que toutes les taches soient séchées.

2. Incuber les plaques dans une position inversée à 35 ± 2 ° C pendant 16 à 20 heures (ou plus longtemps, en fonction du microorganisme testé).

Remarque : N'abomez pas les plaques dans une atmosphère avec une augmentation du CO₂ lors du test des organismes non fastidieux car le pH de surface peut être modifié.

5.3.4. Lectures les valeurs d'CMI :

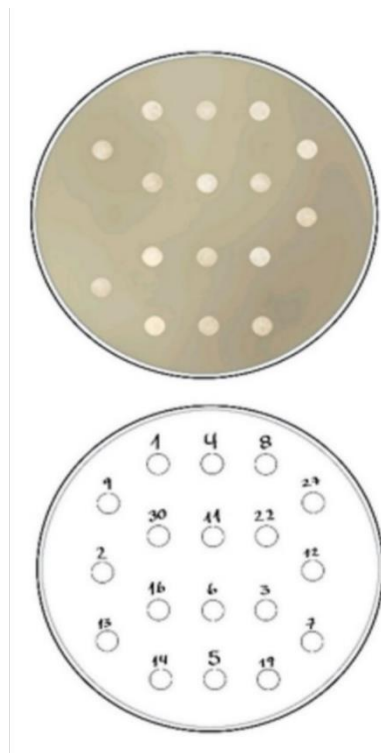


Figure 50 : Lecture de CIM.

1. Placez les plaques d'agar sur une surface noire non réfléchissante et observez la croissance bactérienne sans aide visuelle.
2. Utilisez le papier de référence précédemment effectué à l'étape 2 de la "préparation des plaques d'agar antimicrobiennes" pour localiser la position des bactéries à tester.
3. Vérifiez la croissance bactérienne sur les plaques de contrôle, rejetez les résultats si aucune croissance n'est détectée dans certaines plaques de contrôle, car le test doit être répété.

Enregistrez le micro (concentration la plus faible d'antibiotique qui inhibe complètement la croissance bactérienne) détectée sans aide visuelle.

4. Comparez le point d'arrêt du MIC des isolats de test avec ceux des critères d'interprétation pour les agents pathogènes vétérinaires de CLSI.
5. Résultat du rapport comme résistant (R), intermédiaire (I) ou sensible (s). (fig 50)

Exemple :

- Antibiotique : Oxytétracycline Mic.
- Point d'arrêt : 0,2 µg / ml
- Interprétation : susceptible. **(58)**

Conclusion

La pathologie infectieuse bactérienne est un motif fréquent de consultation et d'admission dans les services ORL.

La prescription à visée diagnostique dépend en premier lieu de la qualité du prélèvement, dont les conditions de réalisations, acheminements et d'analyses doivent être connues pour tout clinicien.

Face à un syndrome infectieux, de nombreux prélèvements sont souvent effectués pour connaître soit le ou les organe(s) atteint(s), soit la porte d'entrée de l'infection. Lors de l'interprétation des résultats, il faudra privilégier les données obtenues à partir des "bons" échantillons, et considérer avec beaucoup de prudence et de circonspection celles issues d'échantillons de moindre qualité. C'est pourquoi des prélèvements de type invasif, donnant souvent les meilleurs échantillons, devront être réalisés dès le départ chaque fois que cela sera possible.

L'existence d'une flore commensale dans les voies aériennes supérieures perturbe souvent l'analyse nécessaire aux méthodes diagnostiques des infections ORL, donc le prélèvement doit être effectué dans des conditions d'asepsie rigoureuse pour éviter toute contamination.

L'utilisation inadéquate des antibiotiques provoque l'émergence des souches bactériennes résistantes favorisées par des traitements injustifiés, c'est pourquoi une connaissance des agents pathogènes responsables des infections ORL optimiserait l'antibiothérapie probabiliste et réduirait de façon considérable le risque des complications infectieuses.

Plusieurs infections de la sphère ORL seraient liées à la présence de microorganismes sous forme de biofilms et le traitement de ces infections est particulièrement délicat, car outre la présence simultanée de plusieurs espèces bactériennes, la forme de vie « biofilm » complique les traitements. En effet, les bactéries ainsi agrégées présentent des mécanismes de résistance aux agents anti-infectieux qui se surajoutent à leurs mécanismes de résistance propre. Selon les situations qui peuvent se présenter, la lutte contre les biofilms consiste à inhiber leur formation (stratégies préventives) ou à désintégrer un biofilm existant (stratégie curative) sans entraîner la dissémination dans l'organisme de bactéries vivantes capables de coloniser d'autres sites.

Nous pensons que la tendance actuelle en matière de recherche est en faveur des examens bactériologiques ORL qui visent à caractériser et traiter les biofilms.

Résumé

Les troubles ORL regroupent les infections et maladies qui affectent le nez, la gorge et les oreilles. Elles peuvent être provoquées par des virus, des bactéries, des parasites et constituent l'un des principaux motifs de consultation médicale.

Dans le cas d'une infection due à des bactéries, le médecin a souvent besoin d'études bactériologiques dont la pertinence et la fiabilité dépend de la démarche diagnostique et des conditions de recueil, du mode opératoire du prélèvement, des conditions matérielles spécifiques, ainsi que des conditions de transport de l'échantillon.

Dès que l'échantillon arrive au laboratoire, il est soumis en premier lieu aux examens microscopiques qui englobent l'analyse cytologique et l'analyse bactériologique (examen direct par coloration et la mise en culture). Ces milieux de culture sont indispensables à la multiplication bactérienne, ce qui permet par la suite une identification bactérienne.

Ensuite, on utilise également l'antibiogramme : examen qui sert à déterminer la sensibilité d'une bactérie à différents antibiotiques.

Tous ces examens ainsi que d'autres complémentaires permettent une prescription d'un traitement médical précis et adapté.

La reconnaissance du fait que les infections bactériennes oto-rhino-laryngologiques chroniques sont liées aux biofilms a été à l'origine du développement de nouvelles technologies pour l'étude de ces derniers, leur prévention et enfin leur traitement.

Summary

The ENT disorders include infectious diseases that affect the nose, throat and ears. They can be caused by viruses, bacteria or parasites and are one of the main reasons for medical consultations.

In the case of a bacterial infection, the clinician often needs bacteriological studies which depend on the sampling procedure, the specific conditions of the collection and transport of the specimen.

As soon as the sample arrives in the laboratory, it is first subjected to microscopic examinations which include cytological and bacteriological analysis (direct examination by staining and culture).

These culture media are essential for bacterial multiplication, and their use allows bacterial identification. The study of the sensitivity of bacteria to different antibiotics is called “antibiogram”.

In addition to all these diagnostic methods, other investigations help in adapting the medical treatment.

Recent studies have confirmed the role of biofilms in the pathogenesis of chronic otolaryngologic bacterial infections. These findings have led to the development of new biotechnological means for the study, prevention and treatment of biofilms.

ملخص

تشمل اضطرابات أحي أمراض الإنتانية التي تصيب الأنف، الحنجرة والأذن الناجمة عن فيروسات، بكتيريا أو طفيليات و تعد أحد الأسباب الأساسية للإنتانات الطبية.

في حالة الإصابة البكتيرية، غالبا ما يحتاج الطبيب المعالج الى دراسة بكتريولوجية، تستند على طريقة التشخيص ، ظروف أخذ العينة وشروط نقلها.

بمجرد وصول العينة الى المخبر , يتم اخضاعها أولا لفحوصات مجهرية لتشمل التحليل الخلوي والتحليل البكتريولوجي (الاختبار المباشر عن طريق التلوين والزراعة) .تعد أوساط الزراعة ضرورية لتكاثر البكتيريا , مما يسمح لاحقا بالتعرف على نوع البكتيريا. بعد ذلك، يتم الحصول على مخطط تفصيلي لتحديد مدى تفاوت حساسية البكتيريا لمضادات حيوية مختلفة.

كل هذه الفحوصات بالإضافة إلى إختبارات أخرى تسمح بوصف علاج دقيق ومناسب.

أكدت الدراسات الحديثة أن الإصابات البكتيرية المزمنة في الأذن والأنف والحنجرة مرتبطة بالأغشية الحيوية (بيوفيلم) وهو ما أدى إلى تطوير تقنيات جديدة لدراسة هذه الأخيرة , الوقاية منها و أخيرا معالجتها .

Références bibliographiques

1. Pr. REYT emile /2014 , Item 147 (ex item 98) : Otites infectieuses de l'adulte et de l'enfant Collège Français d'ORL et de Chirurgie Cervico-faciale.
2. Stéphane Dubus, Formateur – Octobre 2003.
Equipe enseignante de l'IFSI du Centre Hospitalier de ROUBAIX.
3. L'équipe PasseportSanté Juillet 2017.
<https://www.passeportsante.net/fr/parties-corps/Fiche.aspx?doc=nez>.
4. Kamina P tête et cou" Muscles, vaisseaux, nerfs et viscères Tome 1 éd. Maloine 1996.
5. Copyright 2009 Dr Albert MUDRY
Physiologie de l'audition | Otologie - Dr Albert Mudry (oreillemudry.ch)
6. [22-009-D-15] - Doi : 10.1016/S1283-0852(10)57153-2
L. Guyot et F. Cheynet : Service de stomatologie, chirurgie maxillofaciale et plastique de la face, Hôpital Nord, chemin des Bourrellys, 13915 Marseille cedex 20, France
7. Anatomie et physiologie du tube digestif par Jérôme Kabwe Kikombwe
Université de Lubumbashi - D1 2016
8. Wade WG. Detection and culture of novel oral bacteria. Chap. 2 de Oral microbial ecology – current research and new perspectives. J'yCaister Academic Press, Norfolk (2013)
<http://www.caister.com/oral-ecology>
9. Zarco et al. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. Oral Diseases 2012 ; 18 : 109-120.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21902769>
10. Bassis C et al. The nasal cavity microbiota of healthy adults. Microbiome 2014.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4138944>
11. Franck DN et al. Culture-independent molecular analysis of microbial constituents of the healthy human outer ear. J Clin Microbiol. 2003 Jan;41(1):295-303.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517864>.

12. Stroman DW et al. Microbiology of normal external auditory canal. Laryngoscope. 2001 Nov ; 111(11 Pt 1).
13. Chan CL et al. Identification of the Bacterial Reservoirs for the Middle Ear Using Phylogenetic Analysis. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg. 2017 Feb 1;143(2):155-161.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27812691>
14. H. Dabernat (Faculté de Médecine Toulouse - Purpan) (Novembre 2002).
<http://www.microbes-edu.org/etudiant/haemo.html>
15. O. Barraud, F. Denis et AL, 2011 (Bactériologie médicale : Techniques usuelles).
16. H. Dabernat (Faculté de Médecine Toulouse – Purpan))(Novembre 2002)<http://www.chu-rouen.fr/ssf/pathol/haemophilusinfection.html>
17. J. Caillon MCU-PH Bactériologie, CHU Nantes, EA 3826 Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales des Infections DESC Octobre 2017
18. François Denis, Marie-Cécile Ploy, Christian Martin, Édouard Bingen et Roland Quentin / 2011 (Bactériologie médicale : Techniques usuelles)
19. Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., & Pfaller, M. A. (Eds.). (2007). Manual of Clinical Microbiology (9th ed.). Washington : ASM Press.
20. Stéphane Corvec, 2016, Branhamella catarrhalis
21. . S. Mezghani Maalej, M. Rekik, M. Boudaouara, N. Jardak, S. Turki , R. Arous ,S. Chouchane, F. Marrekchi, M. Kassis, A. Hammami (2007).
22. Kazuya Morikawa, Aya J. Takemura et Toshiko Ohta University of Tsukuba, Division of Biomedical Science, Faculty of Medicine, Tsukuba, Japan.1 novembre 2012.
23. Oliveira DC, Tomasz A, Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen : molecular evolution of pandemic clones of meticillin-resistant Staphylococcus aureus. Lancet Infect Dis 2002 ; 2 : 180-9
24. Pascal C. Analyse génétique des souches multi-résistantes de Pseudomonas aeruginosa dans l'est de la France, apport prédictif potentiel sur le risque infectieux [Thèse]. Besançon : University de Franche-Comté ; 2010
25. Robert R. Tanz, dans Nelson Pediatric Symptom-Based Diagnosis, 2018
26. Tan Z I, Nagaraja T g, Chengappa M m. Biochemical and biological characterization of ruminal Fusobacterium necrophorum. FEMS Microbiol Lett. 1 juill 1994;120(1-2):81-6
27. Tan ZL, Nagaraja TG, Chengappa MM. Fusobacterium necrophorum infections :

- Virulence factors, pathogenic mechanism and control measures. *Vet Res Commun. Mars* 1996 ;20(2) :113-40
28. Murdoch, D. A. (1998). Gram-Positive Anaerobic Cocci. In A. Balows, & B. I. Duerden (Eds.), *Microbiology and Microbial Infections* (pp. 783). London: Arnold.
 29. Fleming D & Hunt D (Ed.). (2006). *Biological Safety Principles and Practices* (4th ed.). Washington: ASM Press
 30. 33/ Brook, I. (2002). Clinical review: bacteremia caused by anaerobic bacteria in children. *Critical Care* (London, England), 6 (3), 205-211.
 31. Allag H Les Bactéries Anaérobies Stricts Chuc.laboratoire central de bactériologie. 2016/17.
 32. Wendy S. Garrett, Andrew B. Onderdonk, in Mandell, Douglas, and Bennett's *Principles and Practice of Infectious Diseases* (Eighth Edition), 2015.
 33. Sherrard LJ, Schaible B, Graham KA, et al. Mechanisms of reduced susceptibility and genotypic prediction of antibiotic resistance in *Prevotella* isolated from cystic fibrosis (CF) and non-CF patients. *J Antimicrob Chemother* 2014;69(10):2690–8.
 34. Veloo ACM, Seme K, Raangs E, et al. Antibiotic susceptibility profiles of oral pathogens. *Int J Antimicrob Agents* 2012;40(5): 450-4.
 35. Agnès Roux(1) et Jean-Marc Ghigo (communication présentée le 16 mars 2006).
https://research.pasteur.fr/wp-content/uploads/2015/05/research.pasteur.fr_genetics-of-biofilms1
 36. Yannick D.N. Tremblay, Skander Hathroubi, et Mario Jacques / 2014
Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique.
 37. Tion fusospirillaire. (*Fusobacterium necrophorum* et *Treponema vincentii* (en)).
J. Christopher Post, Center for Genomic Sciences, Allegheny Singer Research Institute.
 38. D. Brasnu, D. Ayache, S. Hans, D. Hartl et J-P. Papon. *Traité d'ORL. Médecine Sciences Flammarion /2008.*
 39. Mallet E : Etiologie, expression clinique de l'angine. *Méd Mal Infect* 1997 ; 27 : Special418-23.
 40. Bisonal, Chairman, Gerberma, Gwaitenyjm, Kaplanele, Schwartzrh : *Diagnosisand Management of Group A Streptococcal Pharyngitis : A pratice Guideline Clin Inf Dis* 1997 ; 25 : 574-83.

41. Peyramondd, Raffif, Luchtf, Leboucherg: Traitements antibiotiques désabonnés. Indications, modalités, durées. Méd Mal Infect. 1997 ; 27, spécial : 434-49.
42. Afessaps. Prise en charge médicamenteuse de la douleur aiguë et chronique chez l'enfant. Recommandations. Juin 2009
[cité le 06/10/2016]. https://www.pediadol.org/IMG/pdf/Afessaps_reco.pdf.
43. Afessaps. Antibiothérapie par voie générale en pratique courante : Otite Moyenne Aiguë. [En ligne].2001 [cité le 30/09/2016]
http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/bibliotheque/consensus/otite_moyenne_aigue.pdf.
44. Tropicales. E.Pilly 2016 Collège des universitaires de Maladies Infectieuses et maladies infectieuses et tropicales. Paris : Alinéa Plus ; 2015.648p.
45. Bradley W. Kesser , MD, University of Virginia School of Medicine
Dernière révision totale août 2019, Dernière modification du contenu août 2019.
<https://www.msdmanuals.com/fr/professional/affections-de-l-oreille,-du-nez-et-de-la-gorge/troubles-de-oreille-externe/otite-externe-aigu%C3%AB>.
46. Narcy P, Manach Y : Les rhinopharyngites de l'enfant. Rev Prat 1979 ; 29 : 3143-9.
47. P Géhanno, P Léophonte, Y Mouton. Ed John Libbey Eurotext. Paris 1995 ; 17-25.
Flore rhinopharyngée del'enfant normal. In: La colonisation microbienne des voies respiratoires.
48. Launce Philippot, Finalité de Laboratoire (Institut de biologie clinique – université libre de bruxelles 2020).
49. Judith Fafard et Michel Roger GT-PREA-001-04 Version : 04 Applicable le : 10-12-2018
Page 74 sur 100.
50. Bannatyne R. M., Clausen C., Mccarthy L.R. - Laboratory Diagnosis of upper respiratory tract infections. Cumitech 10, 1979, ASM, Washington.
51. B. Barry, N. Kassis (Service d'ORL, hôpital Bichat - Claude-Bernard).
52. R. Cohen, L. Chaumette, E. Bingen, A. DE GOUELLO et F. de LA ROCQUE
L'avenir dans l'angine : les tests de diagnostic rapide, Méd Mal Infect. 1997 ; 27, Spécial : 424-33.
53. Eyquem, A ; Montagnier L. Traité de microbiologie clinique: deuxièmes mises à jour et compléments. Rome : PICCIN édition ; 2000. p. 238.
54. Isenberg Henry D. Clinical Microbiology procedures Handbool DC, 2004.
American Society for Microbiology.

55. Tortora G J ; Berdell B F ; Christine L C. Introduction à la microbiologie. Montreal : ERPi édition ; 2003. p. 945.
56. Massicotte Luc, Laboratoire de Santé publique du Québec. Contrôle de la qualité appliqué en microbiologie, novembre 2005.
57. François Denis, Marie-Cécile Ploy, Christian Martin, Édouard Bingen et Roland Quentin / 2011 (Bactériologie médicale : Techniques usuelles).
58. Constanza Vergara / Diego Varela Chilean Food Quality and Safety Agency (ACHIPIA) Nueva York 17, Piso 4, Santiago Chile.
Laboratory Guide: Methodologies for Antimicrobial Susceptibility Testing APEC Sub-Committee on Standards and Conformance May 2020.