

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE.
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE.

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA -1-

Faculté de médecine

Département de pharmacie.



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie.

THEME :

***Recherche et identification des bactéries anaérobies strictes : Expérience
du laboratoire central du CHU Blida, unité Frantz Fanon.***

Présenté par :

AMIROUCHE Nada.

DRIOUECH Rayane.

MAZOUZ Imene.

Devant le jury composé de :

Pr. S. OUKID : Maitre de conférence A en microbiologie médicale.....Présidente.

Dr. S. AZROU : Maitre-assistante en microbiologie médicaleExaminatrice.

Dr. M.BENAMARA : Maitre-assistante en microbiologie médicale.....Promotrice.

Année universitaire : 2020/2021.

Session Juin 2021.

Remerciements

Tout d'abord, nous tenons à remercier dieu, le tout puissant, de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience de mener à terme notre modeste travail.

Ensuite, nous adressons nos remerciements :

A notre promotrice docteur M.BENAMARA d'avoir proposé ce thème et de nous avoir encadré dans l'aboutissement de ce mémoire.

A professeur S.OUKID pour l'intérêt qu'elle porte à notre étude et d'avoir accepté de présider notre jury.

A docteur S.AZROU d'avoir accepté d'examiner notre mémoire ainsi que pour son aide lors de la réalisation de la pratique au niveau du laboratoire.

A professeur S.ABDI, chef de service, ainsi que le staff du laboratoire central de biologie, particulièrement madame Amel TAFET et Madame Samira pour leur aide et conseils tout au long de la période de notre travail.

A docteur M.MAHFOUD de nous avoir encadré et dirigé tout au long de notre internat.

A Fadila SAHNOUNE, pour son aide précieuse et de nous avoir inspiré avec son expérience.

A Mounir MOUHOUBI pour ses encouragements et sa précieuse aide dans la finalisation de ce travail.

A toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de notre projet de fin d'études

Dédicaces

Je dédie du profond de mon cœur, ce mémoire :

A mes très chers parents Nadia et Mohamed, en reconnaissance à tous vos efforts, sacrifices, soutien et encouragements. Aucun mot ne saurait exprimer à sa juste valeur ma gratitude envers vous.

A mes chères sœurs Meriem et Samira, votre soutien permanent, votre amour et vos conseils ont fait de moi la personne que je suis aujourd'hui.

A mes beaux-frères Amine et Noureddine pour votre disponibilité et votre soutien.

A ma nièce Wissem et mon neveu Samy les prunelles de mes yeux.

A mon oncle AbdelKarim qui a toujours été présent pour moi et dont la place est irremplaçable dans mon cœur.

A ma grand-mère Fadila qui m'a toujours encouragé depuis le début de mon cursus et qui ne cesse de le faire.

A mon grand-père Smain et à mes tantes Nacéra, Nouria, Lila et Zahia pour votre amour et vos encouragements.

A mes amis Sara OULD ROUIS, Sarah EL ARBI RABAH, Bouchra BOUKHALFI, Ayoub BELLAMECHE, avec qui j'ai partagé mes années d'études et qui m'ont toujours soutenue et poussé vers l'avant.

A mon trinôme, mes meilleures amies et mes sœurs Imene et Rayane, pour votre amour, votre soutien inconditionnel et votre compréhension. Vos efforts inlassables et votre ténacité nous ont permis de réaliser notre travail dans les meilleures conditions possibles.

Nada AMIROUCHE.

Dédicaces

C'est avec immense joie et fierté que je dédie ce mémoire :

A mes chers parents, Lamia et Kamel, merci pour votre amour inconditionnel, de m'avoir soutenu, et poussé à réaliser mes rêves, d'avoir travaillé dur pour notre bien-être et notre prospérité.

A mes grands-parents, pour votre accueil, votre écoute, et vos prières. Merci d'avoir toujours cru en moi.

A ma sœur Rihem et mon frère Radhi merci pour votre amour et votre bienveillance. Je vous souhaite beaucoup de réussite.

A mes tantes Affaf, et Amina que je considère comme des mamans, pour votre écoute, vos conseils, et votre amour.

A mes oncles, et mes cousins, ainsi qu'à toute la famille DRIOUECH.

A mes amis, Anfel, et son mari Imad, à Celya, Sarah, Bouchra, Ayoub, Moumen pour toutes les années d'amitié qu'on vit ensemble et pour les années à venir. Merci d'être toujours là pour moi.

A Souhila, Nihal, Sidali et Mohamed que j'ai connu grâce à mes cours d'espagnol. ¡Os quiero mucho !

A mon trinôme et mes meilleures amies Imene et Nada, merci pour votre patience, vos immenses efforts, votre bonne humeur. Je n'aurai jamais imaginé une meilleure fin à mon cursus universitaire qu'avec vous.

Merci d'avoir partagé avec moi les joies comme les peines, le stress comme le soulagement. Je vous souhaite énormément de bonheur de succès comme vous le méritez

Rayane DRIOUECH

Dédicaces

C'est avec gratitude que je dédie ce mémoire :

A mon précieux grand père, merci pour les conseils que tu m'as donné, et pour la confiance, l'encouragement et l'affection que tu m'as toujours portée.

A mes chers parents, Djazia et Smain pour votre amour et tous les sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation, mes études, et mon confort.

A mes sœurs Ikram, Lamia, Romaiassa et mon petit frère Oussama merci d'être toujours à mes côtés, je vous souhaite un avenir plein de bonheur et de succès.

A ma chère grand-mère, A mes tantes Soumia, Isma, A mes oncles Smail, Mohamed, Hassen, Brahim et leurs épouses pour votre soutien qui m'a permis de surmonter les épreuves de la vie.

A mes petits cousins et en particulier au petit Hichem ma source de joie.

A Hadjer et tata Amina, merci pour votre amour et votre joie de vivre.

A Ihcene merci pour ton aide précieuse tout au long de mon cursus.

A mes amis, Wissem, Rania, Bouchra, Sarah, Nada, et Ayoub pour les liens forts d'amitié qui nous unissent et les meilleurs moments qu'on a passé ensemble.

A mes chères amies Nada et Rayane, mes sœurs avant d'être mon trinôme, ma source de motivation et de bonheur sans vous ce travail n'aura jamais vu le jour.

Je vous aime très fort...

Imene MAZOUZ.

Liste des abréviations

AA : Acide Aminé.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ARN : Acide ribonucléique.

ATB : Antibiotique.

ATM : Atmosphère.

ATP : Adénosine Triphosphate.

BAS : Bactéries anaérobies strictes.

BBE : Bacteroides Bile Esculine.

BGN : Bacille Gram Négatif.

BHI : Brain Heart Infusion.

BoNT : Botulinum Neuro-Toxin.

CAC : Centre anti-cancer.

CCFA : cycloserine-cefoxitine-Fructose Agar.

CCR : cancer colorectale.

CGN : cocci gram négatif.

CGP : cocci gram positif.

CHU : Centre Hospitalo –Universitaire.

CMI : Concentration Moyenne Inhibitrice.

CO₂ : Dioxyde de carbone.

EHS : Etablissement hospitalier spécialisé.

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay.

EOS : Extremely Oxygen Sensitive.

ETBF : Enterotoxigenic Bacteroides fragilis.

EYA : Egg Yolk Agar.

FIT : Fusobacterium immunosuppressive toxin.

g : gramme.

GABA : Acide gamma amino butyrique.

GSC : Gélose au sang cuit.

GSF : Gélose au sang frais.

G⁺ : Gram positif.

h : heure.

H₂ : Dihydrogène.

H₂O : Monoxyde de dihydrogène.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

H₂S : Sulfure d'hydrogène.

IL - 10 : Interleukine 10.

IRM : Imagerie à résonance magnétique.

KVLB/LKV : Kanamycin Vancomycin Laked Blood.

MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

MALDI - TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation/Time Of Flight.

N₂ : Diazote.

NSB : Niveau de sécurité biologique.

O₂ : Dioxygène.

OHB : Oxygène Hyperbare.

ORL : Oto-rhino-laryngologie.

OSCC : Oral squamous cells cancer.

Ox/Red : Oxydo-réduction.

PBT : Pentavalent Botulinum Toxin.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

PH : Potentiel d'hydrogène.

PLP : protéine de liaison à la pénicilline.

PN : Polynucléaire.

PNN : Polynucléaire Neutrophile.

RBD : receptor binding domain.

SCV : Small colony variants.

SNC : Système nerveux central.

S²⁻ : Ion sulfite.

TOT : transplantation d'organes et de tissus.

TSA : Tryptone de Soja Agar.

UMC : Urgence médico-chirurgicale.

UV : Ultra-Violet.

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine.

Glossaire

A

Anatoxine : Toxine inactivée par l'action combinée du formol et de la chaleur, qui a perdu ses propriétés toxiques, mais qui conserve ses propriétés immunisantes.

Angiogenèse : Formation des vaisseaux.

Antibioprophylaxie : (antibiothérapie préventive) consiste en l'administration d'un antibiotique afin d'empêcher le développement d'une infection précise dans des circonstances déterminées. Elle s'oppose à l'antibiothérapie curative qui est destinée à traiter une infection déjà installée.

Apoptose : (mort cellulaire programmée) est le processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal.

Appendicite : inflammation brutale de l'appendice iléo-cæcal.

Arthrite : inflammation aiguë ou chronique des articulations.

Autolyse de la cellule : Dégradation d'un tissu par des enzymes sécrétées par ses propres cellules.

Autophagie : mécanisme cellulaire qui consiste en la dégradation partielle du cytoplasme de la cellule en utilisant ses propres lysosomes.

B

Bacilles pléomorphes : bacilles qui ont la capacité de changer de forme sous certaines influences.

Bactérie Méthanogène : bactérie qui produit du méthane.

Bactériophage : Virus infectant des bactéries.

Botulisme : Intoxication grave, due à la toxine de *Clostridium botulinum*.

C

Carcinome épidermoïde oral : Tumeur maligne formée de cellules épithéliales néoformées au niveau de la bouche.

Carie : une maladie infectieuse de la dent qui endommage sa structure.

Cellulite : Inflammation diffuse des tissus de soutien de l'organisme.

Cerebrite : inflammation du cerveau.

Cervicite : inflammation du col de l'utérus.

Colite pseudo membraneuse : Colite aiguë post-anti biothérapique due au bacille *Clostridium difficile*.

Cycle de Krebs : Ensemble de réactions enzymatiques dont le siège se situe dans les mitochondries des cellules de tous les organismes vivants.

D

Débridement des tissus : Dilatation sanglante d'une plaie ou d'un orifice naturel, pour permettre l'évacuation d'un corps étranger ou d'un épanchement, ou pour enlever les parties nécrosées.

Diaphorèse : Transpiration abondante.

Drainage : Procédé permettant l'écoulement des liquides contenus dans une plaie, un organe creux ou une cavité.

Dysphagie : Difficulté à la déglutition.

Dystonie : Trouble du tonus ou de la tonicité d'un tissu ou d'un organe.

E

Echo doppler : examen qui vise à observer la circulation du sang dans certains vaisseaux du corps. Il associe une échographie, qui permet de visualiser les vaisseaux, à une fonction « doppler », qui permet d'observer les conditions d'écoulement du sang dans ces vaisseaux.

Endocardite : Inflammation aiguë ou chronique de l'endocarde.

Escarre : nécrose du tissu cutané due à l'immobilisation prolongée, que ce soit en position assise ou allongée. Elles apparaissent sur les zones de pression comme les fesses ou les talons, par compression prolongée des vaisseaux supérieurs.

H

Hémine : Chlorure d'hématine, constituant les cristaux de Teichmann, utilisés pour révéler la présence de taches de sang.

I

Ischémie : arrêt ou insuffisance de la circulation sanguine dans une partie du corps ou un organe, qui prive les cellules d'apport d'oxygène et entraîne leur nécrose. Les ischémies peuvent être dues à l'obstruction d'un vaisseau (thrombose) ou à la compression d'une artère (sténose).

M

Métastase : Tumeur formée à partir de cellules cancéreuses qui se sont détachées d'une première tumeur (tumeur primitive) et qui ont migré par les vaisseaux lymphatiques ou les vaisseaux sanguins dans une autre partie du corps où elles se sont installées.

Myonécrose : Nécrose du muscle.

O

Œdème : désigne le gonflement d'un tissu causé par l'accumulation d'un liquide séreux qui envahit divers tissus (la lymphe).

Opisthotonos : Contraction spastique des muscles de la nuque et du dos, prédominant sur les muscles extenseurs, observée en particulier dans le tétanos, et où le corps forme un arc appuyé sur l'occiput et les talons.

Ostéite : inflammation du tissu osseux.

Ostéomyélite : infection qui atteint le tissu osseux par voie hématogène.

Otite : une inflammation ou une infection, soit du conduit auditif, soit de l'oreille moyenne.

Oxyrase : enzyme stérile utilisée pour produire l'anaérobiose.

P

Phlegmon : inflammation grave, due à des bactéries, du tissu conjonctif, avec formation de pus.

Pneumonie : infection aiguë des poumons qui peut être causée par une bactérie ou un virus.

Phosphorylation oxydative : processus permettant la phosphorylation de l'ADP en ATP.

R

Risus sardonius : sourire sardonique symptôme d'une infection à *Clostridium tetani* (tétanos).

S

Septicémie : État morbide dû à la dissémination par voie sanguine de germes pathogènes provenant d'un foyer infectieux local.

Spondylodiscite : désigne une infection sévère d'une ou plusieurs vertèbres et des disques intervertébraux adjacents.

Sinusite : inflammation de la muqueuse tapissant les sinus.

T

Toxine : substance toxique fabriquée par un organisme vivant tel qu'une bactérie, un champignon, un végétal ou un animal.

Trachéotomie : une ouverture pratiquée de manière chirurgicale dans la trachée haute sous le larynx afin d'assurer une perméabilité permanente des voies aériennes.

Trismus : Contraction tonique des muscles masticateurs, qui détermine l'occlusion forcée de la bouche ; symptôme précoce et caractéristique du tétanos.

Tumeur : Grosseur plus ou moins volumineuse due à une multiplication excessive de cellules normales (**tumeur** bénigne) ou anormales (**tumeur** maligne).

V

Vaginose : Vaginite caractérisée par des leucorrhées grisâtres malodorantes.

Liste des tableaux

Tableau 1 Fréquence d'isolement des bactéries anaérobies strictes au niveau de 4 sites anatomiques.	14
Tableau 2 : les différents niveaux de sécurité biologique.	33
Tableau 3: Les milieux de culture anaérobie et leurs intérêts.	42
Tableau 4 : Tableau résumant la sensibilité et les résistances des bactéries anaérobies strictes aux antibiotiques.....	53
Tableau 5 : Tableau récapitulatif du matériel de routine utilisé au laboratoire de microbiologie.....	56
Tableau 6 : Gram et catalase des BAS.	71
Tableau 7: les différentes associations de bactéries isolées selon leurs types respiratoires.	76
Tableau 8: Repartition des bactéries anaérobies strictes isolées au cours de l'étude.....	79
Tableau 9: Les bactéries anaérobies strictes isolées des services d'ORL, de chirurgie et d'ORL.....	82

Liste des figures

Figure 1: le comportement des bactéries vis-a-vis de l'oxygène et les différents types respiratoires des bactéries.	3
Figure 2 : Schéma récapitulatif des différents bacilles anaérobies Gram positif	7
Figure 3: Schéma récapitulatif des différents bacilles anaérobies strictes Gram négatif.....	8
Figure 4: Schéma récapitulatif des différents Cocci anaérobies strictes.	9
Figure 5: Schéma représentant la classification des bactéries anaérobies strictes.	10
Figure 6 : Bactéries anaérobies des flores commensales.....	13
Figure 7 : Bactéries anaérobies les plus fréquemment isolées dans les principaux sites infectieux.	15
Figure 8 : opisthotonos.	26
Figure 9 : Risus sardonius (rire sardonique).	27
Figure 10 : Boîtes anaérobies de différentes dimensions BD GasPak EZ.	36
Figure 11 : Poches anaérobies BD GasPak EZ.	36
Figure 12 : schéma représentatif d'une jarre anaérobie.	37
Figure 13 : Chambre anaérobie en acier inoxydable	38
Figure 14 : Chambre anaérobie en vinyle.....	38
Figure 15 : Bacteroides fragilis vue au microscope optique après coloration de Gram	39
Figure 16 : Bactérie du genre Fusobacterium vue au microscope optique après coloration de Gram	40
Figure 17 : Clostridium perfringens vue au microscope optique après coloration de Gram. ...	40
Figure 18 : Coloration au vert de malachite " méthode de Schaeffer-Fulton-	41
Figure 19 : Fiche technique relative aux bonnes pratiques de prélèvements anaérobies	59
Figure 20 : Gélose Columbia en poudre.	61
Figure 21 : Flacon de gélose Columbia prêt à l'emploi de 250 ml.	62
Figure 22 : Flacon de gélose Columbia prêt à l'emploi de 180 ml.	62
Figure 23 : Autoclave.	62
Figure 24 : Addition de sang frais à la gélose Columbia.	62
Figure 25: coulage du milieu Columbia au sang frais.	63
Figure 26 : Gélification des milieux Columbia	63
Figure 27: Séchage des milieux Columbia au sang frais au niveau du séchoir.	63
Figure 28: Prélèvement destiné à la recherche des BAS.	64
Figure 29: Ensemencement d'un prélèvement en anaérobiose	64
Figure 30: bords de générateurs d'anaérobiose.	65
Figure 31: Bandelettes indicatrices d'anaérobiose.....	65
Figure 32: Boîte anaérobie grand format.....	66
Figure 33: Boîte anaérobie petit format.....	66
Figure 34: Boîtes et poches anaérobies incubées au niveau de l'étuve à 37°C.	66
Figure 35: Schéma récapitulatif des étapes du diagnostic des BAS.	68
Figure 36 : Schéma représentant la classification des BAS selon le GRAM.	69
Figure 37: Galerie d'identification API 20 A.	70
Figure 38: Galerie API 20 A incubée dans une boîte anaérobie.	70

Figure 39: Répartition des prélèvements reçus selon leurs types.	73
Figure 40: Répartition des prélèvements reçus selon le service expéditeur.	75
Figure 41 : Répartition des prélèvements positifs selon le type respiratoire des bactéries.	77
Figure 42 : Répartition des prélèvements positifs selon la bactérie isolée.	78
Figure 43: Répartition des bactéries anaérobies strictes les plus isolées selon le type de prélèvement.	80
Figure 44: Répartition des bactéries anaérobies les plus isolées selon le service expéditeur. .	81

Table des matières

Introduction

I. Revue de la littérature

Chapitre I : Bactéries anaérobies strictes

1. Bactéries anaérobies strictes.....	1
1.1 Généralités sur les bactéries anaérobies strictes	1
1.1.1. Types respiratoires des bactéries	1
1.1.1.1. Bactéries aérobies strictes	1
1.1.1.2. Bactéries aéro-anaérobies facultatives	1
1.1.1.3. Bactéries anaérobies aéroto­lérantes	1
1.1.1.4. Bactéries microaérophiles	1
1.1.1.5. Bactéries anaérobies strictes	2
1.1.2. Définition des bactéries anaérobies strictes	3
1.1.3. Métabolisme des bactéries anaérobies strictes	3
1.1.3.1. Respiration anaérobie	3
1.1.3.2. Fermentation	4
1.1.4. Définition de l'anaérobiose	4
1.2 Classification des bactéries anaérobies strictes	6
1.2.1. Classification des bactéries anaérobies strictes selon le caractère morpho- tintoriale.....	6
1.2.1.1. Bacilles Gram Positif	6
1.2.1.2. Bacilles Gram Négatif	7
1.2.1.3. Cocci Gram Positif.....	8
1.2.1.4. Cocci Gram Négatif	9
1.2.2. Classification des bactéries anaérobies strictes selon la tolérance à l'oxygène	11
1.3. Pouvoir pathogène des bactéries anaérobies strictes.	12
1.3.1. Bactéries Anaérobies strictes et Flores commensales	12
1.3.1.1. Flore Exogène	12
1.3.1.2. Flores Endogènes	12
1.3.2. Bactéries anaérobies strictes et pathologie humaine.	15
1.3.2.1. Implications infectieuses des bactéries anaérobies strictes.	15
1.3.2.2. Implications non infectieuses des bactéries anaérobies strictes	22
1.4. Principales bactéries anaérobies strictes incriminées en pathologie humaine	25
1.4.1. Bactéries du genre Clostridium	25

1.4.1.1.	Clostridium botulinum et botulisme.....	25
1.4.1.2.	Clostridium Tetani et Tétanos.....	26
1.4.1.3.	Clostridium difficile et colites.....	27
1.4.2.	Bactéries du genre Fusobacterium.....	28
1.4.3.	Bactéries du genre Bacteroides.....	29
1.4.4.	Bactéries du genre Porphyromonas.....	29
Chapitre II : Diagnostic des infections à bactéries anaérobies strictes		
2.	Diagnostic des infections à bactéries anaérobies strictes.....	31
2.1.	Etapes pré-analytique.....	31
2.1.1.	Recueil de l'échantillon.....	31
2.1.2.	Transport du prélèvement au laboratoire.....	31
2.2.	Etapes Analytiques.....	32
2.2.1.	Biosécurité au laboratoire de microbiologie au cours de la recherche des bactéries anaérobies strictes.....	32
2.2.1.1.	Mesures générales.....	34
2.2.1.2.	Protection de la contamination par voie oculaire.....	34
2.2.1.3.	Protection de la contamination par voie buccale.....	34
2.2.1.4.	Protection de la contamination par voie respiratoire.....	34
2.2.1.5.	Protection de la contamination par voie cutanée.....	34
2.2.2.	Obtention de l'anaérobiose in vitro.....	34
2.2.2.1.	Boîtes et poches anaérobies.....	35
2.2.2.2.	Jarres anaérobies.....	36
2.2.2.3.	Chambres anaérobies.....	37
2.2.3.	Isolement et identification des colonies de bactéries anaérobies strictes.....	38
2.2.3.1.	Examen macroscopique.....	39
2.2.3.2.	Examens microscopiques.....	39
2.2.3.3.	Culture.....	41
2.2.3.4.	Identification.....	45
2.3.	Etapes post-analytiques.....	47
Chapitre III : Traitement et prévention des infections à bactéries anaérobies strictes		
3.	Traitement et prévention des infections à bactéries anaérobies strictes.....	48
3.1.	Traitement des infections a bactéries anaérobies strictes.....	48
3.1.1.	Drainage chirurgical.....	48
3.1.2.	Oxygénothérapie Hyperbare.....	48
3.1.3.	Antibiothérapies.....	49

3.1.3.1.	Sensibilité au ATB	50
3.1.3.2.	Résistance aux ATB	50
3.2.	Prévention des infections a bactéries anaérobies strictes	53
II. Etude pratique		
1. Présentation de l'étude		
1.1.	Description de l'étude	55
1.2.	Objectifs de l'étude	55
1.3.	Critères d'inclusion et d'exclusion	55
2. Matériel et méthodes		
2.1.	Matériel	56
2.1.1.	Matériel biologique	56
2.1.2.	Matériel non biologique	56
2.2.	Méthodes	57
2.2.1.	Etapes pré-analytiques	57
2.2.1.1.	Prélèvement et transport	57
2.2.1.2.	Enregistrement des prélèvements	60
2.2.2.	Etapes analytiques	60
2.2.2.1.	Examen macroscopique du prélèvement	60
2.2.2.2.	Examen microscopique	60
2.2.2.3.	Mise en Culture	61
2.2.2.4.	Identification	69
2.2.3.	Etapes post- analytiques	72
2.2.3.1.	Incrimination des bactéries anaérobies strictes en clinique humaine	72
2.2.3.2.	Rendu des résultats	72
3. Résultats et discussion.....		
3.1.	Prélèvements	73
3.1.1.	Répartition des prélèvements reçus selon leurs types	73
3.1.2.	Répartition des prélèvements reçus selon le service expéditeur	74
3.1.3.	Taux de prélèvements positifs	75
3.2.	Bactéries anaérobies strictes isolées	78
3.2.1.	Répartition des bactéries anaérobies strictes isolées par genres et espèces	78
3.2.2.	Bactéries anaérobies strictes les plus isolées	80
Conclusion		
Références bibliographiques		
Annexes		



Introduction

Introduction

Les bactéries anaérobies strictes sont des bactéries hypersensibles à l'oxygène, essentiellement à cause de leur déficit en enzymes responsables de la détoxification des molécules d'oxygène réactives produites en atmosphère aérobie.(1)

Certaines espèces sont retrouvées au sein de la flore endogène qui représente leur principal réservoir et présentent un rôle protecteur, cependant, elles peuvent devenir pathogènes lorsqu'elles migrent vers des sites supposés stériles ou à l'occasion d'un traumatisme ou d'une immunodépression, alors que d'autres espèces, ont une origine exogène.(2,3)

La nature fastidieuse, la difficulté d'identification au sein des flores mixtes, ainsi que la longue durée nécessaire à leur culture, a poussé de nombreux laboratoires à mettre à l'écart la recherche de ce type de bactéries.(4) En effet, leur recherche a longtemps gardé un intérêt épidémiologique au lieu d'un intérêt clinique, car les patients reçoivent généralement une antibiothérapie probabiliste sans attendre les résultats de la culture et de l'identification.

Cependant, il est actuellement devenu de plus en plus important, d'identifier les bactéries anaérobies, à cause de leurs incidences accrues, de la gravité des infections qu'elles provoquent, en particulier chez les patients immunodéprimés tels que les patients atteints d'ulcères du pied diabétique et de leur résistance croissante aux traitements antimicrobiens, depuis les années 2000, en particulier les espèces de *Bacteroides* du groupe *fragilis*.(5)

Plusieurs recherches sont consacrées pour développer des techniques de détection et d'identification simples, rapides et économiques.

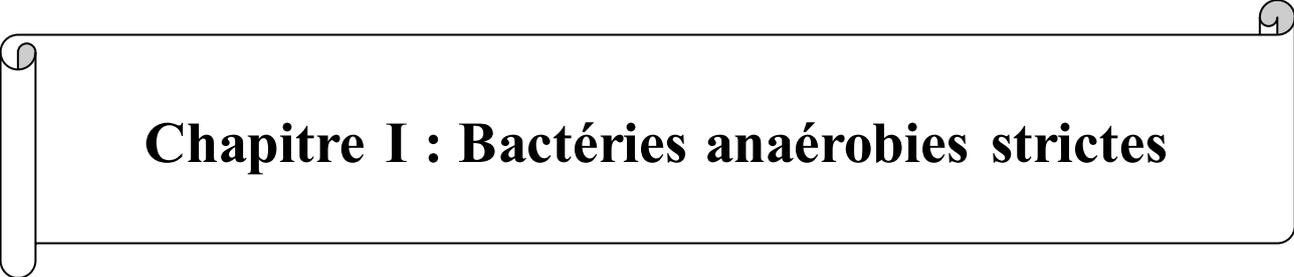
Cette problématique nous pousse à poser de nombreuses questions, notamment :

1. Quel est le degré d'implication des bactéries anaérobies strictes en clinique humaine au niveau du CHU Blida ?
2. Quelle serait la technique de recherche et d'identification la plus adéquate à ce type de bactéries, qui permettrait une culture correcte en utilisant les moyens disponibles au laboratoire ?

Afin d'apporter des réponses à ces questions, nous avons réalisé ce travail qui comporte 2 parties :

- Une revue bibliographique qui comporte les principales caractéristiques des bactéries anaérobies strictes, leurs implications infectieuses et non infectieuses en clinique humaine, les différentes techniques utilisées pour leurs diagnostic, ainsi que leurs sensibilité et résistances naturelles et acquises aux antibiotiques.
- Une partie pratique, où nous avons testé l'efficacité d'une des méthodes les plus simples pour la culture anaérobie, à savoir les boîtes et les poches anaérobies avec générateurs d'anaérobiose.

I. Revue de la littérature



Chapitre I : Bactéries anaérobies strictes

1. Bactéries anaérobies strictes

1.1. Généralités sur les bactéries anaérobies strictes

1.1.1. Types respiratoires des bactéries

Également appelés types énergétiques des bactéries, ils déterminent le rapport des bactéries avec le dioxygène (O₂) de l'air ou de l'eau (6). En effet, l'oxygène est un gaz qui peut être essentiel pour la croissance des bactéries ou très toxique s'il n'est pas neutralisé par les cellules qui l'utilisent.(7)

La connaissance du type respiratoire des bactéries nous oriente dans l'identification de la famille ou du genre auquel appartient la bactérie.

On distingue :

1.1.1.1. Bactéries aérobies strictes :

Ces bactéries ne cultivent qu'en présence d'air et respirent en aérobiose par phosphorylation oxydative.(8)

Lors de la respiration aérobie, l'oxygène est neutralisé en se combinant à l'hydrogène pour former une molécule d'eau en présence de différentes enzymes (catalase, oxydase, superoxyde dismutase). (9)

Par exemple : *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*.(10)

1.1.1.2. Bactéries aéro-anaérobies facultatives :

Ces bactéries peuvent se développer en absence ou en présence d'oxygène, mais leur croissance est optimale en présence de ce dernier, car il permet une production plus importante d'ATP.

En absence d'oxygène, elles utilisent la fermentation ou la respiration anaérobie pour produire de l'énergie.(9)

Par exemple: les staphylocoques, les entérobactéries (*Escherichia Coli*). (10)

1.1.1.3. Bactéries anaérobies aéro-tolérantes :

Ces bactéries n'utilisent pas l'oxygène pour leur croissance mais ce gaz n'a aucun effet sur elles. C'est le cas des Lactobacilles. (9)

1.1.1.4. Bactéries microaérophiles :

Ce sont des bactéries qui ont besoin, pour une croissance optimale, d'une concentration de dioxygène (O₂) < 21%. Il s'agit de bactéries dont les enzymes (en particulier la catalase) ne fonctionnent correctement que sous une pression réduite en dioxygène.

Leur énergie est produite par fermentation.

Bactéries anaérobies strictes

En présence de dioxygène, elles peuvent utiliser la voie oxydative directe mais, dépourvues de systèmes de neutralisation (catalase et peroxydase), l'eau oxygénée qui s'accumule devient bactéricide.(8)

C'est le cas des bactéries du genre *Campylobacter* et *Helicobacter Pylori*.(10)

1.1.1.5. Bactéries anaérobies strictes :

Les bactéries anaérobies strictes (BAS) sont des bactéries hypersensibles à l'oxygène, c'est pour cela qu'elles sont incapables de se multiplier en présence de l'air atmosphérique. C'est le cas de *Clostridium*.(11)

En pratique, afin de connaître le type respiratoire des bactéries, une comparaison est effectuée entre les cultures incubées en aérobiose ou en anaérobiose.

Selon la croissance ou non sur ces milieux, les bactéries sont classées anaérobie stricte, aérobie stricte ou aéro-anaérobie facultative.

Pour une détermination plus précise, on peut cultiver les bactéries à étudier dans un milieu de culture contenant un gradient de pression partielle en oxygène.

On utilise le milieu viande foie coulé en longs tubes fins que l'onensemence du bas vers le haut à l'aide d'une pipette pasteur. Le milieu possède un gradient de concentration en O_2 , où il est plus abondant en surface. L'endroit où se trouvent les colonies dans le tube détermine le type énergétique.(8)

	a) Aérobie stricts	b) Anaérobies facultatifs	c) Anaérobies stricts	d) Anaérobies aérotolestants	e) Microaérophiles
Effet de l'oxygène sur la croissance	Croissance aérobie seulement; la présence de molécules d' O_2 est essentielle.	Croissance aérobie ou anaérobie; croissance optimale en présence de molécules d' O_2 .	Croissance anaérobie seulement; arrêt de la croissance en présence de molécules d' O_2 .	Croissance anaérobie seulement; toutefois, la croissance se poursuit en présence de molécules d' O_2 .	Croissance aérobie seulement; les molécules d' O_2 sont essentielles en faible concentration.
Croissance bactérienne dans un tube contenant un milieu de culture solide					
Explication du modèle de croissance	La croissance a lieu seulement là où une forte concentration de molécules d' O_2 a diffusé dans le milieu.	La croissance est optimale là où la concentration de molécules d' O_2 est la plus élevée, mais elle a lieu partout dans le tube.	La croissance a lieu seulement là où il n'y a pas de molécules d' O_2 .	La croissance est uniforme partout dans le tube; la molécule d' O_2 n'a aucun effet.	La croissance a lieu seulement là où une faible quantité de molécules d' O_2 a diffusé dans le milieu.
Explication des effets de l'oxygène	La présence d'enzymes (catalase et superoxyde dismutase SOD) permet la neutralisation des formes toxiques de la molécule d' O_2 , qui peut alors être utilisée.	La présence d'enzymes (catalase et SOD) permet la neutralisation des formes toxiques de la molécule d' O_2 , qui peut alors être utilisée.	Il n'y a pas d'enzyme permettant la neutralisation des formes toxiques de la molécule d' O_2 ; la molécule d' O_2 n'est pas tolérée.	La présence d'une enzyme, la SOD, permet la neutralisation partielle des formes toxiques de la molécule d' O_2 ; la molécule d' O_2 est tolérée.	Des quantités létales de formes toxiques de la molécule d' O_2 sont produites en présence d' O_2 atmosphérique.

Figure 1: le comportement des bactéries vis-a-vis de l'oxygène et les différents types respiratoires des bactéries.(12)

1.1.2. Définition des bactéries anaérobies strictes :

Louis Pasteur fut l'un des premiers à proposer une définition des bactéries anaérobies strictes, en 1861, “ Les micro-organismes anaérobies sont caractérisés par leur capacité à se développer en absence d'oxygène”.(13)

Selon le professeur Sydney Finegold, célèbre professeur en microbiologie et maladies infectieuses spécialisé dans l'étude des bactéries anaérobies strictes: “les anaérobies sont des bactéries qui ont besoin d'une tension d'oxygène réduite pour se développer et qui ne parviennent pas à se développer (former des colonies) à la surface d'un milieu solide dans 10% de CO₂, dans l'air (18% d'oxygène)”.(5)

En effet, ces bactéries ne peuvent utiliser et vivre au contact du dioxygène, car elles présentent une carence en certains systèmes enzymatiques (catalase, superoxyde dismutase et peroxydase) qui détoxifient les molécules d'oxygène réactives telles que le peroxyde, le superoxyde et diverses espèces radicales.(1)

Cependant, certaines espèces peuvent tolérer une très faible concentration d'oxygène (entre 0,5 et 8 % d'oxygène).

Lorsqu'elles sont exposées à des concentrations plus élevées, certaines de ces bactéries forment des endospores qui sont capables de survivre dans des conditions aussi extrêmes.

Les bactéries anaérobies strictes sont des composantes majeures de la flore normale des muqueuses, en particulier de la bouche, des voies digestives basses et du vagin, où elles agissent comme une défense non spécifique en entrant en compétition avec les agents pathogènes potentiels pour les nutriments et les sites de fixation. Les produits finaux de leur métabolisme et les acides gras libres sont toxiques pour les autres bactéries et inhibent la colonisation par de nouveaux organismes.

Cette propriété (résistance à la colonisation) est très importante chez les patients admis à l'hôpital qui peuvent autrement être contaminés par des bactéries multirésistantes. (14)

Cependant, les bactéries anaérobies strictes peuvent provoquer une maladie lorsqu'elles se multiplient de manière excessive et qu'elles remplacent la flore normale ou bien lorsque les barrières muqueuses sont détruites et qu'elles envahissent les cavités stériles de l'organisme.(11)

1.1.3. Métabolisme des bactéries anaérobies strictes :

Les bactéries anaérobies strictes ne possèdent ni cytochrome oxydase, ni catalase (sauf quelques espèces telles que *Bacteroides fragilis* et *Propionibacterium acnes*), ni cycle de Krebs (3), c'est pour cela que la production d'énergie chez ces bactéries se fait soit par fermentation soit par respiration anaérobie.(15)

1.1.3.1. Respiration anaérobie :

Dans ce cas, la synthèse d'ATP résulte de réactions d'oxydo-réduction, avec transfert d'électrons au sein d'une chaîne de transporteurs d'électrons qui implique des donneurs

Bactéries anaérobies strictes

d'électrons (le principal donneur étant le glucose) et dans lesquelles l'accepteur final des électrons est un composé minéral autre que le dioxygène.(15)

Ces accepteurs d'électrons peuvent être :

-Des composés soufrés (sulfate SO_4^{2-}) : c'est le cas des bactéries sulfato-réductrices par exemple *Desulfovibrio desulfuricans* et certaines espèces du genre *Clostridium*.

Ce type de respiration entraîne la production d'ion sulfite (S^{2-}) ou sulfite d'hydrogène (H_2S).

-Le dioxyde de carbone : c'est le cas des bactéries méthanogènes, par exemple les méthanocoques.

-Les nitrates : c'est le cas par exemple de certaines bactéries du genre *Geobacter* qui utilisent le nitrate ou le fumarate pour donner des nitrites sous l'action de l'enzyme nitrate réductase. Ce processus est important pour les plantes car les bactéries anaérobies du sol leurs fournissent l'azote nécessaire à leur croissance.

-Le fer et la manganèse : c'est le cas par exemple de l'espèce *Geobacter metallireducens*.(16)

Ces accepteurs d'électrons ont un potentiel d'oxydo-réduction inférieur à celui de l'oxygène, donc ce processus conduit à une production d'énergie inférieure à celle produite lors de la respiration aérobie même lorsque le même substrat est utilisé. (17)

1.1.3.2. Fermentation :

Dans ce cas, aucune chaîne de transporteurs d'électrons n'est impliquée et l'accepteur final d'électrons est un composé organique.

Le substrat de ces réactions peut être soit unique, quand il s'agit d'un sucre, ou bien multiple quand il s'agit d'acides aminés et dans ce cas l'acide aminé sert d'accepteur et de donneur d'électrons.(18)

Selon les produits finaux obtenus, on distingue plusieurs types de fermentation :

-La fermentation butyrique : c'est le cas, par exemple, de *Clostridium tyrobutyricum*.

Les produits finaux de cette réaction sont : l'éthanoate, l'acide butanoïque, le CO_2 et le H_2 .

-La fermentation acétonobutylique : concerne certaines bactéries du genre *Clostridium*.

Les produits finaux de cette réaction sont : le butanol, l'acétone, le CO_2 et le H_2 .

-La fermentation propionique : concerne le *Propionibacterium* et le *Clostridium propionicum*.

Les produits terminaux de cette réaction sont : l'éthanoate, le propionate, le H_2 et le CO_2 .(19)

1.1.4. Définition de l'anaérobiose :

Elle correspond aux conditions dans lesquelles les micro-organismes anaérobies se développent en absence d'oxygène.

Bactéries anaérobies strictes

Ces conditions peuvent être retrouvées dans les intestins des animaux, les sédiments profonds sous la croûte terrestre, les profondeurs des océans, les marécages et les rivières à faible courant.(20)

Le sol, la surface de la peau et la cavité buccale sont aussi capables d'abriter des bactéries anaérobies strictes, malgré leurs fortes teneurs en oxygène. Ceci est possible car ces bactéries trouvent des endroits sans oxygène appelés microenvironnements qui détiennent des caractéristiques uniques et hautement spécialisées.

Par exemple, dans le sol les anaérobies stricts trouvent de petites poches entre les particules du sol qui ne contiennent pas d'oxygène et les anaérobies stricts buccaux trouvent des microenvironnements entre la gencive et les dents.

Souvent, ces endroits ont été rendus anaérobies par des bactéries aérobies qui ont d'abord consommé tout l'oxygène, rendant ainsi les conditions favorables au développement des anaérobies stricts.

La manipulation et la culture des bactéries anaérobies strictes doit se faire dans une atmosphère anaérobie qui est généralement obtenue par l'utilisation d'un catalyseur au Palladium et d'un mélange de gaz contenant 5 % de H₂, 5 à 15 % de CO₂ et 80 à 90% de N₂.

-Le H₂ réagit avec le catalyseur pour former de l'hydrogène radicalaire qui réagit à son tour avec le dioxygène du milieu pour former de l'eau.

-Le CO₂ est un élément fondamental à la croissance de nombreuses bactéries.

-Le N₂ est un gaz inerte qui sert de gaz de remplissage.(18)

Ces milieux doivent également présenter un potentiel d'oxydo-réduction faible, c'est pour cela que des agents réducteurs sont utilisés.

L'anaérobiose peut être vérifiée par des indicateurs colorés tels que le bleu de méthylène et la résazurine.(21)

1.2. Classification des bactéries anaérobies strictes

1.2.1. Classification des bactéries anaérobies strictes selon le caractère morphotinctoriale

Les bactéries anaérobies strictes sont classées selon leur morphologie comme suit :

1.2.1.1. Bacilles Gram Positif

1.2.1.1.a. Bacilles Gram Positif non sporulés :

Les bacilles gram positif non sporulés regroupent de nombreux genres bactériens appartenant à deux Phylum : Actinobacteria et Firmicutes. Ils font partie de la flore normale endogène, orale, intestinale, vaginale et cutanée et sont des Pathogènes opportunistes.

Quelques exemples :

- **Bifidobacterium** : ce genre fait partie du microbiote intestinal humain, surtout chez les enfants (notamment *B. longum*) et est essentielle à son homéostasie, il est rarement pathogène sauf dans les septicémies ou dans les infections polymicrobiennes.

Ces bactéries présentent des bifurcations ou ébauches de ramifications symétriques.

- **Mobiluncus** : deux espèces de ce genre (*M. curtisii* et *M. mulieris*) sont des hôtes normaux du microbiote vaginal.
- **Propionibacterium** : ce sont des bacilles corynéformes immobiles, qui font partie de la flore cutanée exemple : *P. acnes*, *P. Propionicum*, *P. avidum*, *P. granulosum*.
Le *Propioni bacterium* a récemment connu une révision de sa nomenclature en *Cutibacterium* (4).
- **Eubacterium** : ce sont des bacilles droits immobiles, non sporulés, et leur taille varient selon l'espèce.
- **Actinomyces** : les espèces de ce genre sont immobiles, polymorphes, le plus souvent droits ou légèrement incurvés avec des renflements terminaux en massue. Quelques espèces ont une forme coccobacillaire: *A. meyeri*, *A. odontolyticus*... . Les plus isolées en clinique humaine sont: *A. europaeus*, *A. georgiae*, *A. israelii*, *A. meyeri*, *A. naeslundii*, *A. neuui*, *A. odontolyticus*, *A. oris*, *A. radingae*, *A. turicensis*, *A. urogenitalis* et *A. viscosus*.(22)

1.2.1.1.b. Bacilles Gram Positif Sporulés - *CLOSTRIDIACEAE*

Correspondent principalement au genre *Clostridium* qui compte plus de 200 espèces. Ce genre, très hétérogène, comprend des bacilles à Gram positif mobiles par des ciliatures péritriches (sauf *C. perfringens*, *C. ramosum* et *C. innocuum* qui sont immobiles), formant des spores souvent déformantes terminales ou subterminales, leurs permettant une très grande résistance à la chaleur, à la dessiccation et aux traitements antiseptiques.

Les *Clostridium* sont très répandus dans l'environnement, notamment au niveau du sol. Ils ont un métabolisme strictement anaérobie, ne produisent ni catalase ni oxydase et sont classés en

6 groupes selon leurs : fermentations des sucres, pouvoir protéolytique, utilisation des AA et d'autres substrats (Purine, Pyridine). Tableau en -Annexe 01-.

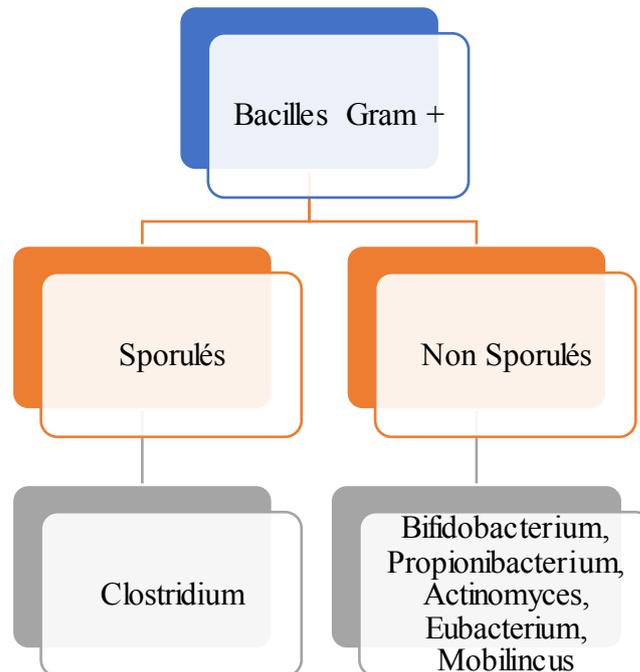


Figure 2 : Schéma récapitulatif des différents bacilles anaérobies Gram positif.(inspiré de (2))

1.2.1.2. Bacilles Gram Négatif :

La majorité des espèces des bacilles gram négatif font partie de la flore endogène humaine dans la cavité orale, gastro-intestinale et vaginale. Elles sont souvent isolées des infections polymicrobiennes.

Les principaux genres appartenant aux BGN sont:

- **Bacteroides (Du groupe Fragilis) :** ce sont des Bacilles Gram Négatif, présents à quantité élevée dans l'intestin.

Ces germes sont responsables d'infections mixtes associant des bactéries aérobies et/ou anaérobies et sont le genre le plus souvent isolé dans les septicémies à anaérobies, les plus virulentes et les plus résistantes au traitement par antibiotiques.

Les espèces les plus fréquentes de ce genre sont : *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus* suivi par *B. caccae*, *B. dorei*, *B. eggerthii*, *B. finegoldii*, *B. intestinalis*, *B. massiliensis*, *B. nordii*, *B. salyersae*, *B. stercoris*, *B. uniformis* et *B. vulgatus*.(2)

- **Fusobacterium :** ce sont des BGN immobiles, capsulés, fins à extrémité effilée (*F. nucleatum*) soit polymorphe, en navette ou coccobacille.

Les deux espèces *F. nucleatum* et *F. necrophorum* sont les plus importantes en clinique.

- **Prevotella** : est elle aussi responsable d'infections mixtes. Principales espèces : *Prevotella melaninogenica*, *P. denticola*, *P. tanneriae*, *P. intermedia*, *P. buccae*, *P. bivia*, *P. disiens*, *P. nigrescens* et *P. corporis*
- **Porphyromonas** : les espèces les plus retrouvées en clinique humaine dans ce genre sont: *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. asaccharolytica*, *P. somerae*, *P. bennonis* et *P. catoniae*. (3)

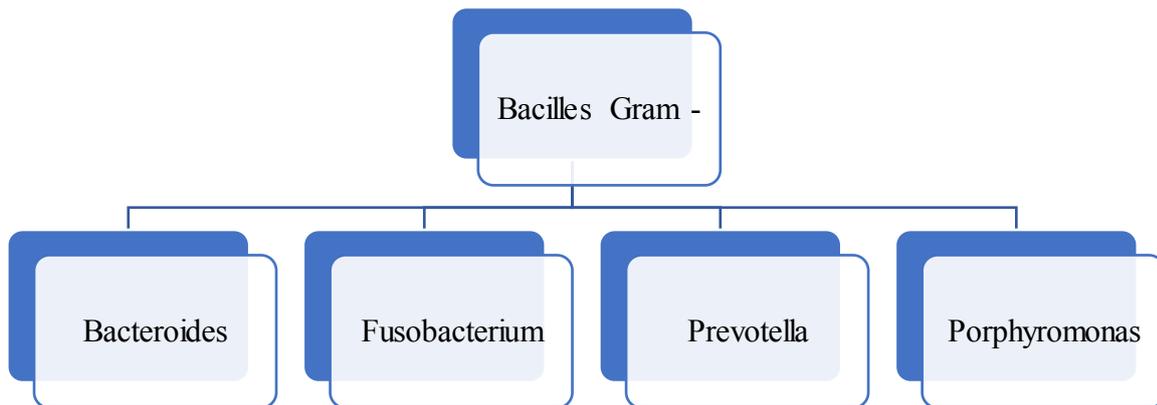


Figure 3: Schéma récapitulatif des différents bacilles anaérobies strictes Gram négatif. (inspiré de (2))

1.2.1.3. Cocci Gram Positif

Les Cocci gram positif sont parmi les bactéries anaérobies strictes les plus fréquemment isolées dans les prélèvements en clinique humaine (25 à 30 %).

Ces germes font partie du microbiote humain au niveau de la cavité orale, des voies respiratoires supérieures, du tractus digestif, de la flore vaginale et de la peau.

Ils sont souvent isolés dans les infections polymicrobiennes mais sont également responsables d'infections monomicrobiennes.

Les principaux genres qu'on regroupe dans les Cocci gram positif sont :

- **Peptococcus.**
- **Peptostreptococcus.**
- **Anaerococcus.**
- **Anaerosphaera.**

1.2.1.4. Cocci Gram Négatif :

Les Cocci gram négatif sont des bactéries immobiles, non sporulées et regroupées en paire.

On y retrouve les genres suivants :

- **Veillonella** : représente 5 à 10 % des bactéries de la flore salivaire.

On les retrouve sous forme de Petits Cocci formant des colonies punctiformes dont l'espèce la plus isolée est *V. parvula*.

D'autres genres peuvent être isolés en clinique humaine (exemple : Acidaminococcus, Megaspheera, Anaéroglobus, Negativicoccus). (3).

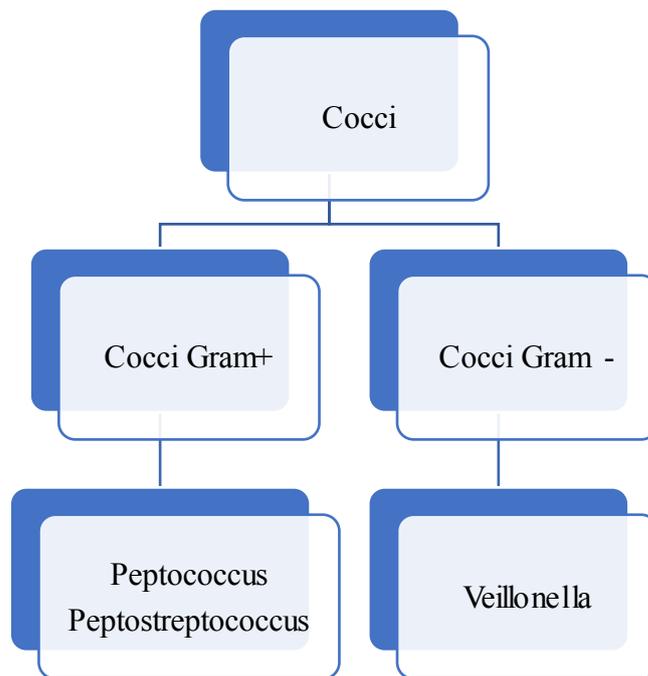


Figure 4: Schéma récapitulatif des différents Cocci anaérobies strictes. (inspiré de (2))

Le schéma ci-dessous récapitule la classification générale des bactéries anaérobies strictes selon leur caractère morpho-tinctoriale.

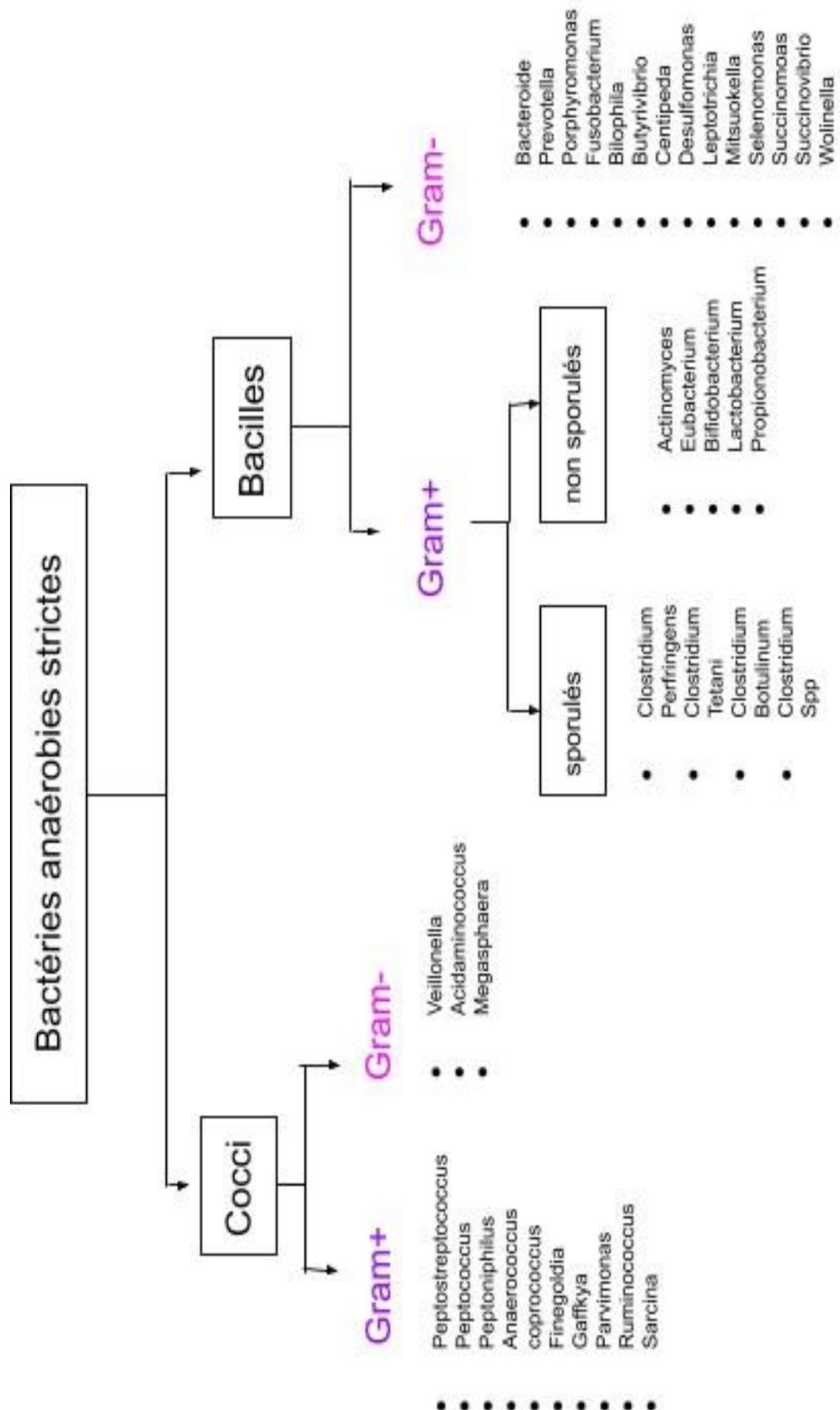


Figure 5: schéma représentant la classification des bactéries anaérobies strictes.(inspiré de (2))

1.2.2. Classification des bactéries anaérobies strictes selon la tolérance à l'oxygène :

Une autre manière qui permet de classer les bactéries anaérobies est selon leur sensibilité à l'oxygène qui diffère d'une espèce à une autre:

- EOS: espèces extrêmement sensibles à l'oxygène ne pouvant survivre que quelques secondes après contact avec O₂. Exemple: Tréponème Anaérobies.
- BAS stricto-sensu dont la multiplication est inhibée par de faibles teneurs en O₂ (0.1 - 0.5 %) et une exposition qui ne dépasse pas 60 minutes. Exemple: *Fusobacterium Nucleatum*.
- Bactéries dont la multiplication est inhibée, si la concentration en oxygène est supérieure à 2-8% mais qui peuvent survivre à une exposition de 80 minutes à l'oxygène.
- Bactéries anaérobies aérotoleérantes, exemple : *Clostridium Tertium*, *Propionibacterium Acnes*.(23)

Le schéma en Annexe-2- montre la durée de tolérance des bactéries à l'oxygène.

1.3. Pouvoir pathogène des bactéries anaérobies strictes.

1.3.1. Bactéries Anaérobies strictes et Flores commensales

1.3.1.1. Flore Exogène

Les BAS sont fréquemment retrouvées sous forme de spores dans les sols et les eaux (douces et salées), mais aussi à la surface des végétaux et peuvent pénétrer dans l'organisme par voie cutanée : blessure, brûlure, escarre, ou plus rarement par ingestion. Les principaux genres trouvés dans le milieu extérieur sont les Bacilles gram positif sporulés type *Clostridium*.

1.3.1.2. Flores Endogènes

Les bactéries anaérobies strictes sont retrouvées dans les différentes cavités du corps humain, où elles sont parfois plus nombreuses que les bactéries aérobies. Leur rôle principal est de protéger l'organisme contre les agents pathogènes, mais parfois elles peuvent eux même le devenir :

Quand elles remplacent la flore normale en se multipliant d'une façon exagérée.

Quand elles envahissent les cavités ou les tissus stériles de l'organisme. (24)

La composition de la flore varie en fonction des sites anatomiques, les principaux sites colonisés sont :

- Sphère Bucco Pharyngée

Elle héberge les genres suivants : *Fusobacterium (F. Nucleatum)*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Eubacterium*, *Actinomyces* et des Cocci à gram positif trouvés entre les papilles de la langue, sur la plaque dentaire et surtout dans le sillon gingival.

- Flore Cutanée

Elle est caractérisée par la présence de deux principaux genres : *Propionibacterium* et *Peptostreptococcus*, cependant elle peut être contaminée par la flore fécale (escarre, pied du diabétique).

P. acnes et *P. granulosum* sont présents au niveau des follicules pileux, dans les zones riches en sébum mais *P granulosum* est présent en quantité dix fois moins grande.

P. avidum est plus souvent isolé des zones cutanées humides, ces bactéries, Produisent des Triglycérides à partir d'acides gras pour protéger la peau contre la multiplication de germes exogènes.

- Nez

Composition proche de la flore cutanée.

- Tractus digestif

Les micro-organismes anaérobies stricts présents dans le tube digestif sont de 10 à 1000 fois plus nombreux que les aérobies. Leur quantité est plus faible dans l'œsophage, estomac et duodénum cause de l'acidité élevée de ces derniers et leur haut potentiel ox/red.

Bactéries anaérobies strictes

Cependant, plus on descend vers le côlon plus leur quantité augmente avec une concentration de 10^{11} bactéries/g de fèces. On y retrouve les genres suivants : Bacteroides, Bifidobacterium, Clostridium.

- Sphère Vaginale

La flore vaginale normale de la femme est composée de Lactobacillus, et de bactéries anaérobies strictes notamment de Cocci à gram positif et de bacille a gram négatif (*Prevotella disiens*, *P. bivia*). Les lactobacillus possédant la catalase jouent un rôle important dans l'équilibre de la flore, ils produisent également à partir du glycogène de l'acide lactique qui fait baisser le Ph jusqu'à 4.5 et cette acidité protège la flore contre la multiplication d'autres germes.

En cas de déséquilibre (Absence de la flore inhibitrice) on peut trouver d'autres genres telles que : Fusobacterium, Bacteroides, Actinomyces, Peptostreptococcus...etc.(25)

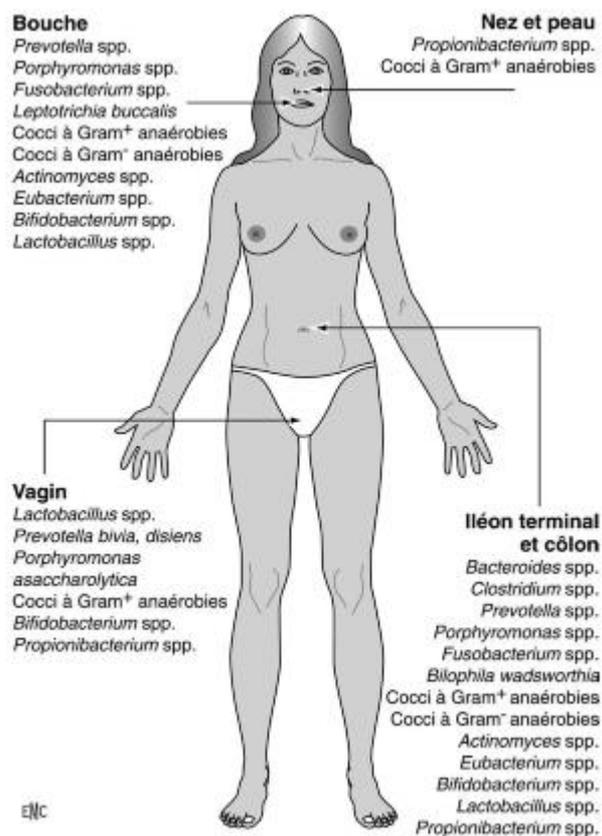


Figure 6 : Bactéries anaérobies des flores commensales.(25)

Bactéries anaérobies strictes

Tableau 1 Fréquence d'isolement des bactéries anaérobies strictes au niveau de 4 sites anatomiques. (2)

Bactéries Anaérobies Strictes	Peau	Cavité	Orale	Intestin, Vagin
Cocci Gram+				
Anaerococcus	-	+	+	+
Coprococcus	-	-	+	-
Finegoldia	+	+	+	+
Gaffkya	-	-	+	-
Parvimonas	-	-	-	+
Peptococcus	+	-	+	+
Peptostreptococcus	+	+	+	+
Peptoniphilus	+	+	+	+
Ruminococcus	-	-	+	-
Sarcina	-	+	+	+
Cocci Gram -				
Acidaminococcus	-	-	+	+
Megasphaera	-	-	+	-
Veillonella	-	+	+	+
Bacille Gram+				
Actinomyces	-	+	+	+
Bifidobacterium	-	+	+	+
Clostridium	-	-	+	+
Eubacterium	-	+	+	+
Lactobacillus	-	+	+	+
Propionibacterium	+	+	+	+
Bacille Gram-				
Bacteroides	-	+	+	+
Bilophila	-	-	+	+
Butyrivbrio	-	-	+	-
Centipeda	-	+	+	?
Desulfomonas	-	-	+	-
Fusobacterium	-	+	+	+
Leptotrichia	-	+	+	-
Mitsuokella	-	+	+	?
Porphyromonas	-	+	+	-
Prevotella	-	-	+	+
Selenomonas	-	+	?	-
Succinomonas	-	-	+	-
Succunivbrio	-	-	+	-
Wolinella	-	+	+	-

Présent (+), Absent(-), Présence Incertaine (?)

1.3.2. Bactéries anaérobies strictes et pathologie humaine.

1.3.2.1. Implications infectieuses des bactéries anaérobies strictes.

Le pouvoir pathogène des BAS est variable avec divers tableaux cliniques pouvant être parfois très évocateurs avec absence de notion de maladie contagieuse ou épidémique, sauf dans le cas du botulisme (intoxication alimentaire).(3)

Les BAS sont responsables de plusieurs types d'infections (infections du SNC, infections de la sphère ORL, infections buccodentaires, infections pulmonaires, infections de la peau et des tissus mous, infections ostéo-articulaires, infections abdominales, infections gynécologiques et bactériémies) avec une variation de la nature du germe selon le site infectieux.(25)

Certaines bactéries anaérobies strictes sont considérées comme pathogènes strictes comme : *C.botulinum* et *C.tetani*. (Voir Chapitre 4)

Ces infections sont souvent polymicrobiennes car elles s'associent très souvent entre elles et avec des bactéries aéro-anaérobies facultatives, pour entretenir une faible pression d'oxygène dans les tissus et pouvoir se multiplier dans un milieu exempt d'oxygène.

Les principaux facteurs de pathogénicité des bactéries anaérobies strictes sont la production de toxines, la libération d'enzymes (protéase) qui perturbent les réactions immunitaires ou par la production des lipopolysaccharides.(3)

Tableau 4 Bactéries anaérobies les plus fréquemment isolées dans les principaux sites infectieux.

	Cocci à Gram positif	Bacilles à Gram positif			Bacilles à Gram négatif			
	<i>Pepto-streptococcus</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Fusobacteria</i>	<i>Porphyromonas</i>	<i>Prevotella</i>
Infections ostéoarticulaires :								
-arthrites	+++ (N)		++	++ (N)	+	+		+
-ostéomyélites	+++ (N)	+++	++	++ (N)	+	+		+
Infections neuroméningées :								
-abcès du cerveau	+++	++		+	++	++		++
-méningite	+		+	+		+		
Infections des parties molles :								
-dermohypodermite aiguë	+		+++		++	++		
-myonécrose	+		+++		++	++		
-morsures	+++ (A, H)				+	+++ (A, H)	+	+++ (H > A)
Infections de voies aériennes supérieures :								
-infections dentaires	+++	++			++	+++	+++	++
-angines, amygdalite		++			+	+++ (V,L)		+++
-otite	+++			++		+++	++	+++
-sinusite	+++				+	+++	++	+++
Infections abdominales :								
-péritonites	++	++	++		+++	++	+	++
-appendicites	++	++	++		+++	++	+	++
-abcès hépatiques	+	++	++		+++	+++		+++
-infections biliaires	+++		++		+++			
Infections gynécologiques	+++		+		+	+++	+	+++

N : nosocomial ; V : angine de Vincent ; L : angine de Lemierre ; A : animale ; H : humaine.

Figure 7 : Bactéries anaérobies les plus fréquemment isolées dans les principaux sites infectieux.(25)

1.3.2.1.a. Infections du système nerveux central

Les infections du SNC sont le plus souvent secondaires à une complication d'infection ORL (sinusite, otite moyenne...), d'infections dentaires ou à la suite d'une opération chirurgicale.(23)

➤ Abscès cérébral :

Défini par la présence d'un amas de pus dans le cerveau, les abcès cérébraux sont en général des infections peu fréquentes.

Les BAS sont isolées seules dans 31% à 51% des cas et dans 12% à 41% des cas associées à des bactéries aérobies.

Les principales BAS incriminées sont :

- *Fusobacterium spp*
- *Prevotella spp*
- *Peptostreptococcus spp*
- *Bacteroides spp*
- *Actinomyces spp*(25)

Les symptômes de l'abcès cérébral dépendent le plus de sa localisation et non pas de la bactérie en cause (fièvre, céphalées, convulsions...).

Afin d'établir le diagnostic, une IRM est effectuée pour localiser l'abcès, ensuite, sa ponction permet de l'évacuer et d'analyser le contenu pour identifier la ou les bactéries responsables.

La recherche du foyer ORL et son prélèvement si présent est systématiquement faite pour augmenter les chances d'isoler le germe en cause.

La prise en charge de l'abcès cérébral est médicale, le patient est traité par une antibiothérapie adaptée pendant 4 à 8 semaines après sa ponction (évacuation du pus) et parfois même une injection locale de l'antibiotique.

L'évolution des abcès est suivie par des scanners.(26)

➤ Méningites :

La méningite est une inflammation des méninges qui peut toucher l'adulte et l'enfant.

Les infections ORL et les infections pulmonaires sont des facteurs prédisposants.

Contrairement aux abcès cérébraux, les méningites sont des infections fréquentes mais l'implication des BAS est très rare. Dans la majorité des cas, ces infections sont mono microbiennes.

Les BAS isolées sont :

- *Propionibacterium acnes*.
- *Bacteroides spp*.
- *Peptostreptococcus spp*.
- *Fusobacterium spp*.
- *Clostridium spp*.

Les symptômes les plus fréquents sont : une fièvre, des céphalées violentes, une raideur dans la nuque, des vomissements...

Leur prise en charge repose sur les mêmes principes que les abcès cérébraux (des antibiotiques mais à diffusion méningée).(25)

1.3.2.1.b. Infections bucco-dentaires

Les BAS sont impliquées dans la plupart des infections dentaires ;

- La gingivite : une inflammation de la gencive.
- La périodontite: une perte de l'os alvéolaire et elle est associées à des facteurs prédisposants dans la majorité des cas (diabète, immunodépression...)(25)

Ces infections sont polymicrobiennes et leur évolution se fait en 3 étapes :

1. Inoculation (bactéries aérobies).
2. Cellulite (mixte).
3. Abscess (bactéries anaérobies).(27)

Les germes les plus fréquemment retrouvés sont :

- *Porphyromonas gingivalis et endodontalis.*
- *Fusobacterium nucleatum.*
- *Prevotella intermedia.*
- *Peptostreptococcus micros.*

Et finalement pour une prise en charge efficace il faut non seulement instaurer une antibiothérapie mais aussi éliminer le facteur étiologique (une carie par exemple). (25)

1.3.2.1.c. Infections de la sphère ORL

- Angines et amygdalites (angine de Vincent) :

Les BAS sont présentes à l'état de saprophyte dans le pharynx, c'est pour cela que leur incrimination dans ce type d'infection n'est pas facile à établir.(25)

Malgré ça, plusieurs formes cliniques ont été identifiées dont la plus fameuse est **l'angine de Vincent** qui est une inflammation subaiguë caractérisée par un aspect ulcéro-nécrotique.

Elle survient généralement lorsque l'état bucco-dentaire est mauvais, c'est l'association de deux germes fuso-spirillaires :

- *Treponema vincentii.*
- *Fusobacterium necropherum.*

Les symptômes les plus fréquents sont une fièvre légère, une douleur unilatérale des amygdales, une haleine fétide et en examinant l'oropharynx on trouve une ulcération recouverte par une fausse membrane grisâtre a bords irréguliers et surélevés.

Une étude bactériologique du prélèvement permet de confirmer le diagnostic.(28)

- Syndrome de Lemierre

Le syndrome de Lemierre est une affection très rare mais grave qui peut mettre en jeu le pronostic vital, le *Fusobacterium necropherum* est la bactérie responsable.

C'est l'association d'une angine ulcéro-nécrotique compliquée de la veine jugulaire interne et d'autres infections, le plus souvent pulmonaires.(29)

Les symptômes de cette affection sont la fièvre persistante, tachycardie, des douleurs, une gêne à la rotation de la tête et des signes respiratoires en cas d'atteinte pulmonaire.

L'imagerie et notamment l'écho doppler joue un rôle important dans le diagnostic de la thrombose et il faut rechercher systématiquement des métastases septiques et surtout pulmonaires.

Pour le traitement on associe une antibiothérapie à un traitement anticoagulant.(30)

1.3.2.1.d. Infections pulmonaires

Les bactéries anaérobies strictes sont les prédominantes dans la flore normale de la cavité buccale et des voies respiratoires supérieures, et la plupart des pneumonies sont dues à l'inhalation de cette flore.

L'aspiration et par la suite la contamination par le contenu oropharyngé peut être le résultat d'une altération de la conscience, d'une dysphagie, ou la présence de dispositifs mécaniques tels que des équipements d'intubation.(25)

La mauvaise hygiène buccale est associée à une augmentation de la charge bactérienne des anaérobies, et la présence d'aérobies ou de tissus nécrotiques fait baisser le pH, ce qui à son tour facilite la croissance des anaérobies.

Les BAS sont impliquées aussi dans 90% des pneumonies, il a même été découvert que 59% des patients intubés hébergeaient des BAS dans des prélèvements endotrachéaux et que les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique étaient moins fréquentes lors d'une ventilation par trachéotomie que lors d'une intubation oro-trachéale ce qui confirme l'origine buccale de ces bactéries.(31)

Les germes les plus isolés sont :

- *Prevotella spp.*
- *Porphyromonas spp.*
- *Fusobacterium spp.*(23)

La prise en charge nécessite une bonne toilette pulmonaire et des thérapies antimicrobiennes.

1.3.2.1.e. Infections de la peau et des tissus mous

➤ Myonécrose (gangrène gazeuse) :

La gangrène gazeuse est une infection à progression rapide, parfois rapidement mortelle due dans sa forme la plus classique à *Clostridium perfringens* mais d'autres anaérobies peuvent être trouvés dans 10 % des cas:

- *Bacteroides spp.*
- *Clostridium spp.*
- *Fusobacterium spp.*(25)

Elle se manifeste généralement par une apparition soudaine de douleur dans la région d'une plaie, elle peut apparaître si soudainement qu'elle suggère une catastrophe vasculaire. La douleur augmente régulièrement en intensité mais reste localisée dans les zones infectées, se propageant au fur et à mesure que l'infection s'étend. Peu après, on observe un œdème local ainsi qu'un mince exsudat hémorragique, on observe classiquement une augmentation marquée du pouls et une légère élévation de la température.

La zone œdémateuse est très sensible ; la peau est tendue, blanche, souvent avec des zones de décoloration bleue, et un peu plus froide que la normale. Il y a une certaine décoloration bronzée qui augmente avec le temps, l'écoulement séreux devient plus abondant ; la peau devient plus sombre et des bulles remplies de liquide rouge foncé ou violacé apparaissent, le gaz est généralement présent surtout dans les derniers stades.

La prise en charge de cette affection est le débridement chirurgical précoce et complet de tous les tissus concernés. Cela implique souvent l'amputation en cas de myonécrose d'un membre.

L'association b-lactamines et inhibiteurs de b-lactamases semble l'antibiothérapie la plus appropriée.

L'oxygénothérapie hyperbare doit être envisagée lorsque la résection complète des tissus infectés n'est pas possible.(26)

➤ Fasciite nécrosante :

La fasciite nécrosante est une infection peu fréquente mais potentiellement mortelle.

Elle se manifeste généralement de manière aiguë.

Les bactéries responsables de ce type d'infection sont :

- *Bacteroides fragilis*.
- *Peptostreptococcus spp.*

En association avec des bactéries aéro-anaérobies facultatives. (25)

L'affection trouve généralement son origine dans des blessures musculo-squelettiques mais peut également apparaître dans une plaie opératoire ou même après une blessure banale.

Une caractéristique pathognomonique est la nécrose sous-cutanée et faciale, avec saignée de la peau, l'apparition soudaine de douleurs et de gonflements, avec ou sans frissons et fièvre, et dans les 24 heures il peut y avoir un phlegmon considérable, généralement accompagné d'un érythème ou d'une cellulite.

On constate souvent une décoloration brune de la peau, et une gangrène cutanée peut être observée, en particulier dans un stade tardif de la maladie.

La douleur est progressivement remplacée par un engourdissement à cause de la compression et de la destruction des nerfs cutanés et des vésicules remplies de liquide apparaissent dans la zone de cellulite et la peau sous-jacente devient bleu-noir ; cette nécrose est due à une thrombose des vaisseaux nutritifs qui traversent les tissus profonds concernés.

La prise en charge est le plus souvent chirurgicale associant une antibiothérapie adaptée et une amputation si nécessaire.(32)

➤ Morsures :

La cavité buccale des animaux et des humains contient de très nombreux germes anaérobies stricts.

Les BAS sont trouvées dans 40% des cas après une morsure animale et dans 60% des cas après une morsure humaine.

Les germes récupérés à la suite de ces infections sont :

- *Prevotella spp.*
- *Porphyromonas spp.*
- *Fusobacterium spp.*
- *Bacteroides Spp.*
- *Peptostreptococcus spp.* (25)

Et un très grand nombre d'espèces bactériennes aérobies, souvent associées, sont retrouvées dans les prélèvements. L'antibioprophylaxie n'est pas systématique et doit être discutée au cas par cas, en prenant en compte les facteurs de risque : animal mordeur, localisation de la morsure et le délai de prise en charge.

Le traitement des blessures par morsure fraîche implique un débridement complet des tissus dévitalisés et une irrigation abondante de la blessure.(33)

1.3.2.1.f. Infections ostéo-articulaires

Les infections ostéo-articulaires regroupent toutes les infections qui touchent les os et les articulations.

Ce sont des pathologies graves pouvant mettre en jeu le pronostic fonctionnel et même vital du patient.

Le rôle des bactéries anaérobies strictes dans ce type d'infection est plus important que ce qui est généralement suspecté, et les situations cliniques dans lesquelles elles peuvent être diagnostiquées sont diverses :

- Les arthrites.
- Les spondylodiscites.
- Les ostéites.
- Les ostéomyélites.
- Les infections sur prothèse.
- Les infections post traumatiques.

50% de ces infections sont mono microbiennes, et les bactéries les plus fréquemment incriminées sont *Propionibacterium acnes*, *Fusobacterium spp* et *Bacteroides spp*.

Une contamination environnementale (fracture ouverte) ou une ischémie tissulaire (gangrènes) sont des modes possibles de contamination mais l'existence d'une plaie chronique est le mode le plus fréquent.

La prise en charge médicale de ces infections est un peu difficile à cause de la faible diffusion des antibiotiques dans l'os surtout en cas de présence de matériel (prothèse, clou, vis...) car les bactéries se fixent dessus et forment un biofilm (protecteur) qui rend plus difficile leur diffusion c'est pour cela le traitement chirurgical doit être associé.(34)

1.3.2.1.g. Infections abdominales

➤ Péritonites :

La formation de péritonite qui est une inflammation de la membrane qui entoure les viscères de la cavité abdominale est le plus souvent favorisée par le passage des bactéries de la flore intestinale dans la cavité péritonéale et ceci est dû à des maladies ou des lésions du tractus gastro-intestinal, des lésions de l'arbre biliaire et la chirurgie abdominale.

Ces infections sont généralement polymicrobiennes et les BAS sont isolées dans 50 à 90% des cas (25):

- *Bacteroides fragilis*.
- *Clostridium spp*.
- Et les Cocci G+ .(23)

Cependant il n'y a aucune corrélation entre la gravité de l'infection et un organisme spécifique, y compris *Clostridium perfringens*.

Cette affection est caractérisée par une douleur intense associée à une contracture des muscles connue sous le nom de "ventre de bois", des vomissements, arrêt du transit intestinal et une fièvre.

La prise en charge des péritonites est une urgence médicale ; une hospitalisation et une antibiothérapie sont nécessaires.

➤ Abscesses du foie :

Les abscesses hépatiques qui sont définies par la présence de pus dans le foie sont des infections, le plus souvent polymicrobiennes, les BAS sont incriminées dans 50% des cas et les germes les plus fréquemment isolés sont :

- *Prevotella spp.*
- *Bacteroides fragilis.*
- *Fusobacterium spp.*

Les symptômes de l'abscesses du foie peuvent comprendre une douleur de l'hypochondre droit, une fièvre, des vomissements, une perte de poids...

Il existe de nombreuses causes possibles notamment :

- Une infection des voies biliaires.
- Les péritonites.
- Les septicémies (origine hématogène).

Le traitement consiste généralement en drainage de l'abscesses moins souvent une intervention chirurgicale est nécessaire.

Une antibiothérapie est associée et peut être suffisante à elle seule.(25)

1.3.2.1.h. Infections gynécologiques

C'est l'une des infections les plus fréquentes chez les femmes.

Les bactéries anaérobies strictes constituent un élément important de la flore vaginale normale et du canal cervical externe. Par conséquent, on pourrait s'attendre à ce que les infections émanant de la flore vaginale soient causées dans une large mesure par des bactéries anaérobies strictes surtout en cas de déséquilibre des Lactobacilles (voir chapitre 3 : bactéries anaérobies et flore commensale : Sphère Vaginale)

Ces infections sont le plus souvent polymicrobiennes et Les germes les plus incriminées sont :

- *Prevotella spp.*
- *Porphyromonas spp.*
- *Peptostreptococcus anaerobius.*
- *Peptoniphilus asaccharolyticus.*(25)

La vaginose bactérienne peut augmenter le risque d'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le développement d'autres maladies sexuellement transmissibles. (27)

Le métronidazole en ovules gynécologiques est le traitement de choix. (25)

1.3.2.1.i. Bactériémies :

La majorité des bactériémies à anaérobies strictes sont intermittentes et associées à de graves infections intra-abdominales ou du tractus génital féminin, de la peau et des tissus mous, souvent à proximité du flux fécal.

Les organismes impliqués dépendent de leur porte d'entrée et de la maladie sous-jacente.(27)

Dans l'ensemble, environ 10% des bactériémies sont dues à des anaérobies(23), et ils sont les seuls isolats dans deux tiers de ces infections.

Les isolats les plus courants sont ceux du groupe *Bacteroides fragilis* (60 à 75 % des isolats) et *Clostridium spp* et ils sont associées à un taux de mortalité de 15 à 30%.

- Les bactériémies du groupe *B. fragilis* sont principalement associées à une source gastro-intestinale.
- Les bactériémies à *Prevotella*, *Porphyromonas* et *Fusobacterium spp*, à des sources oropharyngées et pulmonaires.
- *Fusobacterium spp* à l'appareil génital féminin.
- *Propionibacterium acnes* à des corps étrangers.
- La bactériémie à peptostreptocoques est associée à toutes les sources, mais surtout aux voies oropharyngées, pulmonaires et génitales féminines.(27)

1.3.2.2.Implications non infectieuses des bactéries anaérobies strictes

1.3.2.2.a. Cancer et bactéries anaérobies strictes

Malgré toutes les études faites, il n'est toujours pas possible d'établir avec certitude l'incrimination d'une seule espèce bactérienne dans le développement de tumeurs cancéreuses, mais la prédominance d'une par rapport à une autre peut nous orienter.

- **Le *Fusobacterium nucleatum* et le cancer colorectal**

Des études récentes montrent que les tumeurs colorectales contiennent des microbiotes différents de ceux qui résident dans l'environnement "normal" du côlon, et que ces microbiotes peuvent contribuer à la progression du cancer. *Fusobacterium nucleatum* est l'espèce la plus fréquemment observée dans le microenvironnement des tumeurs colorectales.

Cependant, la compréhension détaillée du rôle de ce microorganisme dans la progression du cancer est limitée, en raison des difficultés à maintenir la viabilité de *F.nucleatum* dans des conditions standard de culture aérobie de cellules humaines.

D'autres rapports récents ont démontré un rôle potentiel de ce dernier dans l'augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses, la modulation de l'immunité tumorale et la régulation de l'autophagie.(35)

Une étude plus récente a proposé que Le *Fusobacterium* affecte le processus tumoral par la production d'une toxine appelée *Fusobacterium immunosuppressive toxin* (FIT) (35) qui comme son nom l'indique a une action immunosuppressive.

On pense que la FIP accélère le développement des tumeurs par la stimulation de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et expression des cytokines pro-inflammatoires.(23)

- **Le *Fusobacterium* et le cancer oral**

On a estimé que plus de 700 espèces bactériennes sont hébergées dans la cavité buccale des humains en bonne santé. Les BAS constituent une fraction significative du microbiote oral et jouent un rôle important dans la formation de biofilms sur divers sites anatomiques. Les biofilms bactériens sont également associés à des pathologies de la cavité buccale, y compris le carcinome épidermoïde oral (OSCC).

Une étude a montré que le *Fusobacterium nucleatum* et *Fusobacterium periodonticum* ont été détectée dans des échantillons de biopsies, de biofilms et de lavages buccaux de patients atteints de OSCC, et donc peut avoir un rôle dans la progression des carcinomes de la cavité orale. (36)

- **Le Bacteroides du groupe fragilis et le cancer colorectal CCR**

Quelques souches du *Bacteroides* du groupe *fragilis* qui est prédominant dans le microbiote intestinal sont considérées comme toxigéniques chez 4 à 30% des individus (37) on observe une augmentation de la colonisation par ce dernier chez les patients, atteints du cancer colorectal par rapport aux sujets sains.

Cette bactérie produit une entérotoxine ; une toxine métalloprotease fragilysine qui dépend du zinc (ETBF), impliquée dans le développement des cancers(35) par deux mécanismes :

- 1) Elle accélère la prolifération cellulaire et stimule la résistance à l'apoptose.
- 2) Elle induit une augmentation de la perméabilité colique exposant la sous muqueuse aux différents germes de la lumière intestinale ce qui va engendrer l'inflammation de cette dernière et par la suite expression des cytokines pro-inflammatoires et on sait bien que l'inflammation chronique peut favoriser le développement des cancers.(23)

Par contre, il existe des bactéries qui ont plutôt un effet protecteur, c'est le cas du *Faecalibacterium prausnitzii* qui appartient au cluster de *Clostridium leptum*, cette bactérie à des métabolites anti inflammatoires comme le butyrate qui protège des CCR.(23)

1.3.2.2.b. Inflammation et bactéries anaérobies strictes

On a remarqué au cours des dernières années un changement du microbiote intestinal chez les gens qui souffrent d'une maladie inflammatoire chronique (maladie de Crohn par exemple).(37)

Une étude récente a exploré la relation entre les patients atteints de maladies inflammatoires et les patients sains présentant des différences significatives dans certaines bactéries en particulier *Clostridium leptum* et *cocoides* qui semble protéger des MICI.(37)

Il a été rapporté aussi que le *Faecalibacterium prausnitzii*, qui est l'un des membres du microbiote humain sain, dont l'abondance peut aller jusqu'à 15% chez certains individus(37) était moindre chez les sujets atteints d'une MICI par rapport aux sujets sains(35), et s'est avéré être diversifié avec différentes propriétés immunomodulatrices. La réduction de *F. prausnitzii* a été associée à un risque élevé de maladie de Crohn et de colite ulcéreuse.(37)

Ceci souligne le fait que cette espèce protège de l'inflammation(37), ensuite les études in vitro viennent nous confirmer cela ; la stimulation des monocytes par cette espèce augmente la production d'anti cytokines IL 10 et diminue la production des cytokines pro-inflammatoires grâce à la production du butyrate qui a une action anti-inflammatoire.

En outre, le *Bacteroides* du groupe fragilis semble aussi avoir un effet protecteur et ceci par régulation du système immunitaire en améliorant l'expression de l'ARNm des cytokines anti-inflammatoires IL 10 à travers la sécrétion de polysaccharides.

En revanche, d'autres recherches ont montré que certains types de *Bacteroides* (*B. vulgatus*, *B. ovatus*) peuvent causer des poussées inflammatoires dans les MICI et donc aggraver la situation.(23)

1.3.2.2.c. Obésité, diabète et bactéries anaérobies strictes

Au cours des dernières décennies l'obésité est devenu l'un des troubles associés au mode de vie le plus courant, en plus c'est un facteur majeur de plusieurs autres troubles associés au mode de vie comme le diabète.

Bien que la génétique et le mode de vie soient impliqués dans l'apparition de l'obésité et du diabète, des études récentes ont établi que le microbiote intestinal et oral en particulier les BAS y jouent un rôle crucial aussi.(23)

Une étude a montré que la colonisation par le *Bifidobacterium* était plus faible chez les patients atteints du diabète de type 1 que chez les gens du groupe témoin(37), de plus une augmentation ou une diminution du genre *Bifidobacterium* ont été associées à l'obésité, montrant la complexité des relations microbiote-hôte.(38)

De plus, chez l'homme obèse, il existe dans le microbiote fécal une proportion augmentée de firmicutes et diminuée de bacteroidetes par rapport aux sujets minces, donc la perte de poids semble corrélée avec l'augmentation de la proportion de bacteroidetes.(37)

Akkermansia muciniphila a été identifié comme étant une bactérie dégradant la mucine, qui réside dans la couche de mucus et représente 3 à 5 % de la communauté microbienne chez les sujets sains, ce pourcentage diminue en cas d'obésité.(39)

D'autres études chez les souris et l'homme ont montré une réduction des populations de *Bifidobacterium spp*, *Roseburia* et *Akkermansia* intestinales chez les patients obèses par rapport aux sujets sains, et une augmentation de ces dernières est associée à une réduction du taux de glucose et une perte de poids chez la souris.

En conclusion ces bactéries ont un effet protecteur contre l'obésité et ralentissent la progression de la normoglycémie vers un pré diabète ou un diabète.(23) .

1.4.Principales bactéries anaérobies strictes incriminées en pathologie humaine

1.4.1. Bactéries du genre Clostridium

Les espèces appartenant au genre Clostridium sont des bacilles Gram positif anaérobies strictes sporulés.

Les spores formées par les Clostridium ont une forme caractéristique de quille ou de bouteille qui les distingue des autres endospores bactériennes, qui ont généralement une forme ovoïde.(40)

Ces micro-organismes sont largement distribués dans l'environnement, en particulier dans l'eau, les sols, les animaux en décomposition et certaines font même partie de la flore intestinale des humains et animaux.

En général, ces organismes produisent plusieurs exotoxines et enzymes, qui contribuent à la détérioration des tissus et à la pathogenèse.

Le genre Clostridium compte plus de 80 espèces, les plus pathogènes sont *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani* et *Clostridium difficile*.(41)

1.4.1.1.Clostridium botulinum et botulisme

Clostridium botulinum est l'espèce la plus pathogène du genre et la source d'une toxine mortelle.

Elle présente un risque sanitaire pour deux principales raisons : Les endospores de *C botulinum* sont résistantes à la chaleur et les toxines produites peuvent subsister dans les aliments même si la bactérie a été traitée (40).

On distingue 3 formes de botulisme, selon le mode de contamination :

- **L'intoxication botulique**, due à l'ingestion de la toxine botulique contenue surtout dans les soupes et légumes en conserve, les fruits de mer, les saucisses et autres produits carnés.
- **La toxi-infection botulique**, due à l'ingestion de bactéries et/ou de spores de *C botulinum* et qui apparaît surtout chez les jeunes enfants (botulisme infantile) ayant consommé du miel contaminé ou ayant inhalés des poussières contenant des spores de *C botulinum*.
- **Le botulisme par blessure** qui est causé par l'inoculation des spores bactériennes sur une plaie ou suite à l'injection de toxine botulique à des fins thérapeutiques ou cosmétologiques. (42)

Il existe 8 différents types de toxines botuliques antigéniquement distinctes : A, B, C, D, E, F, G et H. Les types A, B, E, H et parfois F sont responsables du botulisme humain, tandis que les toxines C et D provoquent le botulisme animal (bovins, chevaux, volaille, certains poissons). Ces toxines sont libérées lors de la lyse de la cellule par des bactériophages ou bien lors de l'autolyse de la cellule à la fin du cycle de croissance.(40)

Les neurotoxines produites par le *C.botulinum* agissent en se fixant sur les cellules nerveuses et en inhibant la libération de l'acétylcholine dans les terminaisons nerveuses, ce qui provoque des troubles digestifs (vomissements, diarrhée) observés de façon inconstante en début d'évolution, une constipation fréquente en fin d'évolution, une paralysie des muscles de l'accommodation (vision floue, mydriase, diplopie), une sécheresse buccale, des difficultés de déglutition et d'élocution et dans les formes les plus graves, une paralysie des membres et des muscles respiratoires.(40,42)

Cependant, cette toxine a trouvé un usage thérapeutique pour le traitement de la dystonie et d'autres troubles musculaires, ainsi qu'un usage en cosmétologie pour l'élimination des rides, commercialisé sous le nom de Botox.(40)

Le traitement du botulisme se fait par l'administration d'une antitoxine spécifique qui neutralise les toxines qui se trouvent encore dans le sang, mais les toxines qui se sont déjà fixées au récepteur ne peuvent pas être neutralisées.

La prévention de la maladie implique la cuisson des aliments transformés pendant une durée suffisante, éviter la consommation du miel chez les enfants de moins de 1 an et l'élimination des aliments soupçonnés d'être contaminés qui ont généralement un aspect de renflement ou gonflement car le *C.botulinum* produit du gaz lors de son développement dans des espaces fermés.(41)

1.4.1.2.Clostridium Tetani et Tétanos

Le *Clostridium tetani* est responsable d'un trouble du système nerveux qui entraîne des spasmes musculaires incontrôlables, appelé le tétanos.(43)

L'agent pathogène peut être trouvé dans la flore normale du gros intestin chez un grand nombre d'espèces animales et est omniprésent dans l'environnement.

La maladie apparaît suite à la contamination d'une plaie par des spores de *C.tetani* provenant de l'environnement (44)et sa période d'incubation peut s'étendre de 2 à 38 jours.(43)

Le *C.tetani* produit 2 neurotoxines : la tétafolysine, dont l'implication est jusqu'à présent vague et la tétaospasmine, communément appelée toxine tétanique, qui inhibe la libération de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et de la glycine dans les neurones moteurs, provoquant ainsi une paralysie spastique intense et diffuse.(45)

On distingue 4 types de tétanos, selon les symptômes les plus importants :

- **Le tétanos généralisé**, qui est la forme la plus courante et dont le symptôme le plus marquant est le trismus. Les autres symptômes impliquent des spasmes musculaires, un opisthotonos (figure-08-(46)), dû aux contractions tétaniques des muscles para spinaux, un risus sardonius ou "sourire sardonique" (figure -09-(47)) dû à la tétanie des muscles faciaux, des fractures osseuses, une fièvre, une tachycardie, une diaphorèse, une hypertension, des céphalées, une dysphagie et une apnée.



Figure 8 : opisthotonos.

- **Le tétanos localisé**, qui atteint les muscles qui entourent immédiatement la zone contaminée et qui peut passer inaperçu jusqu'à ce qu'une forme plus généralisée se manifeste. Les symptômes comprennent une douleur et une faiblesse au niveau de la plaie, puis une évolution vers des spasmes musculaires localisés ou une rigidité.
- **Le tétanos céphalique** est une forme localisée de tétanos qui implique le dysfonctionnement d'un ou de plusieurs nerfs crâniens, suite à la contamination d'une blessure au cou ou à la tête.
- **Le tétanos néonatal** est une forme généralisée de tétanos qui atteint le nouveau-né, suite à la contamination du moignon ombilical par des spores de *C tetani*, pendant ou après un accouchement à domicile et en absence d'immunité maternelle protectrice. En effet, les nourrissons nés à terme ou de mères immunisées contre le tétanos sont également immunisés grâce à des anticorps anti tétanique neutralisants, leurs conférant ainsi, une immunité passive qui les protège jusqu'à leur vaccination, car cette immunité s'affaiblit avec le temps.

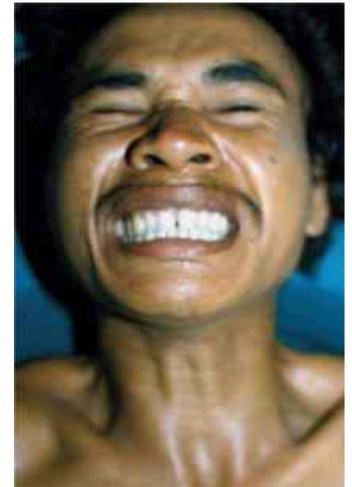


Figure 9 : Risus sardonicus (rire sardonique).

Les objectifs immédiats du traitement sont de stabiliser les voies respiratoires et la circulation du patient (par l'utilisation de benzodiazépines pour les crampes musculaires et d'anticoagulants pour la prophylaxie de la thrombose veineuse profonde), d'éradiquer l'agent pathogène (à l'aide d'antibiotiques : le métronidazole ou la pénicilline G), ainsi que de neutraliser la toxine tétanique (par l'administration d'une immunoglobuline tétanique humaine).

Le tétanos est une maladie évitable par la vaccination. Ces vaccins qui contiennent l'anatoxine tétanique sont sûrs et très efficaces pour induire des réponses immunitaires protectrices dès la période néonatale. Il est à noter, que le tétanos n'est pas une maladie immunisante et que les personnes ayant déjà été infectées doivent être vaccinées.(43,45)

1.4.1.3.Clostridium difficile et colites

Clostridium difficile constitue de nos jours un problème de santé publique, en raison de l'augmentation de l'incidence des infections nosocomiales, des diarrhées associées aux antibiotiques et à la colite pseudo-membraneuse, dont il est responsable (48).

Le *C.difficile* habite le tractus digestif d'une grande majorité de personnes mais certains facteurs favorisent sa pathogénicité telle qu'une antibiothérapie qui entraînerait une altération de la flore intestinale en sa faveur, une immunodépression, ainsi que la présence de maladies inflammatoires de l'intestin.

Les spores de *Clostridium difficile* sont transmises par voie féco-orale ou par des aliments contaminés. Une fois arrivées dans l'intestin grêle, l'acide biliaire (taurocholate) favorise leur germination et les cellules végétatives colonisent l'intestin.

Le *C.difficile* produit plusieurs toxines ainsi que des facteurs d'adhésion et de motilité.

Plusieurs tableaux cliniques sont possibles :

- Une **diarrhée non sanglante**, dont les symptômes commencent à apparaître peu après le début de l'antibiothérapie et cessent lorsque celle-ci est arrêtée,
- La **colite à *C.difficile* sans formation de pseudomembrane** qui est une forme sévère et dont les symptômes sont les suivants : nausées, anorexie, crampes abdominales, fièvre, malaise et diarrhée aqueuse de grand volume avec des traces de sang dans les selles.
- La **colite pseudomembraneuse** qui associe une diarrhée sanglante, une fièvre et des douleurs abdominales.
- La **colite fulminante** qui est caractérisés par des syndromes inflammatoires systémiques comprenant des douleurs abdominales diffuses, avec ou sans diarrhée, une forte fièvre, des frissons, une hypotension, une tachypnée, et une leucocytose marquée.

Le traitement consiste généralement en une antibiothérapie adéquate (métronidazole, vancomycine), mais une bactériothérapie fécale visant à repeupler l'intestin du patient avec un microbiote sain et l'ablation chirurgicale d'une section de l'intestin infecté sont également utilisées pour traiter les patients atteints de formes graves et récidivantes.

Pour prévenir les infections à *C difficile*, il convient de revoir les pratiques de prescription des antibiotiques, notamment le type d'antibiotique, la fréquence et la durée du traitement, et d'accorder une attention particulière à la limitation de la propagation de l'infection dans les hôpitaux.(41)

1.4.2.Bactéries du genre *Fusobacterium*

Le genre *Fusobacterium* est un groupe de bactéries anaérobies strictes appartenant à la famille des bactérioidaceae qui se présentent sous forme de Bacilles immobiles qui ne forment pas de spores et qui sont de coloration gram négatif.

La plupart des *Fusobacterium* sont des cellules fusiformes mais elles peuvent aussi apparaître polymorphes (globulaire, filiforme...).

L'infection par le *Fusobacterium* peut survenir après chirurgie, traumatisme, morsures d'animaux... (49).

Ces bactéries font partie de la flore normale de la sphère oropharyngée, gastro-intestinale et génitale.(50)

En effet, bien qu'elles soient des commensales, elles doivent être toujours traitées comme pathogènes car elles peuvent provoquer des infections diverses :

- Périodontite.
- Abscess hépatique.
- Myonécrose.(25)

Au sein de ce genre on trouve plusieurs espèces (*nucleatum*, *necropherum*, *varium*, *canifelinum*...).

L'espèce la plus pathogène est *F.necropherum*, elle est responsable du fameux syndrome de Lemierre et de l'angine de Vincent en association avec le *Treponema Vincentii*.(51)

Le traitement des infections à *Fusobacterium* dépend principalement de sa localisation dans le corps. (49)

1.4.3. Bactéries du genre *Bacteroides*

Les *Bacteroides* sont des bacilles à gram négatif asporogènes et immobiles se présentant sous forme de bâtonnets disposés seules ou par paires et appartenant à la famille des Bactéroidaceae.

Ces bactéries ont la propriété d'être chimio hétérotrophes ; elles peuvent utiliser des hydrates de carbone, de la peptone et d'autres métabolites bactériens intermédiaires.

Ce sont des commensales du tractus gastro-intestinale et aident à la décomposition des aliments et la production de nutriments et de l'énergie.

Au sein de ce genre on trouve plus de 90 espèces. Toutes les souches qui peuvent tolérer la bile appartiennent au groupe *B. fragilis* (pathogène majeur pour l'homme), y compris *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*...etc.

Elles sont détectées dans des cultures provenant d'échantillons cliniques d'appendicite, de péritonite et de cervicite...(52)

Elles cultivent en 24 à 48 H à 37°C en anaérobiose et donnent des colonies muqueuses sur Columbia au sang (50) avec une catalase positive.(52)

Ce groupe présente plusieurs facteurs de pathogénicité :

- Le polysaccharide capsulaire (facteur d'adhérence au mésothélium péritonéal).
- Une entérotoxine impliquée dans les diarrhées.
- Héparinase : cette enzyme a un rôle dans les septicémies.
- Neuraminidase : dégradation de la couche de mucine protectrice de l'épithélium au niveau du colon.(50)

1.4.4. Bactéries du genre *Porphyromonas*

Entre 1989 et 1990, on a découvert que trois espèces de *Bacteroides* avaient des caractéristiques biologiques significativement différentes de celles des autres espèces de *Bacteroides*.

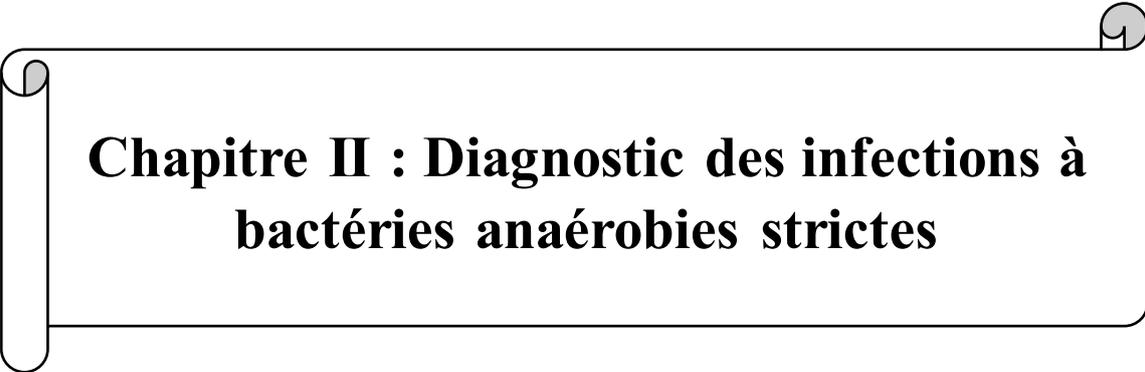
Cependant, elles étaient similaires dans leur capacité à fermenter les hydrates de carbone pour produire de la mélanine. Ces espèces, à savoir *B. asaccharolyticus*, *B. gingivalis* et *B. endodontalis*, ont été placées dans un nouveau genre : *Porphyromonas*.(53)

Les membres de ce genre les plus communément trouvés dans la cavité orale sont *P. gingivalis* et *P. endodontalis*, et ils sont impliqués dans les infections dentaires (gingivite, Périodontite...)(25)

Ces bactéries ne produisent pas de spores, sont immobiles et à Gram négative.

Bactéries anaérobies strictes

Les Porphyromonas sont des anaérobies strictes, cultivent sur des plaques de gélose au sang lentement (5 à 7 jours) avec une température de croissance optimale de 37°C, elles peuvent former des colonies de 1 à 3 mm de diamètre de couleur noir et à surface lisse.



Chapitre II : Diagnostic des infections à bactéries anaérobies strictes

2. Diagnostic des infections à bactéries anaérobies strictes

2.1. Etapes pré-analytique

2.1.1. Recueil de l'échantillon

Le bon isolement, l'identification et la fiabilité des résultats obtenus dépendent de la qualité du prélèvement.

En effet, il est nécessaire de choisir minutieusement le site et le moment du prélèvement, les conditions de température et d'humidité dans lesquelles l'échantillon est placé ainsi que la technique et les matériaux utilisés afin d'éviter une éventuelle contamination par la flore endogène ou la mort des espèces anaérobies strictes présentes dans l'échantillon.(13)

Les échantillons admissibles sont :

- Le pus, le contenu d'abcès et les aspirations profondes des plaies.
- L'urine, recueillie par aspiration percutanée de la vessie par voie sus pubienne.
- Les prélèvements des voies respiratoires inférieures obtenus par fibroscopie distale protégée.
- Le liquide de culdocentèse, obtenu après décontamination du vagin.(54)
- Les fluides corporels normalement stériles.
- Fragments de tissus obtenus par biopsie ou retirés chirurgicalement.
- Les prélèvements sanguins, placés dans des flacons d'hémoculture spéciaux qui permettent la culture anaérobie.(13)

Si le prélèvement est effectué à l'aide d'une seringue, toutes les bulles d'air doivent être expulsées et les échantillons doivent être traités en moins de 30 minutes, car l'air diffuse progressivement à travers la paroi de la seringue en plastique.(54)

Les échantillons solides sont placés dans des bouchons de coproculture pour les selles, des tubes simples ou des tubes boratés stériles. (13)

Il est préférable d'éviter l'utilisation des écouvillons, car ils ne retiennent qu'un petit volume d'échantillon, qu'ils ont tendance à se dessécher et qu'ils exposent les bactéries à l'oxygène.(54)

2.1.2. Transport du prélèvement au laboratoire

Le transport des échantillons au laboratoire doit se faire rapidement et dans des conditions anaérobies.

C'est pour cela que des milieux de transport spécifiques sont utilisés et placés dans des systèmes anaérobies (généralement des sacs anaérobies).

Le milieu de transport permet de maintenir la viabilité des cellules bactériennes sans favoriser leur multiplication.

- Milieu de transport de Stuart et Amies :

Ce milieu est une modification du milieu de Stuart, qui servait à l'origine, à la conservation des espèces fastidieuses, en particulier celles appartenant au genre *Neisseria*.

Il s'agit d'un milieu semi-solide, composé de phosphates inorganiques et de charbon, qui permettent de réduire la prolifération des coliformes gram négatifs et des bacilles, de thioglycolates de sodium, qui réduisent le potentiel d'oxydoréduction, de chlorhydrates de cystéine, qui servent d'agent réducteur, de chlorures de calcium, qui maintiennent l'équilibre osmotique, de bleu de méthylène, en tant qu'indicateur d'oxygène et d'agar qui est un agent solidifiant.

Ce milieu peut également être utilisé sous forme liquide.

- Milieu de transport Cary-Blair :

Ce milieu est composé de thioglycolate de sodium, hydrogénophosphate de sodium, de chlorure de sodium, de chlorure de calcium et d'agar.

Il peut être préparé comme un milieu anaérobie stérile préréduit.

Cette méthode consiste à porter le milieu à ébullition afin de réduire la solubilité des gaz et par conséquent d'expulser l'oxygène du milieu. (13)

2.2. Etapes Analytiques

2.2.1. Biosécurité au laboratoire de microbiologie au cours de la recherche des bactéries anaérobies strictes

En général les micro-organismes sont classés en groupes de risque en fonction de la pathogénicité de l'agent, le mode de transmission et la facilité de la contamination, les hôtes possibles et la présence de mesures préventives et de traitement efficace.

Le groupe de risque d'un organisme correspond à un niveau de sécurité biologique (NSB 1, NSB 2, NSB 3, NSB 4). (55)

Par exemple :

- *Clostridium botulinum* NSB 2 (56)
- *Clostridium tetani* NSB 2
- *Actinomyces spp* NSB 2

Donc le groupe de risque doit aider à déterminer le niveau de sécurité biologique requis pour une manipulation sûre de l'agent et à identifier les installations de confinement physique appropriées qui doivent être utilisées. (3)

Tableau 2 : les différents niveaux de sécurité biologique.(55)

Niveau de sécurité biologique	NSB - 1	NSB - 2	NSB - 3	NSB - 4
Niveau de risque	Risque faible	Risque modéré	Risque fort	Risque majeur
Description	-Micro-organisme connu. -Pas de maladie. -Peu susceptible d'être transmis à l'échelon collectif.	-Maladie pouvant être sévère et transmissible. -Danger pour le travailleur. -Existence de prophylaxie et de traitement thérapeutique efficace.	-Maladie grave voire mortelle. -Danger sérieux pour le travailleur. -Transmission limitée : existence d'une prophylaxie ou de traitement efficace.	-Maladie mortelle sur le plan individuel et collectif. -Danger sérieux pour le travailleur. -Aucun traitement connu, aucune prophylaxie.
Niveau de confinement	L1	L2	L3	L4

Donc la manipulation des anaérobies exige certaines mesures :

2.2.1.1.Mesures générales

- Port de la blouse.
- Ne pas apporter ses affaires au laboratoire (risque de contamination).
- Laver les mains en entrant et avant de quitter le laboratoire.
- Manipulation sous la hotte à flux laminaire.
- Préparer tout le matériel nécessaire pour la manipulation au préalable (les pipettes, les lames, les générateurs...).
- Préparer un récipient pour les déchets.
- Ne pas ouvrir la Jarre devant le bec bunsen.
- Nettoyez la paillasse avant et après la manipulation par une solution désinfectante (exemple : des solutions d'hypochlorite de sodium (0,1 %) ou d'hydroxyde de sodium (0,1 %) peuvent inactiver facilement la toxine et sont recommandées pour la décontamination des surfaces de travail).
- L'autoclavage des matériaux contaminés.

2.2.1.2. Protection de la contamination par voie oculaire

- Port de lunettes de protection (risque de projection sur la muqueuse oculaire).

2.2.1.3.Protection de la contamination par voie buccale

- Ne jamais pipeter à la bouche.
- Ne pas manger, boire ni fumer dans le laboratoire.

2.2.1.4.Protection de la contamination par voie respiratoire

- Port de masque de préférence FFP 2 (exposition aux aérosols).

2.2.1.5.Protection de la contamination par voie cutanée

- Port de gants (Il faut les ajuster à la base des doigts, s'assurer qu'ils ne sont ni trop larges ni trop étroits et qu'ils ne sont pas déchirés).
- Protéger les plaies par un pansement.
- Utiliser avec précaution les aiguilles (risque de piqûre).(55)

2.2.2.Obtention de l'anaérobiose in vitro

Pour obtenir des conditions satisfaisantes d'anaérobiose, 3 critères principaux doivent être respectés :

1. Le milieu utilisé doit contenir une concentration initiale, aussi faible que possible, des matières oxydées et prévenir la formation de produits toxiques d'oxydation. C'est pour cela que les milieux commercialisés doivent être aussi frais que possible et les milieux

préparés au niveau du laboratoire doivent être préparés de manière extemporanée (sauf lorsqu'une chambre anaérobie est utilisée).

2. L'exclusion de l'oxygène du milieu pendant la mise en culture et l'incubation. Pour cela, il existe des méthodes physiques (ébullition) et des méthodes chimiques de réduction, qui impliquent des molécules réductrices telles que la cystéine, le fer, le titane (III), le citrate, l'acide ascorbique, le glutathion, le sulfure de Sodium, le dithionite de Sodium et le thioglycolate. Il existe également, une enzyme, l'oxyrase, qui réduit l'oxygène en H_2O à partir de O_2 et H^+ . Cette enzyme peut être lyophilisée, puis ajoutée aux milieux liquides, semi-solides et solides.
3. Le maintien d'un potentiel d'oxydo-réduction suffisamment faible.(21)

Il existe plusieurs systèmes qui fournissent une atmosphère permettant la culture des bactéries anaérobies même très sensibles à l'oxygène, par exemple : les poches, les boîtes, les jarres et les chambres anaérobies.

2.2.2.1. Boîtes et poches anaérobies :

Les boîtes anaérobies sont des récipients transparents, hermétiques, fabriqués en matériaux incassables et résistants aux produits chimiques, munis de loquets qui facilitent la fermeture et permettent de maintenir l'étanchéité et l'environnement souhaité tout au long de l'incubation. (figure -10- (57))

Les poches anaérobies sont des sacs étanches en plastique souple transparent.(figure -11- (58))

Les boîtes et les poches anaérobies sont utilisées avec des sachets contenant des générateurs d'anaérobiose, en aluminium, qui renferment du charbon actif, de l'ascorbate de sodium et d'autres composés organiques et inorganiques. Ils fonctionnent sans ajout d'eau ou de catalyseur (aucun hydrogène n'est produit) et produisent l'atmosphère appropriée pour la culture de bactéries qui nécessitent une atmosphère anaérobie.

Les compositions gazeuses obtenues (oxygène et dioxyde de carbone) sont ajustées par la quantité de composés chimiques contenus dans chaque sachet, qui absorbent l'oxygène et libèrent le dioxyde de carbone.(59)



Figure 10 : Boîtes anaérobies de différentes dimensions BD GasPak EZ.



Figure 11 Poches anaérobies BD GasPak EZ.

2.2.2.2. Jarres anaérobies

En 1916, l'invention de la jarre anaérobie par James McIntoch et Paul Fildes a permis la culture, l'étude et la découverte de nombreuses bactéries anaérobies responsables de diverses maladies humaines.(60)

Ce sont des récipients en polycarbonates ou alliage métallique imperméables aux gaz qui peuvent contenir 10 ou 30 boîtes.(1)

Ces jarres nécessitent l'introduction d'un générateur de gaz (sachets contenant des borohydrates de Sodium et des bicarbonates de Sodium), un indicateur coloré (bleu de méthylène ou résazurine), un catalyseur au Palladium et l'addition d'eau. Lorsque le générateur est ouvert, du dioxyde de carbone et de l'hydrogène sont produits, l'hydrogène se combine alors avec l'oxygène pour former de l'eau et une atmosphère riche en dioxyde de carbone est créée.

Ces jarres sont généralement munies d'un système de fermeture anti-pression, avec un couvercle métallique qui permet la fermeture hermétique grâce à un système de serrage à vis.(61)

La jarre ne doit pas être ouverte avant 48 heures d'incubation pour éviter la mort prématurée de certaines bactéries anaérobies à croissance lente par exposition à l'air.

L'inconvénient de cette méthode est que l'examen des cultures nécessite l'ouverture du dispositif, donc l'exposition des cultures à l'oxygène ambiant et qu'il faut compter au moins six heures pour qu'une bonne anaérobiose se produise.(21)

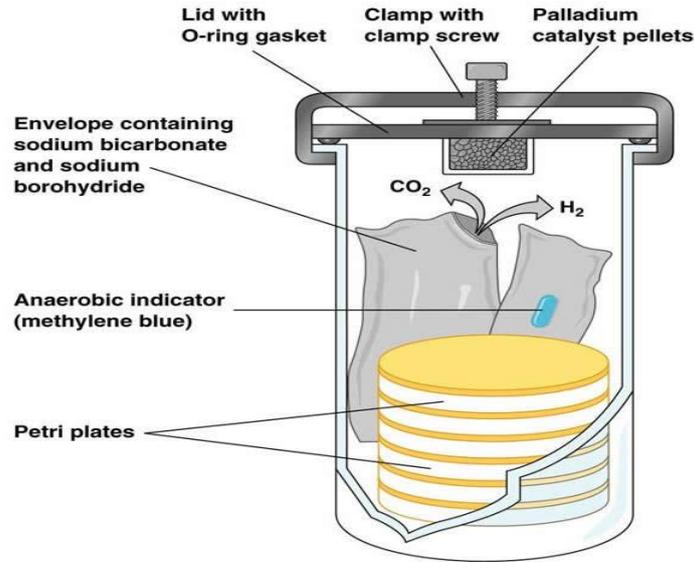


Figure 12 : schéma représentatif d'une jarre anaérobie.(57)

2.2.2.3. Chambres anaérobies

Egalement connues sous l'appellation chambre de Freiter ou station anaérobie, ce sont des enceintes en plastique, en métal (figure -13- (62)) ou en vinyle (figure -14-(63)), à perméabilité faible ou nulle aux gaz, qui permettent la réalisation des manipulations, de l'incubation, de l'inspection et de l'isolement des colonies dans une atmosphère contrôlée, en anaérobiose permanente (5% d'hydrogène, 5-10% de dioxyde de carbone et 85-90% d'azote).

Il existe plusieurs types de chambres anaérobies disponibles dans le commerce :

- Des chambres à gants.
- Des chambres anaérobies à mains nues.
- Des chambres anaérobies mixtes (à gants et à mains nues), dans lesquelles la partie à mains nues est utilisée pour la manipulation et la partie avec gants permet l'incubation et les opérations anaérobies.(1)



Figure 13 : Chambre anaérobie en acier inoxydable.



Figure 14 : Chambre anaérobie en vinyle.

L'anaérobiose de la chambre est maintenue grâce à la circulation de l'atmosphère de la chambre à travers des unités catalytiques, qui contiennent un catalyseur au palladium et un déshydratant. Le palladium peut adsorber jusqu'à 900 fois son propre volume de H₂ dans le mélange gazeux à température ambiante, ensuite, tout O₂ introduit dans l'atmosphère de la chambre réagira avec le H₂ du Palladium réduit, générant du H₂O, qui est absorbé par le déshydratant.

Afin de contrôler l'anaérobiose, des indicateurs d'oxydo-réduction sont utilisés, notamment, le bleu de méthylène, qui vire du bleu au transparent en atmosphère anaérobie, ou la résazurine qui vire du rose au transparent en atmosphère anaérobie.

L'introduction et l'évacuation du matériel se fait par un sas à 2 portes, dans lequel la porte intérieure n'est ouverte qu'après 3 cycles de vidange-remplacement du volume gazeux du SAS.

Ces chambres peuvent être thermostatées, ou contenir un incubateur pour ajuster la température.(1)

Cette technique n'est pas indispensable pour la culture conventionnelle de la majorité des bactéries anaérobies, mais elle peut se montrer avantageuse car elle permet la préparation du milieu de la manière habituelle (non nécessairement extemporanément), le suivi quotidien de la croissance sans compromettre l'anaérobiose ainsi que la réalisation d'autres opérations qui nécessitent l'absence de l'oxygène.(7)

Cependant, cette méthode présente plusieurs inconvénients, notamment, le coût élevé du dispositif et la nécessité de la réduction ou désoxygénation de tout le matériel avant chaque utilisation, mais aussi l'obligation d'avoir une pompe à vide qui permet de nettoyer et de vider la chambre entre 2 remplissages.(64)

2.2.3. Isolement et identification des colonies de bactéries anaérobies strictes

Les BAS sont difficiles à isoler à partir des foyers infectieux et sont souvent négligées, cependant certains signes peuvent orienter vers leurs recherche, notamment :

- Flore polymicrobienne à la coloration de Gram ou en culture.

- Gaz dans le pus ou les tissus infectés.
- Odeur nauséabonde du pus ou des tissus infectés.
- Tissus nécrotique infectés.
- Site de l'infection à proximité de la muqueuse où la microflore anaérobie réside habituellement.(65)
- Infections présumées bactériennes sans croissance sur des cultures aérobies.
- Échec du traitement de l'infection par des antibiotiques efficaces contre les bactéries aérobies uniquement.
- Infections liées à des tumeurs ou à d'autres processus destructeurs.
- Infection suite à une morsure.
- Coloration noire des exsudats.
- L'état clinique prédisposant à une infection anaérobie (par exemple, après une chorioamniotite, fistules, morsures, infection dentaire, perforation intestinale).(66)

2.2.3.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique des échantillons peut être évocateur d'une infection à bactéries anaérobies, notamment en présence d'odeur fétide, qui peut être due à la présence d'acides gras volatiles, d'amines ou H₂S ou de tissus nécrotiques noirs, qui est en faveur de bacilles gram négatif pigmentés.(2)

Plusieurs espèces anaérobies deviennent fluorescentes lorsqu'elles sont exposées à la lumière UV. En effet, une fluorescence rouge brique peut être détectée dans les cultures de *P.melaninogenicus* et de *C.difficile*, *Fusobacterium necropherum* présente une fluorescence verte sur des milieux contenant de la cystéine et *C difficile* une fluorescence jaune.(14)

2.2.3.2. Examens microscopiques :

2.2.3.2.a. Examen direct à l'état frais

L'examen à l'état frais permet d'étudier la mobilité et la présence ou non de spores chez les bactéries examinées.

2.2.3.2.b. Examen après coloration de Gram:

L'examen microscopique de la coloration de Gram nous renseigne sur les différents types de bactéries présentes dans l'échantillon, ce qui suggère les milieux spécifiques à utiliser, ainsi que leurs abondances.(2)

En cas de frottis de l'exsudat abdominal, la présence de bacilles pléomorphes, Gram-négatif, de tailles variables, à coloration bipolaire suggèrent la présence de bactéries du genre *Bacteroides* (figure -15- (67)).

La présence de bacilles Gram-négatif filamenteux, minces, aux extrémités pointus, en particulier, dans des échantillons provenant des voies respiratoires inférieures, peut suggérer une infection par *Fusobacterium nucleatum* (figure -16-(68)).

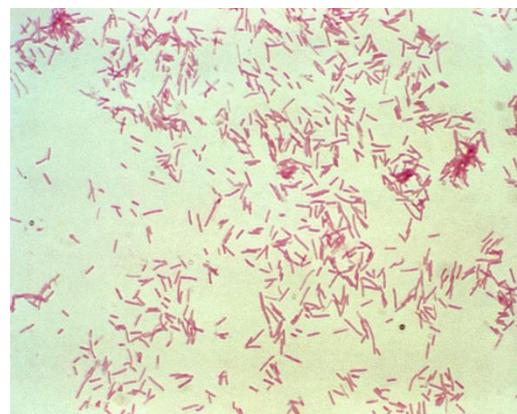


Figure 15 : *Bacteroides fragilis* vue au microscope optique après coloration de Gram.

L'aspect de ramifications des bactéries Gram positifs est en faveur de *Actinomyces spp*, *Propionibacterium spp* ou *Bifidobacterium spp*.(2)

En cas de suspicion d'une gangrène gazeuse, la présence de bacilles Gram-positif, larges, avec des extrémités émoussées sur un frotti montrant un fond nécrotique, avec peu ou pas de globules blancs, est en faveur de *Clostridium perfringens* (figure -17- (68)

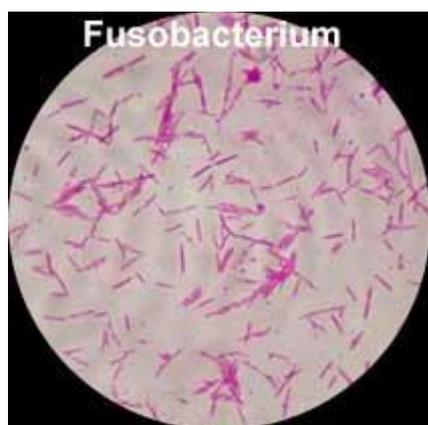


Figure 16 : Bactérie du genre *Fusobacterium* vue au microscope optique après coloration de Gram.



Figure 17 : *Clostridium perfringens* vue au microscope optique après coloration de Gram.

2.2.3.2.c. Examen après coloration des spores

Les spores sont une forme de résistance et sont produites par certaines bactéries pour leur permettre de survivre dans l'environnement quand les conditions sont défavorables.

La mise en évidence des spores n'est pas possible avec les méthodes de coloration usuelles, elle nécessite l'utilisation d'une coloration spéciale, c'est la coloration au Vert de malachite "Méthode de Schaeffer Fulton".

Dans la méthode de Coloration au Vert de Malachite «méthode de Schaeffer-Fulton», une teinture primaire verte de malachite est forcée dans la spore par vaporisation de l'émulsion bactérienne.

Le vert de malachite est soluble dans l'eau et a une faible affinité pour le matériel cellulaire, de sorte que les cellules végétatives peuvent être décolorées avec de l'eau.

La safranine est ensuite appliquée pour contre-colorer les cellules qui ont été décolorées.

À la fin du processus de coloration, les cellules végétatives seront roses et les endospores seront de couleur vert foncée.

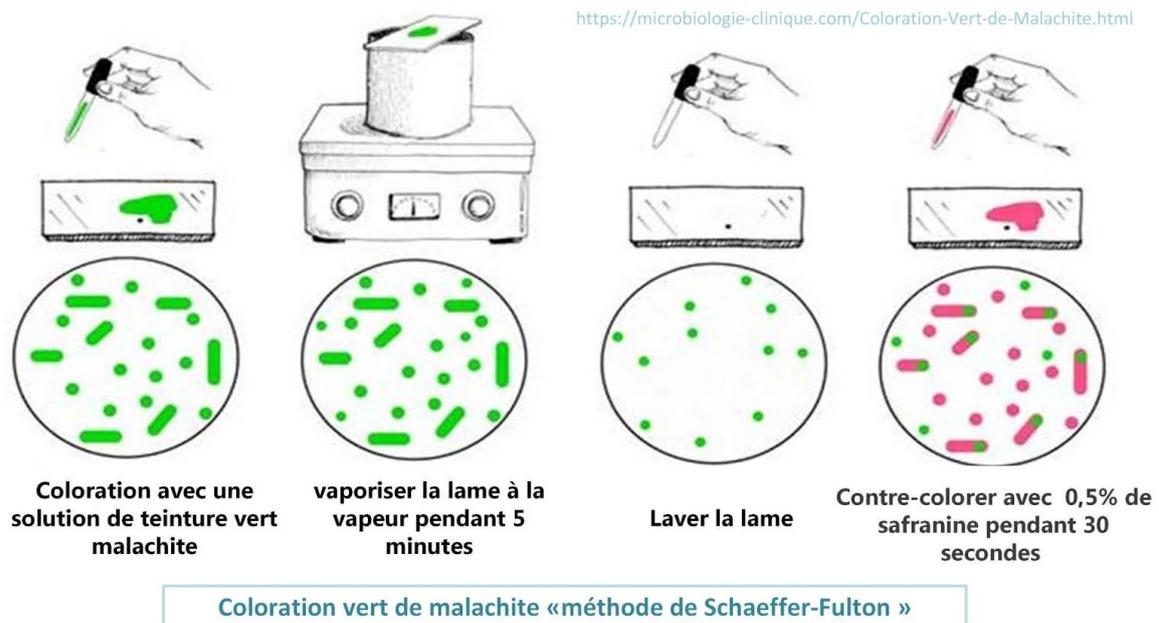


Figure 18 : Coloration au vert de malachite " méthode de Schaeffer-Fulton-(4)

- Intérêt :

Mettre en évidence les spores présentes au sein de quelques types de bactéries, exemple : les *Clostridium* Spp.

- Mode opératoire (voir annexe -03-).(4)

2.2.3.3. Culture :

Une fois reçus, les prélèvements doivent rapidement être inoculés et incubés dans un système anaérobie.

Les milieux utilisés doivent contenir les nutriments nécessaires à la croissance des bactéries anaérobies.

En effet, ces bactéries ont un large éventail de besoins nutritionnels, mais la plupart ont besoin d'hémine et de vitamines K.

Une combinaison de milieux enrichis, non sélectifs, sélectifs et différentiels devrait être utilisée pour le traitement initial, l'isolement et l'identification des bactéries anaérobies à partir des prélèvements cliniques. (69)

Tableau 3: Les milieux de culture anaérobie et leurs intérêts. Inspiré de (69)

Nature du milieu	Milieu	intérêt	interprétation	Inconvénients
Milieux enrichis.	-Gélose coeur/cerveille (BHI) au sang. -Gélose au sang Brucella. -Gélose CDC anaérobie. -Gélose columbia au sang. -Milieu Tryptone soja (TSA) au sang. -Gélose Schaedler au sang.	Milieu primaire d'enrichissement qui permet la culture de toutes les bactéries anaérobies.	La première observation se fait généralement après 48 heures.	Nécessité d'effectuer une coloration au Gram et un ré-isolement aéro-anaérobie car les bactéries aérobies peuvent pousser sur ces milieux.
Milieux sélectifs	-Gélose vancomycine kanamycine au sang (KVLB ou LKV).	Isolement rapide des espèces de <i>Bacteroides</i> et permet la détection précoce des espèces pigmentées de <i>Prevotella spp.</i>	Croissance présumée de <i>Bacteroides spp.</i> , <i>Prevotella spp</i> ou <i>Fusobacterium mortiferum</i> . Pas de croissance de <i>Porphyromonas spp.</i>	Nécessité d'effectuer une coloration au Gram et un ré-isolement aéro-anaérobie. Les levures et les autres bactéries résistantes à la kanamycine peuvent pousser.
	-Gélose à l'alcool phényléthylique au sang.	Inhibe la croissance des bacilles anaérobies facultatifs et empêche l'essaimage du <i>Proteus</i> et de certaines espèces de <i>Clostridium</i> . Les colonies pigmentées de <i>Prevotella</i> et de <i>Porphyromonas</i> peuvent apparaître en premier sur ce milieu.	La majorité des bactéries anaérobies Gram positif ou négatif poussent sur ce milieu.	Nécessité d'effectuer une coloration au Gram et un ré-isolement aéro-anaérobie. Examen des cultures après 24-48 heures, mais une durée d'incubation plus longue peut être nécessaire à certaines espèces à croissance lente.

Diagnostic des infections à bactéries anaérobies strictes

Milieux sélectifs	Gélose Bacteroides-bile-esculine (BBE).	Permet un isolement rapide et une identification présomptive de <i>Bacteroides fragilis</i> . Permet la croissance et l'identification présomptive de <i>Bilophila wadsworthia</i> .	Les colonies de <i>Bacteroides fragilis</i> présentent une couleur allant du marron au noir. <i>Bilophila wadsworthia</i> forme de petites colonies avec un centre noir (forme d'un oeil de poisson).	Nécessité d'effectuer une coloration au Gram et un ré-isolement aéro-anaérobie. Certaines souches de <i>Fusobacterium mortiferum</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , des entérocoques et des levures peuvent se développer sur ce milieu. Certains organismes anaérobies qui devraient se développer sur le BBE peuvent être inhibés, donc il est nécessaire d'inoculer également un milieu non sélectif. <i>Bacteroides vulgatus</i> peut ne pas former de colonies noires ou ne pas décolorer le milieu.
	Milieu CCFA (gélose cycloserine-cefoxitine-Fructose).	Milieu sélectif et différentiel pour l'identification de <i>Clostridium difficile</i> .	<i>Clostridium difficile</i> produit des colonies jaunes d'aspect évoquant le verre dépoli et provoque le virage du milieu du rose originale au jaune à proximité des colonies.	L'aspect des colonies et la coloration au gram doivent correspondre à ceux de <i>Clostridium difficile</i> et d'autres techniques d'identification doivent également être utilisées.

Diagnostic des infections à bactéries anaérobies strictes

<p>Milieux sélectifs</p>	<p>Gélose au jaune d'œuf (EYA)</p>	<p>Utilisé en cas de suspicion de Clostridium ou lorsque la recherche des enzymes protéolytiques (lecithinase ou lipase) peut se montrer utile pour l'identification d'espèces anaérobies.</p>	<p>Une réaction positive à la lecithinase est indiquée par une zone opaque (blanche) dans le milieu autour de la croissance bactérienne. Une réaction positive à la lipase est indiquée par des reflets iridescents à la surface de la croissance bactérienne. La protéolyse est indiquée par un dégagement total autour de la croissance bactérienne.</p>	<p>La lipase est observée sous lumière oblique. Il est préférable de ne pas utiliser toute la surface de la gélose pour que l'activité lecithinase soit comparée avec la partie du milieu qui sert de control négatif.</p>
<p>Les bouillons</p>	<p>-Bouillon au thioglycolate supplémenté avec de la vitamine K, de l'hémine et du bicarbonate de Sodium. -Bouillon viande hachée-glucides. -Bouillon viande hachée-glucose.</p>	<p>Milieux d'enrichissement généraux qui favorisent la croissance de la plupart des bactéries anaérobies. Fournissent une source de nutriments, si l'environnement anaérobie échoue ou lorsque la croissance est inhibée.</p>	<p>Incuber à 35°C jusqu'à ce qu'il y ait culture sur le milieu primaire. S'il n'y pas de culture sur le milieu primaire, il faut incuber le milieu liquide pendant au moins 7 jours et procéder à des ré-isolements.</p>	<p>Effectuer une coloration au Gram uniquement si le milieu d'ensemencement ne révèle aucune croissance ou si les chambres, bocaux ou les poches anaérobies ne fonctionnent pas. Ne jamais se fier exclusivement aux cultures en bouillon pour isoler les anaérobies. La croissance de certaines bactéries anaérobies peut être inhibée par des produits de métabolisme ou des acides produits par des bactéries aéro-anaérobies facultatives à croissance rapide.</p>

Le temps d'incubation diffère entre les différentes espèces (3-5 jours) et dans certains cas particuliers tel que la détection du *Cutibacterium* issue d'une infection de l'articulation prothétique, il est nécessaire de maintenir l'anaérobiose pendant 14 jours.

Chaque type de colonie doit être isolé, testé pour la tolérance à l'air et identifié.

En effet, toutes les colonies doivent être réisolées sur une gélose au sang anaérobie, une gélose chocolat et examinée au microscope après coloration de Gram. Cependant, une attention particulière doit être portée afin que la même colonie se retrouve sur les deux milieux et sur la lame destinée à la coloration de Gram. (4)

La culture ne présente pas d'intérêt diagnostique dans certaines infections comme le tétanos, le botulisme et la gangrène gazeuse.

2.2.3.4. Identification

L'identification des bactéries anaérobies strictes devient une nécessité, en cas d'apparition de complications, surtout chez des patients très jeunes ou très âgés, souffrant de maladies graves sous-jacentes, chez ceux qui nécessitent un traitement prolongé ou dans des infections qui n'ont pas répondu à un traitement empirique.(66)

La première étape, qui est considérée comme la plus importante de l'identification, consiste à confirmer la relation de chaque espèce anaérobie suspectée avec l'oxygène.

Ceci peut être déterminé par l'inoculation des colonies dans un milieu anaérobie, incubé en atmosphère anaérobie et sur une gélose au sang, incubée en atmosphère aérobie.(14)

Une coloration de Gram de toutes les colonies isolées lors de l'incubation doit être étudiée.

2.2.3.4.a. Tests biochimiques :

L'identification biochimique des espèces anaérobies peut être effectuée avec des tests conventionnels ou des kits commerciaux plus récents.

Les techniques conventionnelles utilisent une solution d'hydrate de carbone à tester, ajoutée à un bouillon d'extrait de levure aux peptones protéiques pour obtenir une concentration finale de 1 %. Après inoculation et incubation, la fermentation du sucre spécifique peut être détectée en mesurant le changement de pH avec un indicateur ou en mesurant directement la chute du pH avec un pH-mètre (> 0,5 est considéré comme positif).

L'activité uréase est détectée de manière similaire et une augmentation de pH supérieure à 0,5 est considérée comme positive.

La présence d'une catalase, la production d'indole, la réduction du nitrate, l'hydrolyse de l'esculine et l'activité gélatinase représentent également des tests utiles.(14)

Parmi les tests d'identification commerciaux, on distingue plusieurs systèmes, notamment :

- Le système minitek : c'est une plaque à plusieurs puits et chaque puits est imprégné par les substrats biochimiques, à l'aide de disques de papier filtre, et par la suspension d'organismes à étudier. Les plaques sont incubées en anaérobiose pendant 48 heures puis examinées à l'aide de systèmes numériques fournis par les fabricants.(14)
- L'API Zym : c'est un système de détection d'enzymes, représenté par une galerie de cupules en plastique, au fond desquelles se trouve un support en tissu portant les substrats et le

tampon. Les organismes à tester sont cultivés sur des plaques de gélose au sang et une suspension de densité équivalente au standard numéro 5 de Mc Farland est préparée dans de la peptone(70). Lorsque l'inoculum bactérien est ajouté, il provoque un changement de couleur due à l'action des enzymes bactériennes préformées et l'identification peut être obtenue dans les quatre heures, car elle ne dépend pas de la croissance bactérienne.(71)

- Galerie API 20 A : Ce sont des bandelettes en plastique contenant 20 microtubules de substrats déshydratés pour tester l'indole, la catalase, l'hydrolyse de l'urée, de la gélatine et de l'esculine, ainsi que la fermentation du glucose et d'autres glucides. Les microcupules de la bandelette sont inoculées avec une suspension trouble de colonies préparées dans un bouillon Lombard-Dowell et incubées en anaérobiose pendant 24 à 48 heures. L'indicateur des tests de fermentation est le pourpre de bromocrésol ; Une réaction acide est jaune ou jaune-vert ; une réaction négative est violette. Divers anaérobies réduisent l'indicateur à des nuances incolores de vert-brun ou d'autres couleurs, ce qui rend parfois son interprétation difficile.

Cependant, pour les anaérobies assaccharolytiques, ces techniques, qui dépendent fortement des tests de fermentation des sucres (ou des enzymes glycolytiques), n'ont pas de valeur diagnostique.(14)

2.2.3.4.b. La recherche des toxines :

Elle repose sur l'identification de la souche bactérienne par l'identification de la toxine qu'elle produit.

La recherche des toxines est particulièrement importante en cas de colite pseudomembraneuse, par exemple, car la bactérie responsable peut être portée de manière asymptomatique.

Elle est utilisée surtout pour les espèces du genre *Clostridium*.

Elle peut être effectuée par inoculation chez l'animal, c'est le cas de *Clostridium Tetani*, *Clostridium botulinum*, ou par technique ELISA, c'est le cas de *Clostridium difficile*.

Pour la toxine botulique, elle peut être recherchée sur le sérum du patient ou dans les aliments contaminés.

Pour les toxines produites par le *Clostridium difficile*, elles sont recherchées dans le surnageant de culture, ou dans le surnageant centrifugé, filtré des selles.

L'entérotoxine produite par le *Clostridium perfringens*, peut être recherchée dans les selles ou les aliments responsables d'intoxications alimentaires.(72)

2.2.3.4.c. La biologie moléculaire :

C'est un ensemble de techniques basées sur l'étude et la détection des acides nucléiques. Différentes techniques peuvent être employées, notamment, l'hybridation, le séquençage de gènes et la PCR.(73)

2.2.3.4.d. La chromatographie gaz-liquide :

Elle permet la détection des bactéries anaérobies par la mesure des produits volatils et non volatils du métabolisme anaérobie.

Le profil des acides gras produits est typique de chaque espèce.

La chromatographie gaz-liquide joue un rôle important dans l'identification définitive de nombreuses espèces de *Bacteroides*, *Porphyromonas* et *Fusobacterium*.(14)

2.2.3.4.e. La spectrométrie de masse :

Ces dernières années, la spectrométrie de masse par désorption-ionisation laser assistée par matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry MALDI-TOF) s'est avérée très performante dans l'identification des bactéries anaérobies. Elle est basée sur l'ionisation douce de grosses molécules telles que les protéines, les peptides, les lipides, les sucres et l'ADN, puis, leur identification par comparaison de leurs spectres de masse à ceux de souches de référence connues.

C'est une méthode très sensible (car une faible quantité de biomasse est suffisante pour une identification correcte) et qui permet souvent, une identification précoce des espèces directement à partir des cultures primaires, sans réisolement ou tests supplémentaires de tolérance à l'air. (4)

2.3. Etapes post-analytiques

Incrimination des bactéries anaérobies strictes en pathologie clinique :

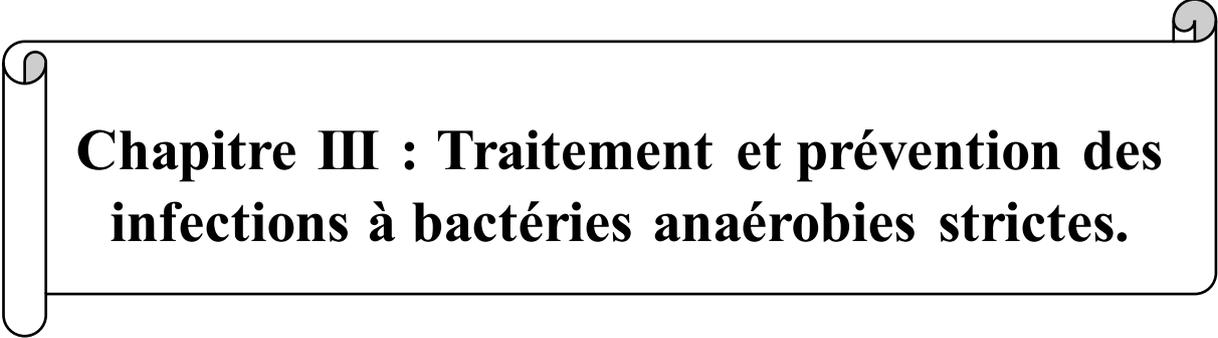
Selon Robert Koch, « Dans une maladie infectieuse, l'agent étiologique doit être présent et isolé microbiologiquement, mais aussi déterminer la même maladie et retrouvé lorsqu'il est introduit dans un nouvel hôte ».

Les bactéries anaérobies strictes font partie intégrante des flores commensales de l'homme, cependant, ces bactéries peuvent sortir de leur confinement à l'occasion de gestes chirurgicaux, traumatismes ou de maladies dégénératives pour provoquer des infections plus ou moins sévères.

Ces infections sont le plus souvent mixtes et leurs sites sont superposables aux sites de colonisation physiologiques.(23)

D'autre part, l'absence de culture en aérobie associée à une leucocytose avec prédominance des polynucléaires neutrophiles, nous orientent aussi vers l'incrimination de ces bactéries.(54)

Par contre, certaines espèces sont considérées comme pathogènes strictes et leur simple identification est suffisante pour les incriminer, c'est le cas du *Clostridium tetani* et du *Clostridium botulinum*.



Chapitre III : Traitement et prévention des infections à bactéries anaérobies strictes.

3. Traitement et prévention des infections à bactéries anaérobies strictes.

La prise en charge des infections à BAS est compliquée, ceci est due à la croissance lente de ces microorganismes et leur résistance croissante aux antibiotiques. Le traitement peut être médical et/ou chirurgical en fonction de la gravité de l'infection. Chez certains patients la thérapie antimicrobienne peut être suffisante pour traiter l'infection, chez d'autres elle doit être combinée à d'autres thérapies.

Le principe de la gestion de ces infections comprend :

- La neutralisation des toxines produites par les anaérobies strictes par des antitoxines spécifiques en particulier dans les infections à *Clostridium Spp* (*Tetani*, *Botulinum*).
- Contrôle de l'environnement : représenté par les actes chirurgicaux et le traitement par Oxygène Hyperbare O.H.B.
- Le traitement antimicrobien : son rôle est de limiter la propagation locale et systémique de l'infection.

3.1. Traitement des infections à bactéries anaérobies strictes :

3.1.1. Drainage chirurgical

Il représente le traitement le plus important et comprend : le débridement des tissus nécrotiques et drainage du pus, soulagement de l'obstruction et augmentation de l'oxygénation des tissus ainsi que l'amélioration de la circulation.

Le drainage des abcès pulmonaires, à l'exception de l'empyème, est généralement contre indiqué car les abcès peuvent s'étendre vers d'autres tissus pulmonaires lors de l'intervention.

Le drainage par voie percutanée ou par cathéter des abcès intra-abdominaux à l'aide des directives d'échographies et de la tomодensitométrie ont été fréquemment utilisés en remplacement de la chirurgie.

Dans le cas des abcès intracrâniens le drainage est en général obligatoire. L'urgence du drainage dépend de l'augmentation ou pas de la pression intracrânienne. Par contre, dans les premiers stades de la maladie, quand il n'y a que la cérébrite et que la capsule autour n'est pas encore formée, le traitement médical par les ATB peut être curatif.(74)

3.1.2. Oxygénothérapie Hyperbare

Le traitement par l'oxygène hyperbare constitue un traitement d'appoint. Il a été proposé dans le cas des gangrènes et de cellulites, il permet de prévenir ou de réduire la gangrène à un stade précoce.

L'efficacité du traitement par OHB est obtenue par les mécanismes d'actions suivants :

- L'apport de l'oxygène augmente la bactéricidie des PNN et possiblement des macrophages.

- La toxicité directe de l'oxygène hyperbare sur les anaérobies en augmentant la production des radicaux libres oxygénés à partir des tissus nécrosés.
- Il stimule la prolifération de fibroblaste et l'angiogenèse permettant une augmentation de la production de collagène favorisant la cicatrisation des plaies.(25)

L'effet de l'OHB est plus bénéfique sur la myonécrose clostridienne que sur d'autres infections nécrosantes car l'OHB a une toxicité directe sur le *Clostridium perfringens* par contre il n'est que bactériostatiques pour les autres germes.(74)

Ce traitement se fait sur des "caisson" hyperbare individuel ou multiplace. L'oxygène est administré à l'aide d'un masque. L'utilisation de chambre multiplace est réduite dans les cas où les patients nécessitent une assistance : respiration assistée, maintien de la pression artérielle...etc, ou dans des cas septiques.

L'exposition aux traitements est en général entre 2 et 2.8 ATM pendant 60-90 minutes. Le patient fait 7 séances en 3 jours donc 3 - 2 - 2. Mais ce schéma thérapeutique peut changer selon l'état du malade.(75)

L'utilisation de l'oxygène hyperbare doit être envisagée lorsque les tissus concernés ne peuvent être excisés chirurgicalement exemple : paroi paraspinale, abdominale.

L'utilisation de OHB en jonction avec d'autres thérapies n'est pas contre indiqué du moment qu'elle ne retarde pas d'autres procédures.

La limitation de l'utilisation de l'oxygénothérapie hyperbare est due au manque de disponibilité des chambres hyperbares dans la plupart des hôpitaux et la dangerosité du transfert d'un patient gravement malade vers des établissements dotés d'unité d'oxygénothérapie hyperbare et aussi à cause de l'absence de soins immédiats pour les patients risqués et instables.

L'utilisation de ce dernier doit se limiter aux centres spécialisés où les complications peuvent être limitées au minimum. Il faut noter que le transfert des patients ne doit se faire en aucun cas sans débridement chirurgicale préalable.(74)

3.1.3. Antibiothérapies

Le traitement par antibiothérapie reste compliqué car les BAS sont souvent retrouvées dans des infections dites polymicrobiennes en association avec d'autres germes aérobies.

Le traitement à base d'antibiotiques doit être efficace contre les deux composants de ces infections : les BAS + Bactéries aérobies. Il doit également être disponible sous différentes formes galéniques (orale/parentérale). En cas d'échec thérapeutique par antibiothérapie l'infection peut persister et des complications plus graves peuvent survenir.(24)

Les critères à respecter lors du choix des antibiotiques :

- Ils doivent être actifs sur tous les germes ciblés.
- Ils doivent induire peu ou pas de résistance.
- Ils doivent atteindre des niveaux suffisants du site infecté.
- Ils doivent avoir des effets minimes sur la santé et la sécurité du patient.

L'échec de guérison par le traitement antimicrobien peut être lié aux raisons suivantes :

- Le développement de résistance des bactéries.
- Atteinte insuffisante du niveau tissulaire.

- Interaction médicamenteuse.
- Le développement d'un abcès car l'environnement autour de ce dernier est néfaste pour l'action des ATB : sa capsule interfère avec la pénétration des ATB.
- La présence des PLP et des enzymes telle que les bêta-lactamases inactivent les ATB.
- Le faible PH et l'environnement anaérobie à l'intérieur de l'abcès sont délétères surtout pour les aminoglycosides.

Il faut noter que l'environnement anaérobie et le Ph acide peuvent être présents sur un site infecté sans le développement d'abcès(74)

3.1.3.1.Sensibilité au ATB

La sensibilité aux ATB doit être déterminé dans les cas suivants: cas d'infections sévères exp: infection du SNC, endocardites, et aussi dans les cas des traitement prolongé exp: infections ostéoarticulaires.(34)

Pour déterminer les sensibilités aux antibiotiques on procède à la recherche des CMI des différents agents antimicrobiens. Le choix des ATB utilisé pour le traitement devrait se porter sur les ATB actif sur la majorité des BAS selon la liste suivante : amoxicilline, amoxicilline/acide clavulanique, imipenème, métronidazole, clindamycine, chloramphénicol et vancomycine (pour les bactéries à Gram positif et comme aide à l'Identification). L'espèce isolée, l'épidémiologie locale, le type de l'infection et du traitement probabiliste préconisé peuvent nous orienter à compléter cette liste et avoir une antibiothérapie efficace.

Bien qu'il est important de déterminer la sensibilité aux antibiotiques, cette démarche reste difficile car l'isolement des BAS prend beaucoup de temps et souvent une antibiothérapie à large spectre est instituée avant la réception des résultats de sensibilité aux antibiotiques.(5)

Mais la détermination de la sensibilité sera utilisée comme base donnée pour le traitement d'autres patients présentant un clinique similaire.(76)

3.1.3.2.Résistance aux ATB

Les BAS comme d'autres germes peuvent présenter de nombreuses résistances : Naturelles ou Acquisées. Cette résistance est parfois connue pour quelques genres avec des normes et des CMI précises, pour d'autres elle reste inconnue.

Les BAS présentent 4 résistances naturelles : Aminocyclitol, Aztreonam, Triméthoprimes, Quinolones.

- La résistance aux Aminocyclitol : due au métabolisme des Anaérobies, les ribosomes sont sensibles mais absence du transport actif à travers la membrane qui empêche de rejoindre la cible. Ce transport actif est absent chez le genre Clostridium et déficient chez le genre Bacteroides.
- La résistance à l'aztreonam est due à la faible affinité de cette molécule au PLP (protéines liant la pénicilline) des BAS. exception faite pour le genre Fusobacterium
- la résistance à la triméthoprime est due à la forte activité du dihydrofolate réductase chez les BAS

L'activité synergique du triméthoprime + sulfaméthoxazole reste conservé sur un certain nombre de souches

Traitement et prévention des infections à bactéries anaérobies strictes

- Les Fluoroquinolones ont une faible activité sur les BAS. exp: ofloxacin, ciprofloxacine, levofloxacine.(32)

Les principaux mécanismes de résistance acquise aux ATB sont les suivant :

- Les enzymes d'inactivation. Exp: Les bêta- lactamase
- PLP (protéine de liaison à la pénicilline) de faible affinité
- Diminution de la perméabilité de la paroi par le canal des porines.(32)

Le genre Bacteroides :

Le genre Bacteroides et surtout *Bacteroides du groupe fragilis* est considéré comme le plus résistant des BAS, fréquemment rencontré dans les infections intra-abdominale et gynécologique et aussi dans les infections polymicrobienne, donc leur résistances naturelles ou acquises doivent être prises en considération lors des antibiothérapies probabilistes. Ces espèces résistent naturellement aux aminopénicillines par la présence d'une pénicillinase naturelle (CepA) (quelque souche ne possèdent pas de pénicillinase donc présentent des CMI sensible), au céfamandole, au céfuroxime et à la céfalotine (cfxA), ainsi qu'à la fosfomycine, aux glycopeptides et aux polymyxines (colistine et polymyxine B). Cette résistance est médiée par les gènes suivants :

*CepA : céphalosporinase codant pour la résistance aux céphalosporines, aux aminopénicillines

*cfxA: résistance de haut niveau à la cefoxitine et d'autre betalactamines.(77)

Les antibiotiques fréquemment actif sur ces espèces sont le métronidazole, les associations pénicillines-inhibiteurs, la céfoxitine, les carbapénèmes, la clindamycine, la tigécycline, le métronidazole, et aussi le linézolide.(32)

Genre Clostridium :

Les bactéries du genre clostridium résistent naturellement à la fosfomycine et aux polymyxines.

Le *C. perfringens* est sensible à l'ensemble des aminopénicillines et des céphalosporines contrairement au *C. difficile* qui résiste naturellement aux céphalosporines et à la cefoxitine.

D'autres espèces de ce genre possèdent une betalactamase, donc leurs traitement nécessite l'association d'un inhibiteur exp: Acide clavulanique.

Enfin l'espèce *C. tertium* résiste à l'ensemble des bêta-lactamines, au métronidazole et à la clindamycine, son traitement n'est possible qu'avec les glycopeptides et les oxazolidinones.(32)

Genre Prevotella :

Naturellement résistant aux sulfamides, à la fosfomycine, à l'acide fusidique, et aux glycopeptides. Ce genre ne possède pas de pénicillinase donc peut être sensible aux pénicillines sans association d'inhibiteurs.(32)

Genre Porphyromonas :

Naturellement résistant à la fosfomycine et aux polymyxines. Ce genre présente peu de résistances.(32)

Genre Fusobacterium :

Une résistance naturelle aux macrolides et une résistance naturelle à la rifampicine pour les deux espèces :*F. varium* et *F. mortiferum*. Il existe aussi la possibilité de production d'une bêta-lactamase mais à des taux faibles.(32)

Genre Veillonella :

Ces germes ont une faible résistance aux glycopeptides et aux macrolides à faible degré. Environ 60 % des souches sont résistantes à la pénicilline, et 40 % à l'amoxicilline. Un peu plus de 10 % des souches ont une résistance à la tétracycline.(32)

Genre Actinomyces :

Les bactéries de ce genre sont sensibles aux aminopénicillines, mais résistent naturellement au métronidazole par absence du métabolisme ciblé. Elles sont également sensibles à linézolide et la clindamycine donc ces deux derniers sont utilisés comme alternatifs pour les souches résistantes à la pénicilline. (32)

Genre Propionibacterium :

Les bactéries de ce genre sont naturellement résistantes au métronidazole, mais sont très sensibles aux aminopénicillines et aux céphalosporines, ainsi qu'à la vancomycine, aux fluoroquinolones et au linézolide (32).

Tableau 4: Tableau résumant la sensibilité et les résistances des bactéries anaérobies aux antibiotiques.

Genres	Sensibilité	Résistance
Bacteroides	Metronidazole, pénicillines-inhibiteur, ceftioxime, carbapénèmes, clindamycine, tigécycline, linézolide.	Aminopénicillines, céfamandole, céfuroxime, céfalotine, fosfomycine, glycopeptides, polymyxines.
Clostridium	Variable selon l'espèce.	Fosfomycine, polymyxines.
Prevotella	Aminopénicillines.	Fosfomycine, Acide fusidique, Glycopeptides.
Porphyromonas	Métronidazole.	Fosfomycine, Polymyxine.
Fusobacterium	Métronidazole.	Macrolides, Rifampicine (F. varium, F. mortiferum).
Veillonella	Métronidazole	Glycopeptides Macrolides (a faible degré).
Actinomyces	Aminopénicillines, Fluoroquinolone, Clindamycine, Linezolide.	Métronidazole.
Propionibacterium	Aminopénicillines, Vancomycine, Linezolide	Céphalosporines, Fluoroquinolone, Métronidazole.

3.2. Prévention des infections à bactéries anaérobies strictes :

L'immuno-prévention :

Une vaccination obligatoire pour le *Clostridium tetani* et recommandée pour le *Clostridium botulinum* :

- Vaccin contre le tétanos :

Le vaccin contre le tétanos est l'une des vaccinations les plus simples qui soient. Le statut vaccinal des travailleurs doit être pris en compte dans l'évaluation des risques pour les travailleurs en contact avec cet organisme et/ou cette toxine. Bien que le risque de tétanos associé au laboratoire soit faible, l'administration d'une anatoxine réduit encore le risque d'exposition aux toxines pour le personnel de laboratoire et le personnel soignant. L'immunogène du vaccin, l'anatoxine tétanique, est un dérivé de la toxine tétanique rendue non toxique (détoxifiée). Les formulations vaccinales monovalentes de l'anatoxine tétanique ne sont pas actuellement disponibles dans le monde. Au lieu de cela, l'anatoxine tétanique est l'un des deux ou plusieurs composants inclus dans une

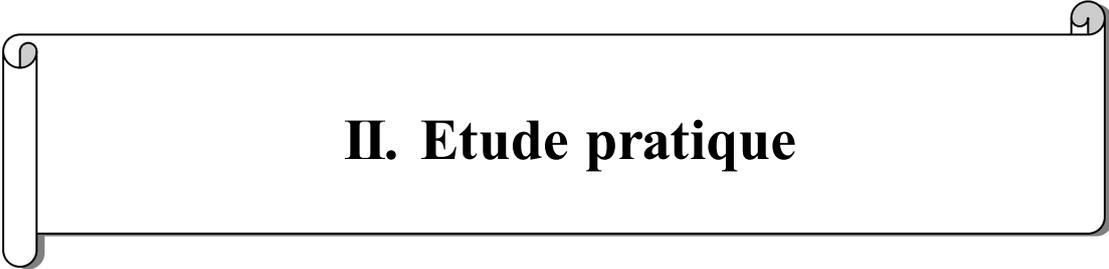
variété croissante de vaccins combinés. Toutes les formulations de vaccin antitétanique actuellement utilisées contiennent également de l'anatoxine diphtérique.(55)

- Vaccin contre le botulisme :

La vaccination contre le botulisme est recommandée pour tout le personnel travaillant en contact direct avec des cultures de

Clostridium botulinum ou des solutions mères de neurotoxine botulique.

Actuellement, il n'existe aucun vaccin homologué contre le botulisme aux États-Unis. Le vaccin contre le botulisme le plus largement distribué était une anatoxine BoNT pentavalente (PBT) contre les sérotypes A-E, administrée jusqu'en 2011 dans le cadre d'une licence de nouveau médicament expérimental. Un vaccin binaire composé des domaines de liaison aux récepteurs (RBD) recombinants et non toxiques des sérotypes A1 et B1 a terminé un essai clinique de phase II, mais n'a pas encore obtenu de licence complète.(78)



II. Etude pratique



1. Présentation de l'étude

1.1. Description de l'étude :

Il s'agit d'une étude prospective étalée sur une période de 4 mois allant du 01 Janvier au 30 Avril 2021, effectuée au niveau du laboratoire central du CHU Blida, unité Frantz Fanon.

Elle a porté sur un échantillon de 90 prélèvements, reçus au niveau de l'unité de microbiologie du laboratoire central du CHU Blida, Unité Frantz-Fanon.

1.2. Objectifs de l'étude :

L'objectif principal de notre étude est la détermination de l'implication des bactéries anaérobies dans diverses infections à type de suppurations ou de sérosités en particulier.

L'objectif secondaire est l'établissement d'une procédure adaptée aux moyens disponibles et en accord avec les recommandations en vigueur en matière de recherche et d'identification des bactéries anaérobies.

1.3. Critères d'inclusion et d'exclusion :

Les prélèvements inclus dans notre étude sont des prélèvements qui répondent aux conditions d'anaérobiose : aspect purulents, présentant une odeur fétide ou une coloration noire, prélevés en quantité suffisante et immédiatement acheminés au laboratoire.

Nous avons également pris en considération le dégagement de gaz, du pus ou des tissus infectés, comme critère d'inclusion.

Les prélèvements ayant été exclus de notre étude sont les écouvillons, les seringues ayant été exposés à l'air pendant une longue période ou contaminés par la flore endogène et en cas de quantité insuffisante.

A decorative horizontal border with rounded ends, resembling a scroll, containing the section title.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel :

2.1.1 Matériel biologique :

Le matériel biologique est dans la majorité des cas des prélèvements obtenu à partir de suppurations profondes (ponction d'abcès, de kystes et de pus), liquides d'épanchement (liquide pleural, liquide articulaire, liquide de drainage péritonéal), plaies, produits d'aspiration et matériel d'ostéosynthèse.

2.1.2. Matériel non biologique :

Nous avons eu recours au matériel habituellement utilisé au laboratoire pour la recherche et l'identification des germes banaux aérobies et anaérobies (tableau -05-).

Tableau 5 : Tableau récapitulatif du matériel de routine utilisé au laboratoire de microbiologie.

Appareillage	Verrerie	Autre matériel	Réactifs utilisés
-bain marie -système d'hémoculture automatisé (BACTEC). -hotte à flux laminaire -étuve -balance	-pipette pasteur -lames et lamelles -tube à essais -tube stérile -Flacon de 1L d'eau distillée	-Bec Bunsen -les boîtes de pétri -les disques d'ATB -Bistouri. -Eau physiologique stérile -Écouvillon -Gants à usage unique	-Réactif de Kovacs -Eau oxygénée H2O2 -Violet de gentiane -Alcool -Lugol -Fuchine -Bleu de méthylène

Ainsi que le matériel spécifique à la recherche de bactéries anaérobies :

- Galerie Api 20A.
- Genbag.
- Genbox.
- Les boîtes anaérobies.
- Les poches anaérobies.
- L'indicateur d'anaérobiose.
- Gélose Columbia.
- Sang frais.
- Milieu d'enrichissement Schaedler.

2.2. Méthodes :

2.2.1. Etapes pré-analytiques :

2.2.1.1. Prélèvement et transport :

Les prélèvements destinés à la recherche des anaérobies sont collectés, transportés et conservés dans des conditions qui permettent la survie des bactéries anaérobies présentes dans les échantillons.

De ce fait, les services du CHU Blida, Unité FRANTZ FANON ont été notifié des bonnes pratiques de prélèvement et de transport, à l'aide de la fiche technique des prélèvements destinés à la recherche des bactéries anaérobies suivante :

Les bonnes pratiques de prélèvements
anaérobies :

Où rechercher les
bactéries anaérobies ?

Ponctions de
pus ou de
suppurations
profondes.

Sang placé
dans des
flacons
d'hémoculture
anaérobies.

Fragments de
tissus et
biopsies.

Fluides
corporels
normalement
stériles.

Dans quels cas doit-on
rechercher les bactéries
anaérobies ?

Prélèvement
dégageant une
odeur fétide.

Site de
l'infection à
proximité de la
muqueuse où
la microflore
anaérobie
réside
habituellement.

Présence d'une
nécrose, d'une
mort
cellulaire,
d'une
gangrène ou
de crépitement
des tissus.

Echec du
traitement de
l'infection par
des
antibiotiques
efficaces
contre les
bactéries
aérobies
uniquement.

Notion de
morsure, de
pique ou de
chirurgie
abdominale ou
gynécologique.

Le prélèvement doit être effectué avant le début de l'antibiothérapie.

Avant le prélèvement :



La décontamination des mains par lavage au savon ou avec une solution hydro-alcoolique.

Décontamination de la surface à prélever du centre vers la périphérie.

Le prélèvement doit être correctement étiqueté et doit contenir toutes les informations cliniques nécessaires.

Le prélèvement :



En cas de collection purulente, pratiquer une ponction profonde à l'aide d'une aiguille stérile. L'air doit, ensuite, être chassé de la seringue et elle doit être soigneusement fermée.

Les prélèvements issus de biopsies ou de pièces anatomiques doivent être placés dans des récipients stériles, puis dans une poche anaérobie scellée contenant un générateur d'atmosphère anaérobie.

Dans le cas de sang ou prélèvement liquide, il doit être placé dans un flacon d'hémoculture anaérobie.

Les écouvillons doivent être évités car ils exposent l'échantillon à l'oxygène, qu'ils ont tendance à se dessécher et qu'ils ne retiennent qu'un faible volume.

Après le prélèvement :



Le prélèvement doit être acheminé au laboratoire dans les plus brefs délais afin d'éviter la mort prématurée des espèces anaérobies.

Figure 19 : Fiche technique relative aux bonnes pratiques de prélèvements anaérobies (originale).

Après sa réception au laboratoire le prélèvement doit être enregistré, examiné puis ensemencé rapidement dans un milieu préparé extemporanément.

Les prélèvements sont conservés dans une étuve à 37°C jusqu'à préparation du milieu.

2.2.1.2. Enregistrement des prélèvements :

Afin de garantir la bonne prise en charge et la traçabilité des prélèvements reçus. Ces derniers sont enregistrés dès leur réception dans des registres qui leur sont dédiés en fonction du type de prélèvement en notifiant les informations suivantes :

-Nom et prénom.

-Age.

-Sexe.

-Service.

-Type de prélèvement.

-Renseignements cliniques (motif d'hospitalisation, traitement éventuel, antécédents cliniques...).

Ensuite un numéro leur est attribué afin de faciliter son suivi.

2.2.2. **Etapas analytiques**

2.2.2.1. Examen macroscopique du prélèvement :

Étape importante dans l'examen microbiologique, se fait avant la mise en culture du prélèvement.

Le but de l'examen macroscopique est de déterminer les différentes caractéristiques du prélèvement (aspect, odeur, consistance) qui peuvent nous orienter vers une infection à bactéries anaérobies citant : l'aspect purulent de couleur jaunâtre, l'odeur fétide et la coloration noire des exsudats.

2.2.2.2. Examen microscopique

a. Examen à l'état frais

b. Examen après coloration au bleu de méthylène

Intérêt :

Cet examen a pour but de typer la réaction inflammatoire si elle est présente par dénombrement des cellules (PN, lymphocyte)

Il permet aussi de mettre en évidence la morphologie des bactéries (cocci, bacilles...)

Avantages et inconvénients :

- Coloration simple et rapide

Matériel et méthodes

- Met en évidence des éléments qui nous orientent vers la présence des bactéries anaérobies, exemple : prédominance des PNN + Absence de culture en aérobie
- ne permet pas de distinguer les bactéries de même morphologie

Mode opératoire : (Voir annexe-04-)

2.2.2.3. Mise en Culture :

2.2.2.3.a. Préparation du milieu :

Le milieu que nous avons utilisé pour la recherche des anaérobies est le Columbia additionné du sang frais qui doit être extemporanément préparé.

La préparation du milieu peut être réalisée soit à partir de :

- Milieu Columbia en poudre (lyophilisé) :
 - On pèse 39 grammes de Columbia en poudre qu'on dissout dans un litre d'eau distillée.
 - On agite le flacon énergiquement.
 - On positionne le flacon au centre de la cuve de l'autoclave de manière d'éviter sa détérioration par l'excès de chaleur.



Figure 20 : Gélose Columbia en poudre. (Originale)

- Milieu Columbia prêt à l'emploi :

Nous avons utilisé des flacons de Columbia prêt à l'emploi de volumes de 180 et 250 ml, Ils nous ont permis d'obtenir respectivement 7 et 10 boîtes de pétri pour chaque flacon.

On fait fondre la gélose au bain-marie ou à l'autoclave. Une fois que la gélose est prête on laisse refroidir à température ambiante sur un support en carton ou en bois en évitant tout contact direct avec la paillasse afin de prévenir la formation de grumeaux.

Matériel et méthodes

Lorsque le flacon est supportable au toucher (Température 40 – 45 degrés), on peut procéder à l'addition du sang frais à 10% puis on homogénéise.

Le coulage des flacons de gélose doit se faire rapidement au voisinage du champ stérile (10 centimètres autour du bec bunsen), on s'assurant de remplir les boîtes de pétri jusqu' à 4 millimètres, puis on élimine les bulles d'air par flambage au bec bunsen.

En attendant la gélification du milieu, les boîtes de pétri ne doivent pas être empilées pour éviter la cuisson du sang.

Ensuite les boîtes doivent être classées dans le séchoir jusqu' à disparition de toutes les gouttes d'eau présentes à la surface de la gélose.



Figure 21 : Flacon de gélose Columbia prêt à l'emploi de 250 ml. (Originale)



Figure 22: Flacon de gélose Columbia prêt à l'emploi de 180 ml. (Originale)



Figure 23 : Autoclave. (Originale)



Figure 24: Addition de sang frais à la gélose Columbia. (Originale)

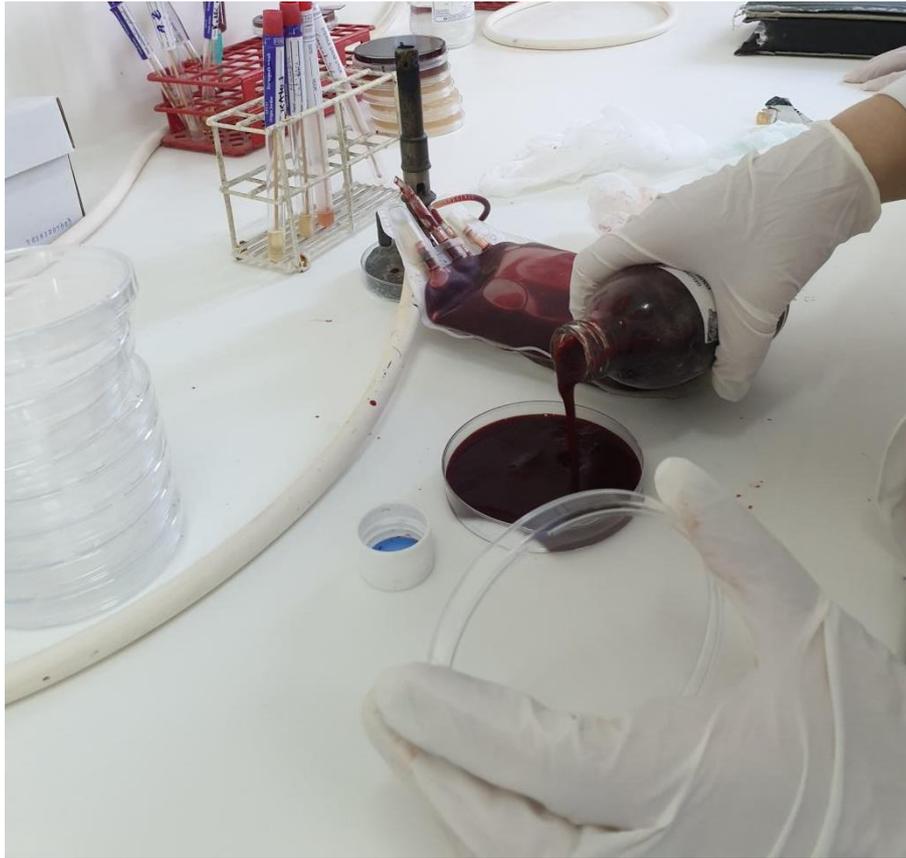


Figure 25: coulage du milieu Columbia au sang frais. (Originale)

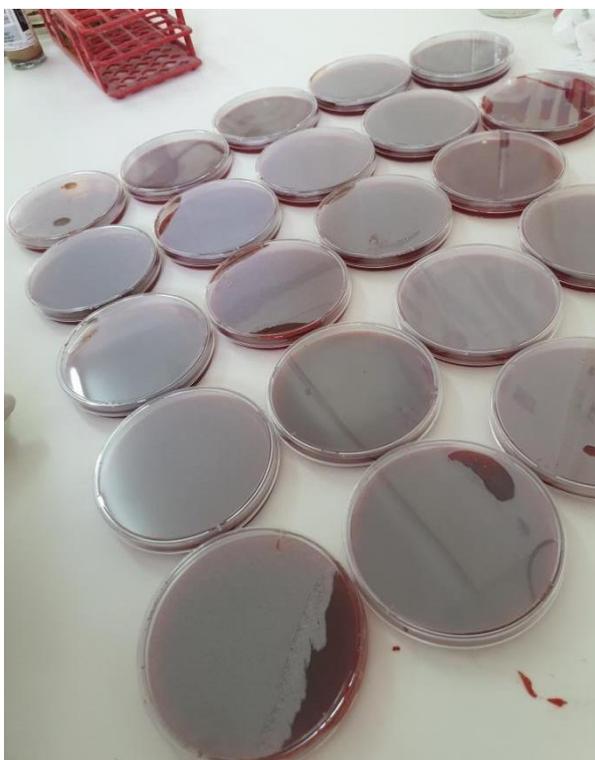


Figure 26 : Gélification des milieux Columbia au sang frais. (Originale)



Figure 27 : Séchage des milieux Columbia au sang frais au niveau du séchoir. (Originale)

Matériel et méthodes

2.2.2.3.b. Ensemencement et incubation

- Prélèvement liquide :

Une goutte du prélèvement est déposée à la surface de la gélose puis étalée à l'aide d'une pipette stérile, en utilisant la méthode des 3 cadrans.



Figure 28 : Prélèvement liquide destiné à la recherche des BAS. (Originale)



Figure 29 : Ensemencement d'un prélèvement liquide sur gélose Columbia au sang frais. (Originale)

Matériel et méthodes

- Prélèvement solide :

La première étape consiste au broyage préalable de l'échantillon (os par exemple) à l'aide d'un mortier, l'addition du milieu d'enrichissement Schaedler, ensuite l'ensemencement d'une goutte de ce dernier.

La culture doit se faire dans les 2 atmosphères (en aérobie sur un milieu GSC ou GSF et en anaérobie sur le milieu Columbia au sang frais).

En aérobie sur les milieux GSC, Hecktoen et Chapman, ces boîtes sont incubées dans une Jarre en atmosphère riche en CO₂, puis placées dans une étuve à 37°C.

En anaérobie sur le milieu Columbia au sang frais, placé immédiatement dans une boîte ou une poche anaérobie, accompagné d'un générateur (Genbag, Genbox) et d'un indicateur d'anaérobiose qui se présente sous forme de bandelettes de bleu de méthylène qui virent du bleu au transparent en absence d'oxygène.

Les petites boîtes anaérobies de 2.5 L peuvent contenir 12 boîtes de Petri et sont incubées avec un seul sachet de générateur d'anaérobiose, alors que les grandes boîtes anaérobies de 6.5L peuvent contenir 33 boîtes de Petri et nécessitent l'utilisation de 2 sachets de générateurs d'anaérobiose.

Dans le cas de l'utilisation des poches anaérobies, elles peuvent contenir 2 boîtes de Petri lorsque celles-ci sont fermées au premier niveau et 5 boîtes de Petri lorsqu'elles sont fermées au 2eme niveau.

Le système anaérobie est ensuite placé dans une étuve à 37°C.



Figure 30: Bags générateurs d'anaérobiose.
(Originale)



Figure 31 : Bandelettes indicatrices
d'anaérobiose. (Originale)



Figure 32: Boite anaérobie grand format. (Originale)



Figure 33 : Boite anaérobie petit format. (Originale)



Figure 34 : Boîtes et poches anaérobie incubées au niveau de l'étuve à 37°C. (Originale)

La lecture :

L'incubation des boîtes en atmosphère aérobie dure 48 heures, avec une première observation après 24 heures. En cas de culture positive, on peut utiliser les techniques habituelles d'isolement et d'identification des germes aérobie.

En cas de culture négative, les boîtes sont réincubées.

L'incubation des boîtes en atmosphère anaérobie, dure de 5 à 14 jours.

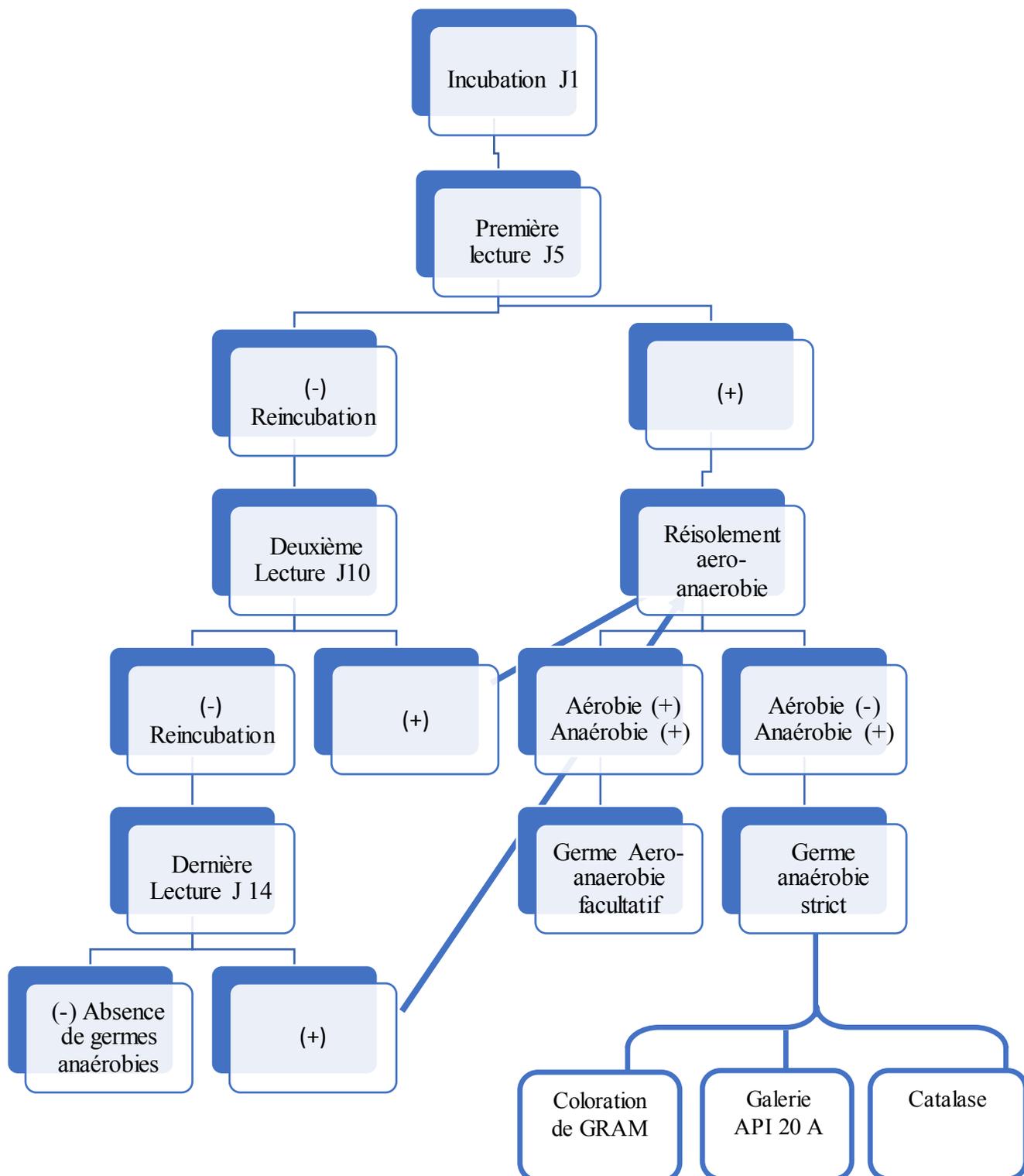
Matériel et méthodes

- En cas de culture négative, les boîtes sont ré-incubées et relues au J-10, si la culture est toujours négative, une dernière lecture se fait au J-14 qui, si elle est toujours négative, témoigne l'absence de germes anaérobies.
- En cas, de culture positive au J-5, j-10 ou J-14, on procède comme suit :
 - En cas de culture mono-microbienne, C'est-à-dire d'aspect uniforme avec poussée tout au long des stries, on effectue un isolement aérobie et anaérobie.
 - En cas de Culture polymicrobienne, c'est-à-dire présence de plusieurs types de colonies d'aspect, de couleur, ou de tailles différentes (Colonies fines, étalées, muqueuses, noires, blanches, dorées), on effectue un isolement en aérobie et en anaérobie de chaque type de colonie.

Les isollements aérobies sont examinés après 24 et 48 heures. La présence de culture signifie que le germe est aéro-anaérobie facultatif, donc éliminé de la présente étude, mais dont l'identification et l'antibiogramme sont effectuées et comparées avec la culture aérobie.

Cependant, une culture négative nous oriente vers un germe anaérobie strict, dont l'identification sera effectuée à partir de la boîte incubée en anaérobiose.

Figure 35 : Schéma récapitulatif des étapes du diagnostic des BAS.



2.2.2.4. Identification :

Coloration de Gram :

Intérêt :

La coloration de Gram nous permet de distinguer et de classer les bactéries en fonction de :

- La morphologie (cocci, bacille, coccobacille) et du mode de regroupement (diplocoque, en amas, en chaînette...). Certaines bactéries présentent une morphologie caractéristique reconnu à l'examen microscopique de la coloration de gram, par exemple la présence de terminaisons bifurques Suggère la présence de *Bifidobacterium spp.*
- Les propriétés de la paroi et en particulier, sa composition en peptidoglycane. En effet, les bactéries Gram + présentent une paroi de peptidoglycane épaisse, cependant, les bactéries Gram - ont une paroi de peptidoglycane fine mais sont dotées d'une membrane lipidique externe supplémentaire.

Mode opératoire : (Annexe 05)

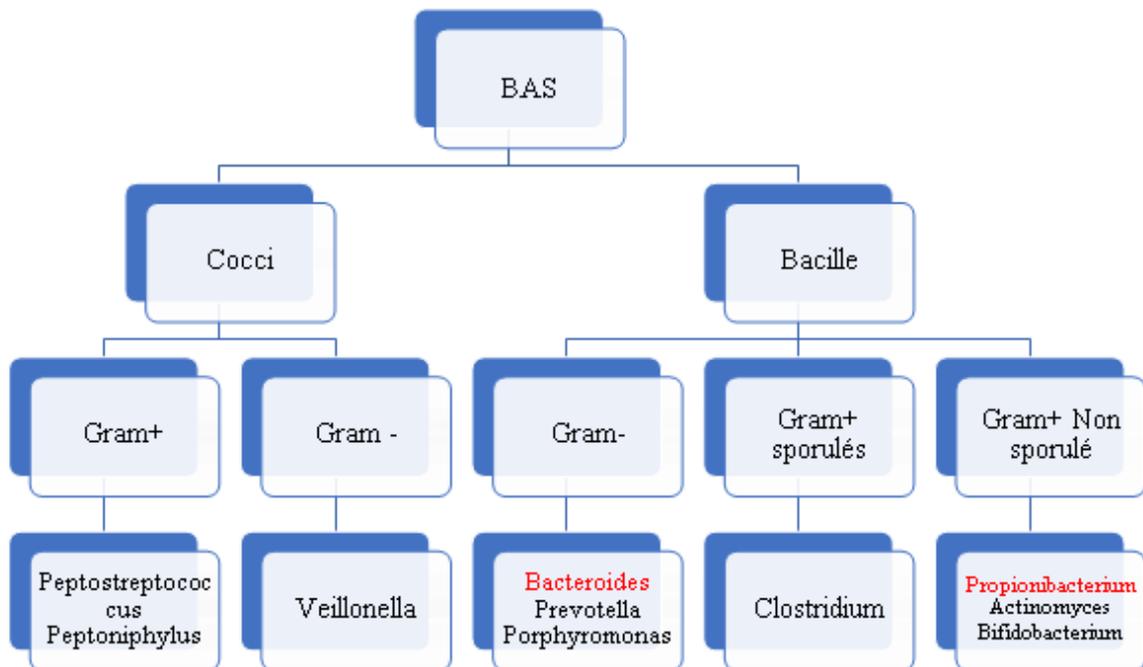


Figure 36 : Schéma représentant la classification des BAS selon le GRAM.

Identification biochimique à l'aide de la galerie API 20 A :

La galerie API 20A comporte 20 microtubules contenant des substrats déshydratés, qui sont inoculées avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Mode Opérateur : (Annexe 06)

Tableau de lecture de la Galerie : (Annexe 07)

Tableau d'identification : (Annexe 08)



Figure 37: Galerie d'identification API 20 A. (Originale)



Figure 38 : Galerie API 20 A incubée dans une boîte anaérobie. (Originale)

Recherche de la catalase :

Intérêt :

Les germes possédant une catalase dégradent le peroxyde d'oxygène (H₂O₂) en oxygène et en eau. La recherche de cette enzyme contribue à la classification des bactéries.

Mode opératoire :

- Exposer la galerie 30 minutes à l'air libre
- Choisir l'une des microcupules des tests de sucres de la galerie Api 20A qui contient un sucre dégradé c'est-à-dire qui a viré au jaune et y déposer quelques gouttes d'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur.

Lecture :

L'apparition de bulles indique une réaction positive et donc la présence d'une catalase.

Tableau 6 : Gram et catalase des BAS.

	Cocci Gram Positif	Cocci Gram Négatif	Bacille Gram Négatif	Bacille Gram positif sporulé	Bacille Gram non sporulé
Catalase+			Bacteroides		Propionibacterium
Catalase -	Peptostreptococcus Peptoniphilus	Veillonella	Prevotella	Clostridium	Bifidobacterium
Catalase variable			Porphyromonas		Actinomyces

Les résultats de ces tests (Gram, galerie, catalase) permettent l'identification à partir du profil numérique, à l'aide du logiciel Api Web.

La fiche de résultats reproduit le dessin de la galerie API 20A avec ses 20 tests, plus la réaction de la catalase et 3 tests de morphologie : la présence de spores, le Gram et la forme (Cocci). Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de 3 et une valeur de 1,2 ou 4 est indiquée pour chaque test positif.

Ensuite, ces chiffres sont additionnés pour obtenir le profil numérique, qui est ensuite introduit manuellement au clavier, sur le logiciel Api Web.

2.2.3. Etapes post- analytiques :

2.2.3.1. Incrimination des bactéries anaérobies strictes en clinique humaine :

Sur la base de la concordance avec les signes cliniques, le site infectieux et les bactéries isolées.

2.2.3.2. Rendu des résultats

Après identification de la(les) bactérie(s) responsable(s) de la pathologie, une fiche de résultat (Annexe -09-) est établie évoquant la notion de présence ou d'absence de bactéries anaérobies strictes, notamment à l'aide de cachets que nous avons confectionnés (annexe -10-), la ou les bactéries incriminées et le traitement antibiotique adéquat, si un antibiogramme a été effectué.

Dans notre cas, l'antibiogramme n'a pas été réalisé par faute de disponibilité des moyens nécessaires.



3. Résultats et discussion

3. Résultats et discussion

3.1. Prélèvements

3.1.1. Répartition des prélèvements reçus selon leurs types

Parmi les prélèvements, les ponctions de pus étaient dominantes avec un pourcentage de 46.67 % (42/90), suivies par les ponctions ORL avec un pourcentage de 20 % (18/90).

Ceci est dû à l'atmosphère favorable au développement des anaérobies de ces liquides, qui sont issues de localisations profondes et fermées (5).

Ensuite, les biopsies et les plaies infectées avec des pourcentages respectifs de 10 % (9/90) et 8.89 % (8/90).

Les liquides articulaires et les prélèvements sur matériel d'ostéosynthèse présentent des pourcentages similaires de 2.22% (2/90). Quant aux prélèvements restants, ils présentent des pourcentages égaux de 1.11%.

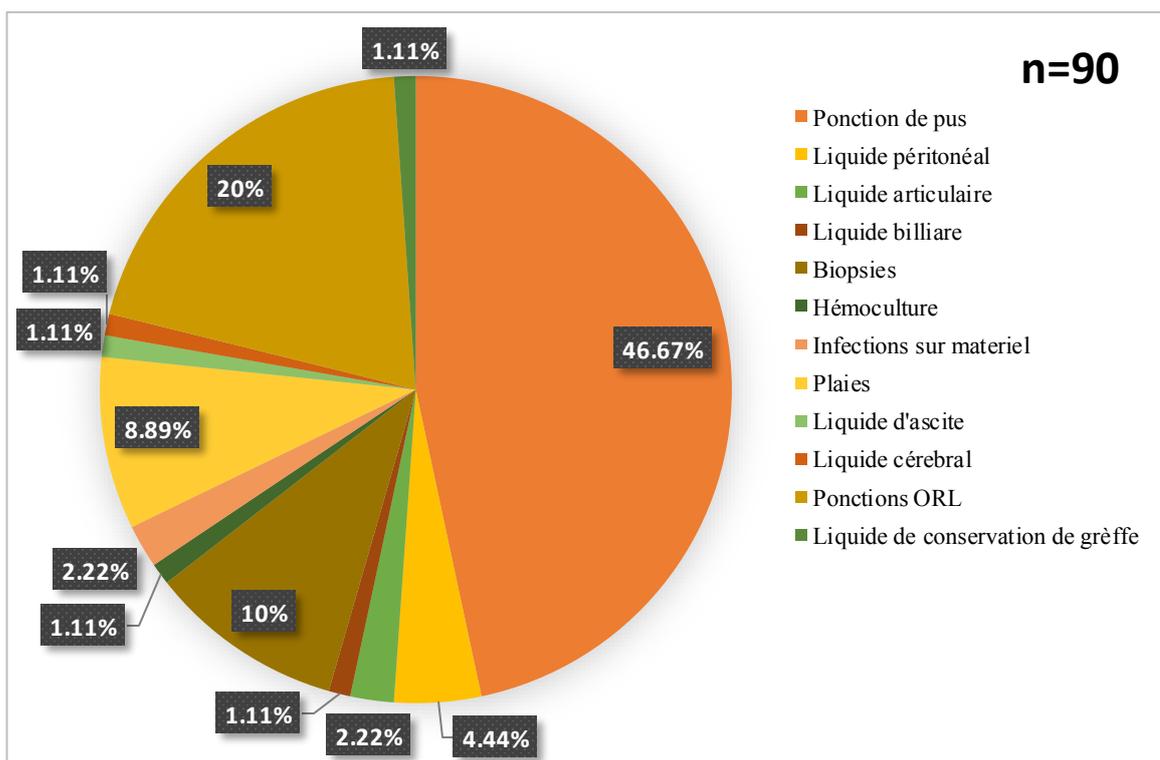


Figure 39 : Répartition des prélèvements reçus selon leurs types.

3.1.2. Répartition des prélèvements reçus selon le service expéditeur

Les prélèvements analysés proviennent des différents services du CHU de Blida, du centre anti-cancer (CAC) ainsi que de l'EHS de transplantation des organes et des tissus (TOT).

Le service ayant adressé le plus grands nombre de prélèvements anaérobies est le service de traumatologie avec un pourcentage de 32,22% (29/90), suivi par le service ORL avec un pourcentage de 23,33% (21/90), puis le service de chirurgie avec un pourcentage de 21,11% (19/90).

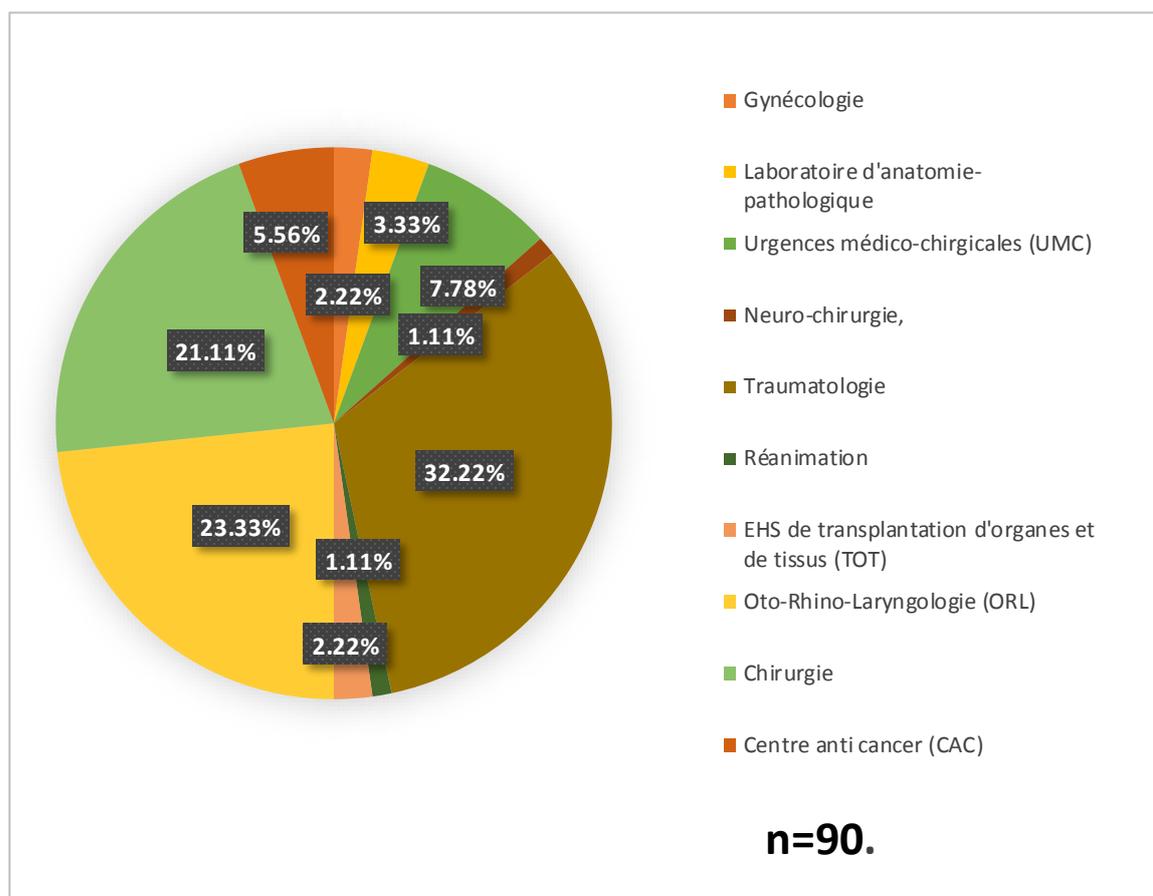
Ces données s'expliquent en partie par l'appartenance de ces services à l'unité de Frantz Fanon et d'autre part par la compatibilité des échantillons reçus de ces services avec la recherche anaérobie. En effet, ces prélèvements ont été obtenus à partir de sites profonds et en respectant les bonnes pratiques de prélèvements anaérobies(5).

Le service des urgences-médico-chirurgicales (UMC) a adressé 7.78% des prélèvements (7/90) et le centre anti-cancer (CAC) a adressé 5,58% des prélèvements (5/90).

Ceci est dû au caractère d'urgence que revêtent les infections chez ce genre de patients, notamment les patients admis au service des urgences dont le pronostic vital peut être mis en jeu et nécessitant une prise en charge rapide et les patients cancéreux caractérisés par une immunodépression qui implique, généralement, leurs mise sous antibiothérapie à large spectre.(5)

Quant aux services restants, ils ont adressé 2,22 % (2/90) pour le service de gynécologie et l'EHS de transplantation des organes et des tissus (TOT) et 1.11% (1/90) pour les services restants.

Figure 40 : Répartition des prélèvements reçus selon le service expéditeur.



3.1.3. Taux de prélèvements positifs :

Sur les 90 prélèvements inclus dans notre étude, nous avons trouvé 62 prélèvements positifs soit 69% des prélèvements ayant fait l'objet d'une recherche anaérobie, dont 21 positifs en anaérobie, soit 23% des prélèvements reçus et 34% des prélèvements positifs.

Ce taux, assez élevé, reste en concordance avec la littérature (79).

Parmi ces prélèvements positifs en anaérobiose, 28.6% représentaient des infections à BAS seules alors que 71.4% % représentaient des infections associant des BAS et des bactéries aérobies ou aéro-anaérobie facultatives. Cela confirme le caractère polymicrobien de ces infections, à cause de la nécessité de la création d'un microenvironnement associant les bactéries anaérobies strictes aux bactéries aérobies qui consomment l'oxygène présent dans le milieu.(3,40)

Les associations entre les différents types respiratoires des bactéries sont représentées sur le tableau et le diagramme suivants :

Tableau 7 : les différentes associations de bactéries isolées selon leurs types respiratoires.

Bactéries aérobies strictes	Bactéries aéro- anaérobies facultatifs	Anaérobies strictes	Nombre
+	+	+	0
+	+	-	5
+	-	-	0
+	-	+	1
-	+	+	14
-	+	-	36
-	-	+	6
-	-	-	28

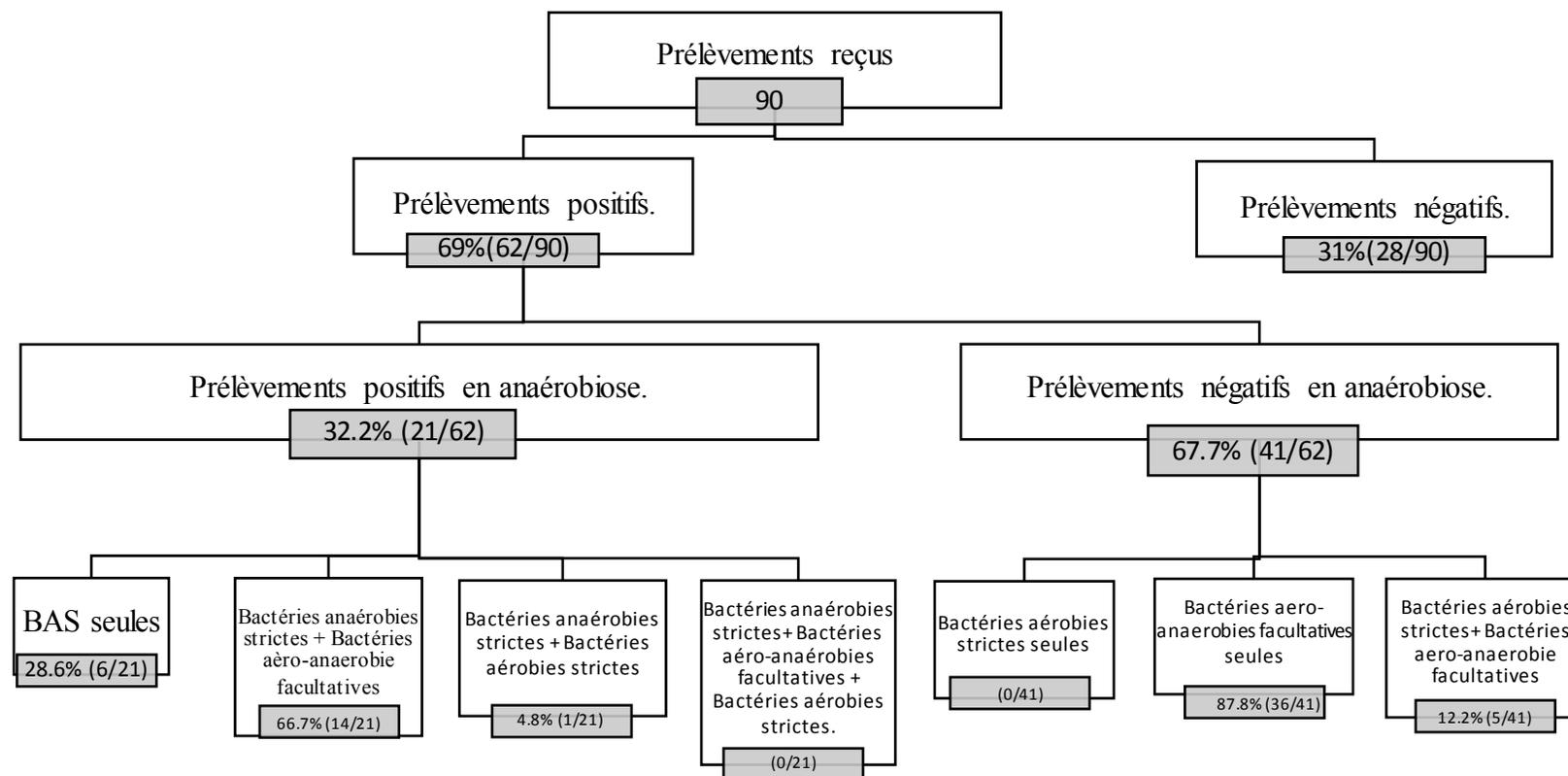


Figure 41 : Répartition des prélèvements positifs selon le type respiratoire des bactéries.

3.2. Bactéries anaérobies strictes isolées :

3.2.1. Répartition des bactéries anaérobies strictes isolées par genres et espèces :

Lors de notre étude, nous avons isolé 31 espèces anaérobies strictes, dont 10 isolats du genre Porphyromonas, 5 isolats du genre Peptostreptococcus, 4 isolats du genre Bacteroides et 3 isolats du genre Clostridium.

La prédominance des bactéries du genre Porphyromonas et Peptostreptococcus peut être due à leur présence au niveau des flores buccales, intestinales et vaginales (25).

Nous avons également trouvé 2 isolats du genre Prevotella, 2 isolats du genre Peptoniphylus, 1 isolat du genre Bifidobacterium, 1 isolat du genre Actinomyces, 1 isolat du genre Eggerthella, 1 isolat du genre Veillonella et 1 isolat du genre Propionibacterium.

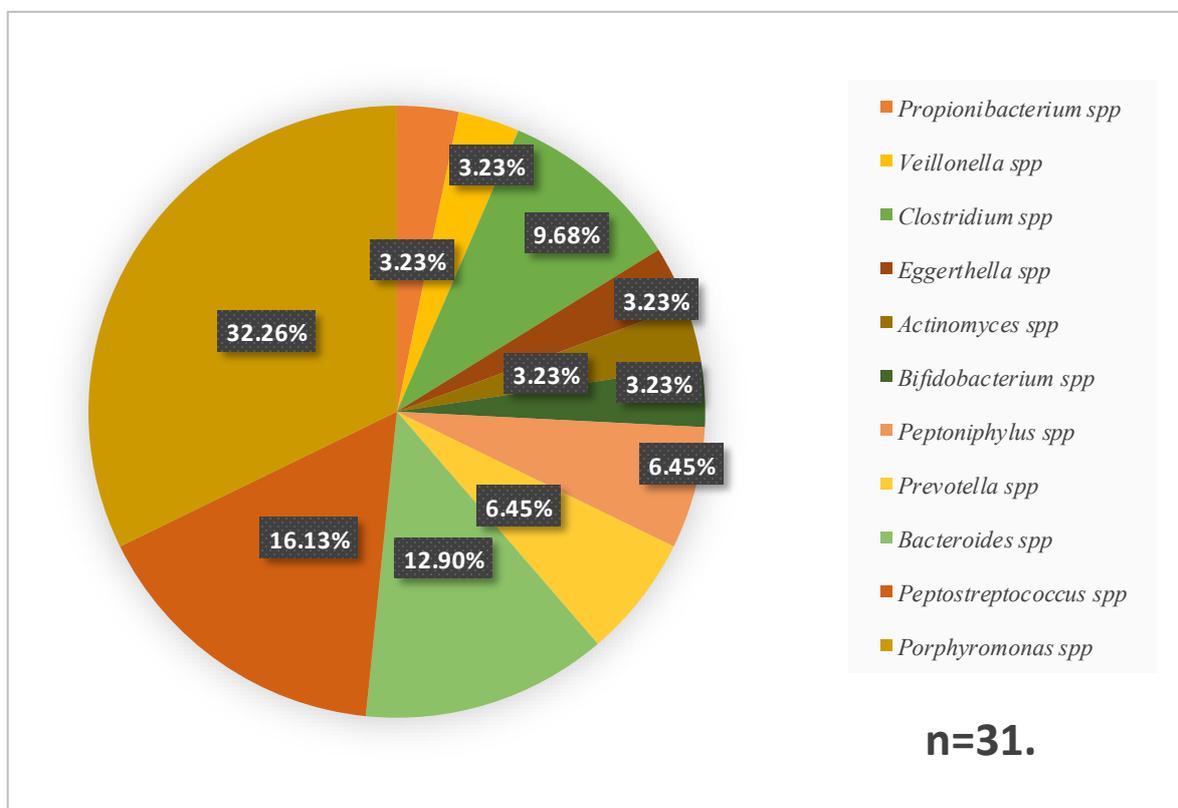


Figure 42 : Répartition des prélèvements positifs selon la bactérie isolée.

Tableau 8: Repartition des bactéries anaérobies strictes isolées au cours de l'étude

	Genre	Espèce	Nombre
CGP	Peptostreptococcus	group	3
		Intermedius	2
	Peptoniphylus	Assacharolytica	1
		Spp	1
BGP	Clostridium	Perfringens	1
		Clostridio forme	1
		Botulinum	1
	Bifidobacterium	Spp	1
	Actinomyces	Naesluicidi	1
	Eggerthella	Lenta	1
	Propionibacterium	Propionices	1
CGN	Veillonella	Parvula	1
BGN	Bacteroides	Fragilis	1
		Distasonis	2
		Spp	1
	Porphyromonas	Spp	10
	Prevotella	Melaninogenicaoralis	1
		Spp	1
Total			31

3.2.2. Bactéries anaérobies strictes les plus isolées :

Selon nos études statistiques, les bactéries anaérobies les plus isolées de nos prélèvements reçus sont, par ordre décroissant, celles appartenant aux genres : *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides* et *Clostridium*.

Nous avons réparti les prélèvements contenant les bactéries précédemment mentionnées selon le type de prélèvement et le service expéditeur.

*Selon le type de prélèvements, nous avons noté que les ponctions de pus étaient majoritaires pour les 4 bactéries, suivies par les liquides péritonéaux et les ponctions ORL puis les plaies pour le *Porphyromonas spp*, les ponctions ORL et les plaies pour le *Bacteroides spp*. Quant au *Clostridium spp*, nous avons noté également des cas positifs provenant des liquides articulaires.

Ainsi, nous notons qu'il existe un lien direct entre les microorganismes et les infections c'est-à-dire que certaines espèces seraient spécifiques à certaines infections.

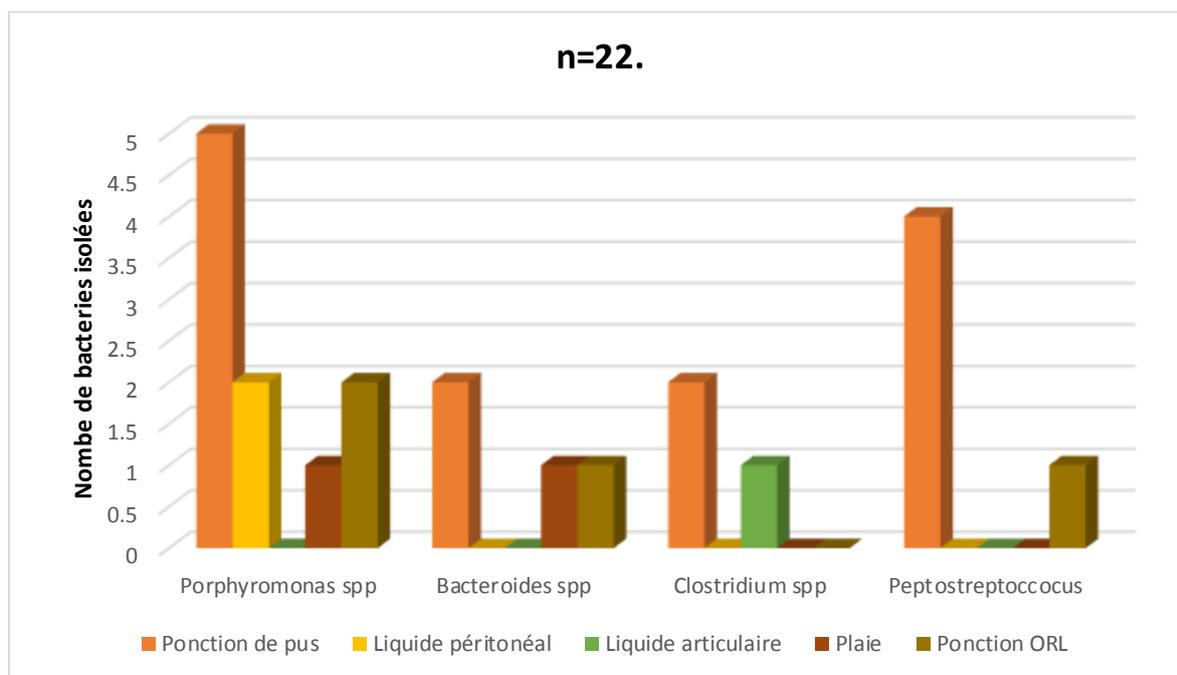


Figure 43 : Répartition des bactéries anaérobies strictes les plus isolées selon le type de prélèvement.

Résultats et discussion

*Selon le service expéditeur, nous avons noté pour le *Porphyromonas spp* que la majorité des prélèvements provenaient du service de chirurgie générale, suivie par les services d'ORL et de traumatologie. Pour le *Peptostreptococcus*, les prélèvements provenaient des services de traumatologie, des UMC et du CAC. Quant au *Bacteroides spp*, nous avons enregistré des nombres similaires pour les services d'ORL, traumatologie, CAC ainsi que les UMC. En ce qui concerne le *Clostridium spp*, les prélèvements provenaient des services de traumatologie, d'ORL et des UMC.

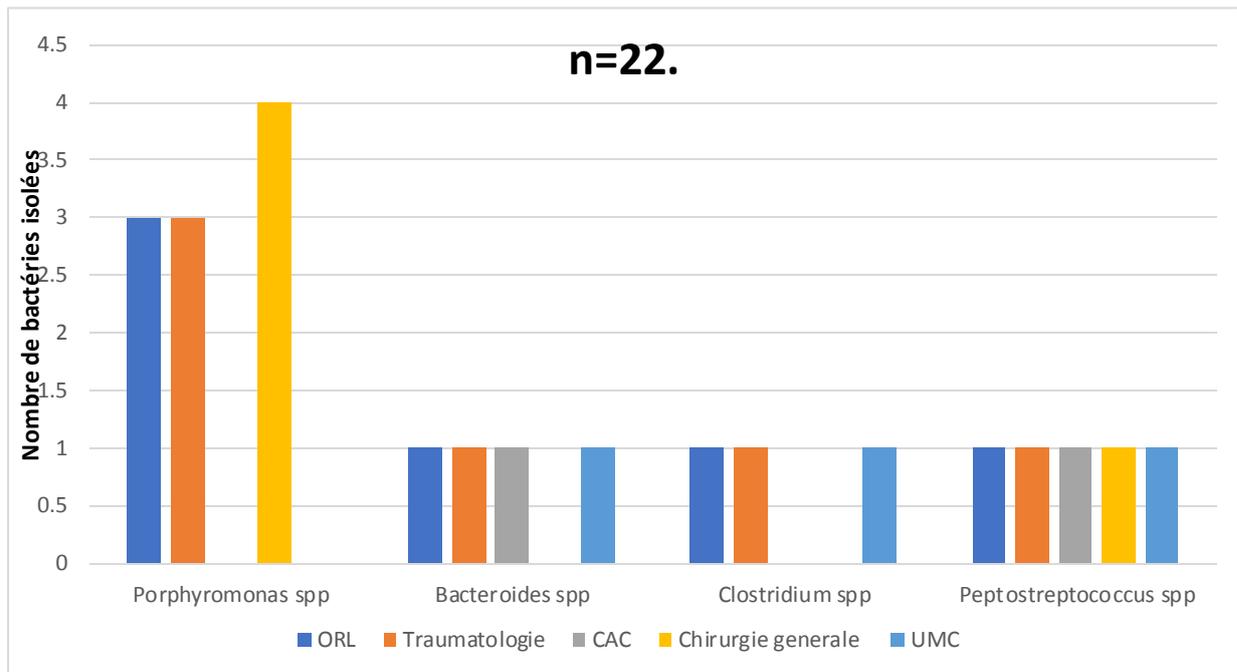


Figure 44 : Répartition des bactéries anaérobies les plus isolées selon le service expéditeur.

Résultats et discussion

Ainsi, il est établi que les services d'ORL, de chirurgie et de traumatologie ont adressés le nombre le plus importants de prélèvements positifs en anaérobiose.

Tableau 9: Les bactéries anaérobies strictes isolées des services d'ORL, de chirurgie et d'ORL.

	Nombre de culture anaérobie positive	Mono/ Polymicrobiennes	Bactéries anaérobies strictes isolées
ORL	6	5/6 Polymicrobiennes (dont 1 impliquant des anaérobies seules). 1/6 Monomicrobiennes.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Porphyromonas spp.</i> • <i>Clostridium spp.</i> • <i>Bacteroides spp.</i> • <i>Eggerthella spp.</i> • <i>Peptostreptococcus spp.</i> • <i>Veillonella spp.</i> • <i>Prevotella spp.</i>
Chirurgie	6	6/6 Polymicrobiennes dont 1 prélèvement impliquant des anaérobies seules.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Peptoniphylus spp.</i> • <i>Porphyromonas spp.</i> • <i>Peptostreptococcus spp.</i> • <i>Bacteroides spp.</i> • <i>Actinomyces spp.</i> • <i>Propionibacterium spp.</i>
Traumatologie	5	3/5 Polymicrobiennes. 2/5 Monomicrobiennes.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Porphyromonas spp.</i> • <i>Clostridium spp.</i> • <i>Bacteroides spp.</i> • <i>Peptostreptococcus spp.</i>

Pour les infections ORL, Les genres suivants ont été les plus isolés *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Prevotella*. Ces résultats rejoignent ce qui a été rapporté par les études de Itzhak BROOK en ce qui concerne les principaux genres impliqués dans les infections ORL.(54,80).

Ces mêmes études confirment l'implication de *Porphyromonas spp* dans les abcès péri-amygdalien au même titre que notre recherche.

Pour le service de chirurgie, différentes bactéries ont été isolées, notamment celles appartenant au genre *Bacteroides*, cela peut être expliqué par leur encapsulation, résistance à la phagocytose ainsi que leur résistance a de nombreux antibiotiques couramment utilisés. Ces bactéries favorisent également la formation d'abcès. (27)

En ce qui concerne les infections péritonéales, issues du service de chirurgie, elles impliquaient des bactéries du genre *Porphyromonas*, qui fait partie de la flore intestinale. Selon une étude établi par Itzhak BROOK, les micro-organismes impliqués dans les infections intra-abdominales sont généralement ceux de la flore du tractus gastro-intestinal (54), ce qui correspond à notre étude.

Cette étude affirme également que parmi les plus de 400 espèces bactériennes qui constituent la flore intestinale, seules les plus virulentes survivent dans le péritoine et provoquent l'infection.

La majorité des prélèvements reçus de ces 2 services impliquaient des infections polymicrobiennes, ce qui est en concordance avec l'étude effectuée par Itzhak BROOK et Ellie J GOLDSTEIN (27) .

Pour le service de traumatologie, les genres isolés sont *Clostridium spp*, *Bacteroides spp* et *Peptostreptococcus spp*, ce qui concorde avec l'étude précédemment citée (27) qui confirme la prédominance de ces genres dans les infections ostéo-articulaires.

Par contre, le genre *Porphyromonas* a été isolé à 3 reprises, ce qui ne concorde pas avec cette étude, ni avec l'étude publiée dans le journal *Option Bio* par Pr Chantal BERTHELOT(34) qui affirme la prédominance de l'espèce *Propionibacterium acnes* dans ce type d'infections.

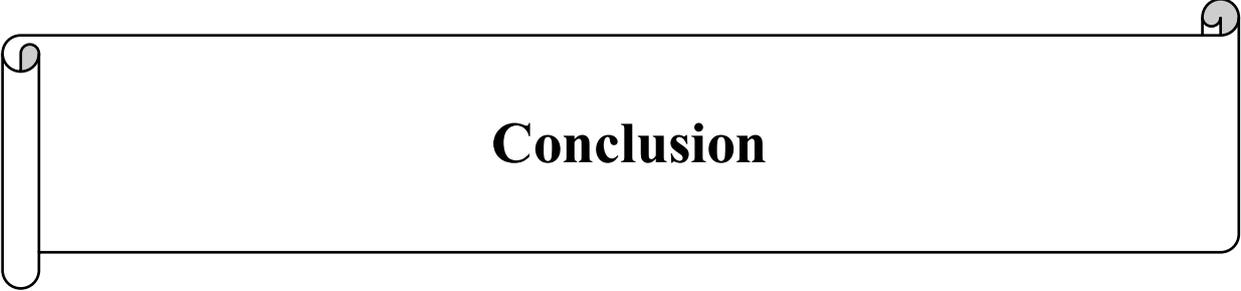
Cette même étude (34), évoque le caractère polymicrobien dans 50% des infections ostéo-articulaires, ce qui concorde avec nos résultats.

Nous avons également pu isoler 2 souches de *Staphylococcus aureus* en atmosphère anaérobie après 5 jours d'incubation, qui n'ont pas été isolées en aérobie après 48 heures d'incubation et qui ont formé des micro-colonies variantes (small colony variants).

Les SCV sont caractérisées par leur nature fastidieuse, leur longue durée d'incubation, ainsi que leur aspect différent des colonies usuelles. (81)

Les SCV sont décrites pour de nombreuses espèces bactériennes, néanmoins, celles formées par le *Staphylococcus Aureus* sont les plus connues et peuvent être rencontrées au niveau de nombreux sites, notamment les abcès, les tissus mou, les os et les articulations. (82)

Dans notre cas, les *Staphylococcus aureus* isolés était de couleur blanche et non dorée, ont poussé au bout de 5 jours en anaérobiose et provenaient d'un épanchement péri-articulaire issue du service de traumatologie et d'un abcès issue du servie d'ORL, ce qui affirme les résultats des études précédemment citées.



Conclusion

Conclusion

Les bactéries anaérobies strictes sont fréquemment impliquées dans des infections polymicrobiennes développées à partir des microbiotes endogènes de proximité.

Leur taxonomie fait l'objet de révisions continues depuis quelques décennies. De ce fait, de nouvelles espèces ont été décrites alors que d'autres ont changé de dénomination.

Afin d'isoler et d'identifier ces bactéries, les cliniciens doivent fournir des prélèvements correctement effectués et acheminés rapidement au laboratoire dans des conditions favorables à la survie de ces dernières.

L'examen microscopique et macroscopique des échantillons permettra une bonne orientation diagnostique tandis que l'ensemencement et la culture réalisés en anaérobiose favoriseront l'isolement puis l'identification des bactéries anaérobies strictes.

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé la méthode des boîtes et des poches munies de générateurs d'anaérobiose dans la culture des bactéries anaérobies strictes. Cette méthode s'est avérée efficace, peu coûteuse et simple à mettre en œuvre, ce qui nous a permis de diagnostiquer 21 (23%) infections à bactéries anaérobies strictes à partir de 90 prélèvements récoltés.

Les principales infections étaient les infections de la sphère ORL (28%), suivies par les infections intra-abdominales issues du service de chirurgie (28%) et par les infections ostéo-articulaires (24%).

Les bactéries anaérobies strictes isolées appartenaient essentiellement aux genres *Porphyromonas* (32%), *Peptostreptococcus* (16%), *Bacteroides* (13%) et *Clostridium* (10%).

Le traitement des infections à bactéries anaérobies strictes implique souvent l'utilisation d'antibiotiques, cependant, ces espèces connaissent une augmentation notable de leur résistance, ce qui pousse les chercheurs à s'intéresser d'avantage à leur recherche et leur identification.

L'antibiorésistance des bactéries anaérobies strictes augmente de façon considérable, au cours de ces dernières années, en particulier pour les espèces de *Bacteroides du groupe fragilis*. Ce qui rend indispensable la réalisation d'un antibiogramme pour les bactéries anaérobies strictes, malgré la longue durée d'obtention des résultats, car il permettra d'expliquer les échecs thérapeutiques éventuels, afin de proposer un traitement adéquat et il servira également de référence pour la prise en charge d'autres patients présentant des infections similaires.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. M. SEBALD (unité des anaérobies, institut pasteur, laboratoire de bactériologie-Virologie HS-A. Méthodes de laboratoire bactéries anaérobies et leur identification. 1994.
2. Médicale S française de microbiologie. Remic référentiel en microbiologie médicale, 5ème édition. 2015. 451 p.
3. Manus J-M. Bactériologie médicale Techniques usuelles. Rev Francoph des Lab. 2019;2019(512):14.
4. Dumont Y, Michon A-L, Laurens C, Bonzon L, Godreuil S, Jean-Pierre Hé. Rôle du laboratoire de biologie médicale dans le diagnostic microbiologique des bactéries anaérobies. Rev Francoph des Lab. 2018;2018(505):40–7.
5. Nagy E, Boyanova L, Justesen US. How to isolate, identify and determine antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in routine laboratories. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2018;24(11):1139–48. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.02.008>
6. LinkFang, Bacteriologie, examen microbiologique, types énergétiques, [en ligne], novembre 2020, [Internet]. [cited 2021 Jun 6]. Available from: https://fr.linkfang.org/wiki/Type_énergétique
7. Strobel HJ. Basic laboratory culture methods for anaerobic bacteria. Vol. 581, Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 2009. p. 247–61.
8. LinkFang, Bacteriologie, examen microbiologique, types énergétiques. p. https://fr.linkfang.org/wiki/Type_%C3%A9nerg%C3%A9.
9. Les I, Hooke HR, Leeuwenhoek AVAN, Leeuwenhoek V, Needham J, Spallanzani L, et al. Chapitre 1 : Le Monde microbien. 2015;
10. Lacaz CS. Anaerobic bacteria. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1979;21(4 Suppl 3):IX.
11. Pr Slimani. Bacteries anaerobies strictes. In: Université d'Alger Faculté de Médecine Département de Médecine. p. 16.
12. Factors affecting Growth of Microorganisms - Anas Shaikh - [Internet]. [cited 2021 Jun 15]. Available from: <https://www.slideshare.net/anass1250/13-fet1006-factors-affecting-growth-of-micro-organisms>
13. Guilhot E, Khelaïfa S, La Scola B, Raoult Di, Dubourg G. Methods for culturing anaerobes from human specimen. Future Microbiol. 2018;13(3):369–81.
14. Gillespie SH. Anaerobes. Med Microbiol Illus. 1994;92–107.
15. J.F. Fortier. Bactéries anaérobies: définition et explications [Internet]. 30/12/2019. [cited 2021 Jun 18]. Available from: <https://www.aquaportail.com/definition-13955-bacteries-anaerobies.html>
16. 5 exemples de respiration anaérobie | Thpanorama - Deviens mieux maintenant [Internet]. [cited 2021 Jun 7]. Available from: <https://www.thpanorama.com/blog/ciencia/5-ejemplos-de-respiracin-anaerobia.html>
17. Anaerobes - Types of Bacteria, Classification and Examples [Internet]. [cited 2021 Jun 18]. Available from: <https://www.microscopemaster.com/anaerobes.html>

Références bibliographiques

18. Ayoub Bensakhria. Les Bactéries anaérobies. Magazine Science [Internet]. [cited 2021 Jun 6]; Available from: <https://www.magazinescience.com/biologie/bacteries-anaerobies/>
19. Halimatou S, Kebe1 O, Julie HM. METABOLISME DES BACTERIES ANAEROBIE ET PHYSIOLOGIE BACTERIENNE [Internet]. Available from: <https://studylibfr.com/doc/9283604/metabolisme-des-bacteries-anaerobie-et-physiologie-bacter...>
20. Qu'est-ce qu'un environnement anaérobie? - Science - 2021 [Internet]. [cited 2021 Jun 7]. Available from: <https://fr.mosg-portal.com/anaerobic-environment-10003906-457>
21. E.C.S. Chan (department of microbiology and immunology, McGill university, Montreal C. A SIMPLIFIED TECHNIQUE FOR THE ROUTINE CULTIVATION OF ANAEROBIC BACTERIA. 1980;(i):7–16.
22. Médicale. DGTP-M assistant en microbiologie. Bactéries anaérobies: classification. Gd cours l'institut Pasteur d'Algerie. :00-.
23. Dumont. Y, Michon A-L, Laurens C, Bonzon L, Jean-Pierre H, Godreuil S. Rôle des bactéries anaérobies en clinique humaine. Revue Francophone des Laboratoires N° 505. 2018;
24. Dubreuil L. LES INFECTIONS A ANAEROBIES ET LEUR TRAITEMENT : ARGUMENTS MICROBIOLOGIQUES.
25. Grollier G, Moal G Le, Robert R. Infections dues aux bactéries anaérobies de la flore endogène (Clostridium difficile et Actinomyces exclus) Anaerobic bacteria of endogenous infections (excluding Clostridium difficile and Actinomyces). 2004;1:262–80.
26. John E.Greenlee Mdu of U school of medecine. Abcès cérébral - Troubles neurologiques - Édition professionnelle du Manuel MSD [Internet]. 2020 [cited 2021 Jun 21]. Available from: <https://www.msmanuals.com/fr/professional/troubles-neurologiques/infections-cerebrales/abcès-cerebral>
27. Brook I, Goldstein EJ. Diseases Caused by Non-Spore-Forming Anaerobic Bacteria [Internet]. Twenty Fou. Vol. 2, Goldman's Cecil Medicine: Twenty Fourth Edition. Elsevier Inc.; 2012. 1847–1851 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4377-1604-7.00305-5>
28. Perlemuter G. Guide de thérapeutique. 10^{ème} édition. 2019.
29. Zouagui A, Smaili L, Abourazzak S, Elarqam L, Chaouki S, Atmani S, et al. Syndrome de Lemierre. Presse Med [Internet]. 2010;39(4):431–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lpm.2009.07.024>
30. Mesrar H, Mesrar J, Maillier B, Kraoua S, Chapoutot L, Delclaux B. Syndrome de Lemierre: diagnostic , exploration , traitement Lemierre ' s syndrome : Diagnosis , exploration , treatment. La Rev m?@decine interne [Internet]. 2018;39(5):339–45. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2017.11.005>
31. Meyer S, Hernandez-padilla AC, Barraud O. Dossier scientifique Le rôle des bactéries anaérobies acquise sous ventilation mécanique Dossier scientifique Microbiote et maladies infectieuses. RFL Rev Francoph des Lab [Internet]. 2020;2020(527):32–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1773-035X\(20\)30355-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1773-035X(20)30355-5)

Références bibliographiques

32. Dumont Y, Froissart R, Bañuls A, Bonzon L, Jean-pierre H, Montpellier UMRMI De. Dossier scientifique Bactéries anaérobies et résistances aux antibiotiques. 2018;57–62.
33. Larry M. Bush ESC of medecine FA university., Maira T. Vazquez-Pertejo W regional medical center. Infections clostridiennes des tissus mous - Maladies infectieuses - Édition professionnelle du Manuel MSD [Internet]. 2019 [cited 2021 Jun 21]. Available from: <https://www.msmanuals.com/fr/professional/maladies-infectieuses/bactéries-anaérobies/infections-clostridiennes-des-tissus-mous>
34. BERTHOLOM C. Traitement des anaérobies dans les infections | formation Spécificités des IOA à anaérobies. OptionBio. 2020;(encadré 1):615–6.
35. Kasper SH, Morell-Perez C, Wyche TP, Sana TR, Lieberman LA, Hett EC. Colorectal cancer-associated anaerobic bacteria proliferate in tumor spheroids and alter the microenvironment. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–13.
36. Minarovits J. Anaerobic bacterial communities associated with oral carcinoma: Intratumoral, surface-biofilm and salivary microbiota. *Anaerobe* [Internet]. 2021;68(xxxx):102300. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102300>
37. Petit C, Oswald E, Nougayrede JP. Rôle des génotoxines produites par des bactéries du microbiote dans le cancer colorectal. *Rev Francoph des Lab* [Internet]. 2013;2013(456):77–82. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1773-035X\(13\)72226-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1773-035X(13)72226-3)
38. Butel MJ, Waligora-Dupriet AJ, Aires J. *Bifidobacterium*. Elsevier Masson SAS. 2015;
39. Sánchez-Tapia M, Tovar AR, Torres N. Diet as Regulator of Gut Microbiota and its Role in Health and Disease. *Arch Med Res.* 2019;50(5):259–68.
40. Anne Maczulak. Encyclopedia of microbiology. Vol. 53, Journal of Chemical Information and Modeling. 2013. 168–173 p.
41. Bhunia AK. *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*. 2018;209–28.
42. *Clostridium botulinum*, *Clostridium neurotoxigenes*. ANSES, agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, l'environnement et du travail. 2019;1–5.
43. Gelbart D. Tetanus. *J Am Acad Physician Assist.* 2017;30(12):46–7.
44. Domachowske J. Tetanus. 1990;
45. Afshar M, Raju M, Ansell D, Bleck TP. Annals of Internal Medicine Review Narrative Review: Tetanus — A Health Threat After Natural Disasters in. *Ann Intern Med* [Internet]. 2011;154:329–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21357910>
46. Opisthotonos: Symptoms, causes, and treatment [Internet]. [cited 2021 Jun 21]. Available from: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/318868>
47. risus sardonicus - www.medicoapps.org [Internet]. [cited 2021 Jun 21]. Available from: <https://medicoapps.org/65047/>
48. Shen A, Edwards AN, Sarker MR, Paredes-Sabja D. Sporulation and germination in clostridial pathogens. *Gram-Positive Pathog.* 2019;(5):903–26.

Références bibliographiques

49. Broadley M, Schweon SJ. Get the facts about Fusobacterium. *Nursing (Lond)*. 2017;47(5):64–5.
50. Bacilles à négatif anaérobies stricts immobiles.
51. Dubreuil L, Marchandin H. Bactéries anaérobies à Gram négatif. *Encycl Médico-Biologique* [Internet]. 2021;10(4):1–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2211-9698\(15\)67912-2](http://dx.doi.org/10.1016/S2211-9698(15)67912-2)
52. D.I. Johnson. Chapter 11 : Bacteroides spp. In: *Bacterial pathogens and their virulence factors*. 2018. p. 306.
53. Wexler HM. Bacteroides: The good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(4):593–621.
54. Brook I. 184 - Anaerobic Bacteria. *Infectious Diseases* [Internet]. Fourth Edi. :1628-1644.e2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00184-2>
55. Ross PA, Endersby-Harshman NM, Hoffmann AA. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Vol. 12. 2009. 572–586 p.
56. Nulens E, Voss A. Laboratory diagnosis and biosafety issues of biological warfare agents. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2002;8(8):455–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00528.x>
57. GasPak System (The Anaerobic jar) | Medical Laboratories [Internet]. [cited 2021 Jun 11]. Available from: <http://www.medical-labs.net/gaspak-system-the-anaerobic-jar-2914/>
58. BD GasPak EZ Campy Pouch System. 20 uds. - SanilaboShop [Internet]. [cited 2021 Jun 11]. Available from: <https://www.sanilaboshop.es/BD-GasPak-EZ-Campy-Pouch-System-20-uds>
59. BioMérieux. GENBAG ANAEROBIC | Gas generators | Others | Ancillary Products | Culture | Bacteriology | bioMerieux Industry USA [Internet]. [cited 2021 Jun 18]. Available from: <https://biomerieuxdirect.com/industry/Bacteriology/Culture/Ancillary-Products/Others/Gas-generators/GENBAG-ANAEROBIC-%2820-SACHETS%29/p/45534>
60. Venugopal AA, Hecht DW. Anaerobic bacteria. In: *Oxford textbook of medicine*. 2020. p. 1055–60.
61. Acharya Tankeshwar. GasPak Anaerobic System: Principle, Application • Microbe Online [Internet]. 2020 [cited 2021 Jun 18]. Available from: <https://microbeonline.com/gaspak-anaerobic-system/>
62. Stainless Steel Anaerobic Incubator Operation Room Imported Oxygen Sensor LAI-3T [Internet]. [cited 2021 Jun 11]. Available from: <http://www.biochemicalincubator.com/sale-12572471-stainless-steel-anaerobic-incubator-operation-room-imported-oxygen-sensor-lai-3t.html>
63. Chambre d'isolation modulaire - Vinyl - CoyLab - de paillasse / anaérobie / de type boîte à gants [Internet]. [cited 2021 Jun 12]. Available from: <https://www.medicalexpo.fr/prod/coylab/product-113447-776573.html>
64. de la Maza LM, Pezzlo MT, Bittencourt CE, Peterson EM. Introduction to Anaerobic Bacteria. *Color Atlas Med Bacteriol*. 2020;213–22.

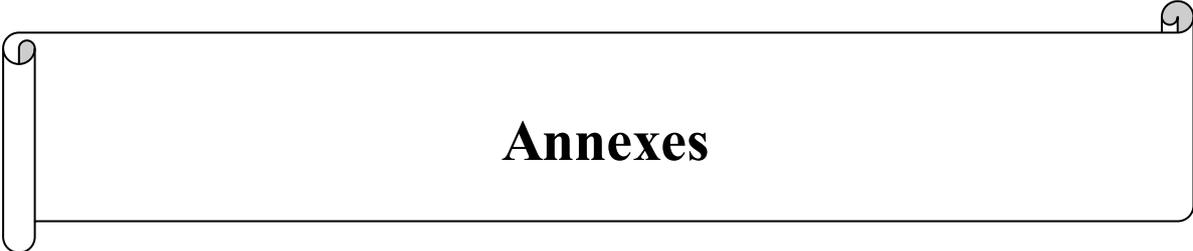
Références bibliographiques

65. Larry M. Bush, Maria T. Vazquez-Pertejo. Revue générale des bactéries anaérobies - Maladies infectieuses - Édition professionnelle du Manuel MSD [Internet]. 2019 [cited 2021 Jun 6]. Available from: <https://www.msmanuals.com/fr/professional/maladies-infectieuses/bactéries-anaérobies/revue-générale-des-bactéries-anaérobies>
66. Finegold SM. Anaerobic bacteria. Their role in infection and their management. *Postgrad Med.* 1987;81(8):141–7.
67. Centers for disease control and prevention. Bacteroides fragilis under microscope. [Internet]. Public health image library. [cited 2021 Jun 23]. Available from: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=11198>
68. Philippon A. Site de microbiologie médicale [Internet]. Available from: <http://microbes-edu.org/>
69. Principle I. Culture Media for Anaerobes. *Clin Microbiol Proced Handb.* 2016;4.3.1-4.3.10.
70. Allen SD, Emery CL, Siders JA. Anaerobic Bacteriology. *Man Comm Methods Clin Microbiol.* 2014;50–83.
71. Humble MW, King A, Phillips I. API ZYM: a simple rapid system for the detection of bacterial enzymes. *J Clin Pathol.* 1977;30(3):275–7.
72. AVRIL. JL, DABERNAT. H, DENIS. F, MONTEIL. H. Bactériologie médicale. 2.
73. MATUSZEWSKI. C. These pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie: évaluation de la carte Vitek 2 ANC pour l'identification des bactéries anaérobies et des corynébactéries d'intérêt médical. Université HENRIPOINCARE-NANCY I. 2009.
74. Brook I. Treatment of anaerobic infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007;5(6):991–1006.
75. MASURE. O, MICHAUD. A, Bayon. AM, COLLOC. ML, ORAIN. JP, BARTHELEMY. L, et al. Etude bactériologique de 60 toxi-infections à germes anaérobies traités par l'oxygène hyperbare. *Med Mal Infect.* 1983;251–5.
76. SEDALLIAN A. LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES DES BACTERIES ANAEROBIES STRICTS. 1986;19–23.
77. Schuetz AN. Antimicrobial resistance and susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis.* 2014;
78. Robert Webb et al. Potency and stability of a trivalent, catalytically inactive vaccine against botulinum neurotoxin serotypes C, E and F (triCEF). *Toxicon.* 2020;
79. Diseases. J society of chemotherapy and the japanese association for infectious. Chapter 1-1. Anaerobic infections (General): Epidemiology of anaerobic infections. *J Infect Chemother.* 2011;17:4–12.
80. Brook I. Anaerobic bacteria in upper respiratory tract and head and neck infections: Microbiology and treatment. *Anaerobe* [Internet]. 2012;18(2):214–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.12.014>
81. Laurent F. Small Colony Variant et IOA.
82. Proctor RA, Eiff C Von, Kahl BC, Becker K, Mcnamara P, Herrmann M, et al. Small

Références bibliographiques

colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. 2006;4(April):295–305.

83. Coloration au Vert de Malachite [Internet]. [cited 2021 Jun 20]. Available from: <https://microbiologie-clinique.com/Coloration-Vert-de-Malachite.html>
84. bioMérieux Corporate Website | Pioneering diagnostics [Internet]. [cited 2021 Jun 22]. Available from: <https://www.biomerieux.com/>



Annexes

Annexe -01- : Classification des Clostridium. (Source : Bactéries anaérobie : classification, Grand cour de l'institut Pasteur d'Algerie, Dr GHORAB).

<i>Groupe 1</i>	<i>Groupe 2</i>	<i>Groupe 3</i>	<i>Groupe 4</i>	<i>Groupe 5</i>
<i>Cl. Sporogenes</i> <i>Cl. Cadaveris</i> <i>Cl. Botulinum A B F</i> <i>Cl. Sordellii</i> <i>Cl. Bifermentans</i>	<i>C. difficile</i> <i>C. tetanomorphum</i> <i>C. innocuum</i> <i>C. lituseburense</i> <i>C. Putrificum</i> <i>C. stickland</i>	<i>Cl. Limosum</i> <i>Cl. Ghom</i> <i>Cl. Histolyticum</i> <i>Cl. Subterminale</i>	<i>Cl. Tetani</i> <i>Cl. Melanominatum</i> <i>Cl. Sporospheroides</i> <i>Cl. Aminovalericum</i> <i>Cl. Cochlearium</i>	<i>Cl. Perfringens</i> <i>Cl. Paraperfringens</i> <i>Cl. Sardiniensis</i> <i>Cl. Baratii</i> <i>Cl. Absonum</i> <i>Cl. Botulinum B F (prot -) C D E</i> <i>Cl. oedematiens A B C</i> <i>Cl. chauvoei</i> <i>Cl. Speticum</i> <i>Cl. butyricum</i> <i>Cl. acetobutyicum</i> <i>Cl. fallax</i> <i>Cl. sphenoides</i> <i>Cl. glycolicum</i> <i>Cl. ramosum</i> <i>Cl. pseuditetanicum</i> <i>Cl. capitovale</i> <i>Cl. paraputrificum</i>

Groupe 1 : AA seule source d'énergie et de C, n'utilisent pas les sucres comme principale source d'énergie, très protéolytique glucidolytique.

Groupe 2 : AA, faiblement ou non protéolytique glucidolytique, n'utilisent pas les sucres comme principale source d'énergie.

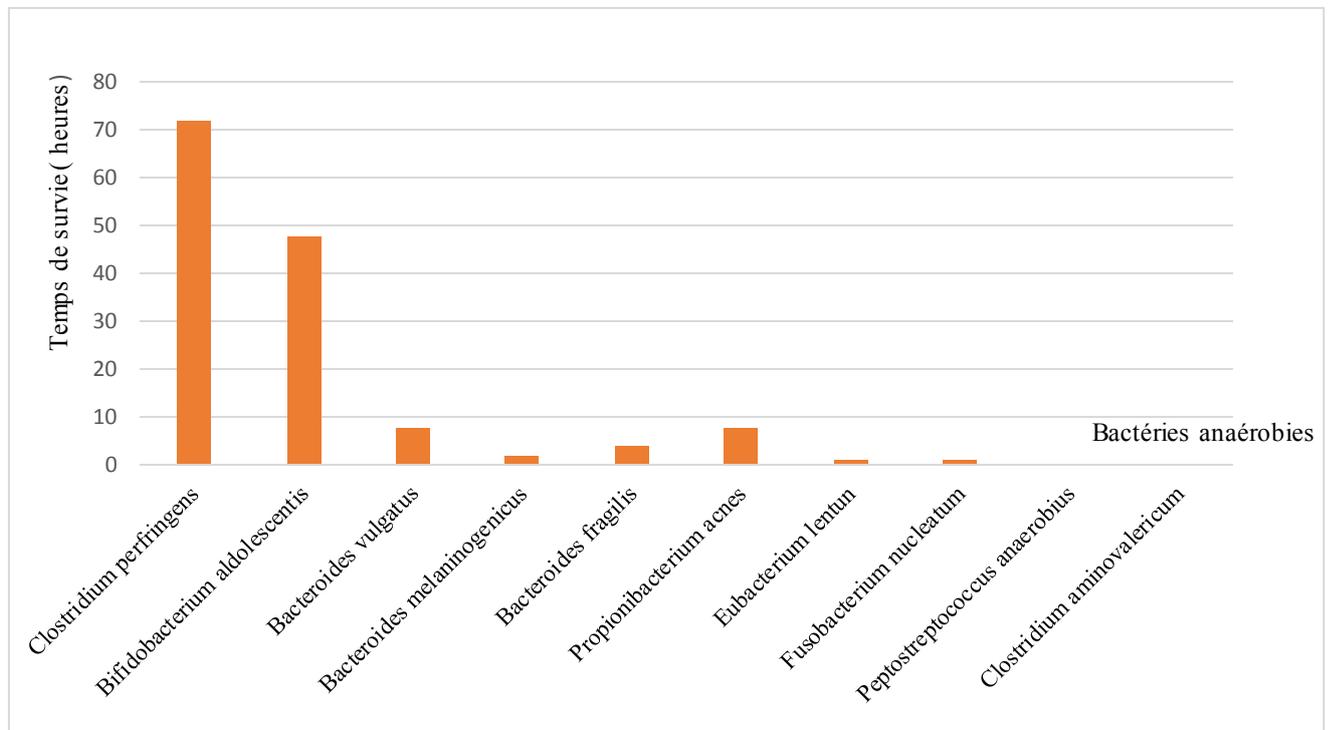
Groupe 3 : AA, très protéolytique, glucidolytique.

Groupe 4 : AA, non protéolytique, Glucidolytique.

Groupe 5 : Fermentation restreinte des AA qui ne sont pas la seule source d'énergie et de C, les glucides sont la principale source d'énergie.

Groupe 6 : Pas d'intérêt médical.

Annexe -02-: Tolérance à l'oxygène de certaines bactéries anaérobies. (Inspiré de : Guilhot E, Khelaifia S, La Scola B, Raoult Di, Dubourg G, Methods for culturing anaerobes from human specimen. 2018).



Annexe -03- : Mode opératoire de la coloration au vert de malachite (Source : site Web : <https://microbiologie-clinique.com/Coloration-Vert-de-Malachite.html>)

1. Conception du frottis puis séchage.
2. Coloration en recouvrant la lame avec du vert de malachite.
3. Chauffage jusqu'à émission de vapeur pendant 5 minutes.
4. Lavage à l'eau.
5. Contre coloration avec de la safranine pendant 30 secondes.
6. Laver et sécher.

La lecture se fait à l'objectif x100 à l'immersion.

Les endospores apparaissent en vert clair et les cellules végétatives en rouge brunâtre à rose.

Annexe -04- : Mode opératoire de la coloration simple au Bleu de méthylène :

1) Préparation du frottis.

- Les lames utilisées doivent être propres et préalablement dégraissées par passage sur le bec Bunsen.
- Sur la face rugueuse de la lame, on note le numéro de l'échantillon à l'aide d'un stylo.
- Une fine goutte d'eau est ensuite déposée au centre de la lame.
- Prélever, à l'aide d'une pipette stérile des colonies, de préférence jeunes et fraîches, puis les déposer sur la goutte d'eau, tout en étalant sur la face de la lame, afin d'obtenir un frottis fin.
- Le frottis est ensuite laissé sécher à l'air, puis fixé par passage rapide 3 fois sur la flamme du bec bunsen.

2) Coloration par le bleu de méthylène pendant 15min.

3) Rinçage.

4) Séchage.

La lecture se fait à l'objectif 100 après avoir déposé une goutte de l'huile à l'émersion sur la lame.

Les cellules apparaissent colorées en bleu, on doit noter :

- La morphologie (cocci, bacille...) et le mode de regroupement.
- La présence ou l'absence de cellules (PN lymphocytes, hématies...).
- On compte le taux des PN et lymphocytes puis on établit le pourcentage.

Annexe -05- : Mode opératoire de la coloration spéciale de Gram :

- La première étape est la confection du frottis.
- La coloration du frottis :
 - Coloration par le violet de gentiane : Inonder le frottis avec le réactif de coloration au violet de gentiane, attendre 1 minute, puis laver abondamment à l'eau du robinet.
 - Fixation de la coloration à l'aide d'une solution de Lugol : Déposer quelques gouttes de lugol sur la lame, laisser agir une minute puis laver la lame avec l'eau du robinet.
 - Décoloration avec une solution d'alcool : Une solution contenant un mélange d'acétone et d'éthanol est versée sur la lame inclinée jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis (environ 30 secondes).
 - Contre coloration avec de la fuchsine : La lame est finalement inondée avec une solution de fuchsine pendant une minute, lavée abondamment à l'eau du robinet, puis séchée à l'air libre ou avec du papier absorbant.
- La lecture :

Les lames sont examinées au microscope optique au grossissement x 100 sous immersion dans l'huile.

 - Les bactéries à gram positif apparaissent violettes.
 - Les bactéries à gram négatif apparaissent roses.
 - Les cocci sont de forme circulaire ou ronde.
 - Les bacilles ont une forme de bâtonnets (cylindrique).
 - Les coccobacilles présentent une forme ovale, intermédiaire entre le cocci et le bacille.
 - Les spores ne se colorent pas à la coloration de Gram, car leur paroi est trop épaisse. Elles apparaissent, de préférence sur des cultures vieilles, comme des sphères claires à l'intérieur de la bactérie.

Annexe -06- : Identification par galerie Api 20A (Source : Manuel d'emploi API 20 A, Biomérieux).

Mode opératoire :

A. Préparation de l'inoculum :

- Devant le bec Bunsen, ouvrir l'ampoule d'Api 20A medium (milieu liquide de la galerie).
- À partir d'une culture pure d'une bactérie anaérobie stricte, prélever des colonies, de préférence jeunes, pour avoir une suspension d'une opacité finale de 3 Mac Farland. Il est nécessaire de bien vérifier la pureté de la souche et de choisir uniquement les colonies isolées.
- Emulsifier les germes en les déposants contre la paroi de l'ampoule, tout en restant dans le milieu de suspension et en évitant l'introduction d'air lors de l'homogénéisation du milieu.

Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

B. Inoculation :

- Humidifier le fond de la galerie avec de l'eau distillée à l'aide d'une seringue afin de créer une atmosphère humide à l'intérieur des alvéoles et y placer la galerie.
- Noter sur le fond de la galerie le numéro du prélèvement, le nom de la colonie, ainsi que la date de l'inoculation.
- Inoculer la suspension bactérienne dans chaque microtubule à l'aide d'une pipette stérile muni d'une poire, tout en évitant la formation de bulles, en inclinant légèrement la galerie.
- Contrairement aux autres tests qui nécessitent le remplissage du tube uniquement, le test de la gélatinase nécessitent le remplissage du tube et de la cupule.
- Le test de la production d'indole doit se faire en anaérobiose, c'est pour cela que la cupule est recouverte avec de l'huile de vaseline.
- Placer la galerieensemencée dans une jarre avec un générateur et un indicateur d'anaérobiose puis l'incuber à 37C° pendant 24-48h.
- Le surplus de la suspension peut être utilisé pour vérifier sa pureté en l'inoculant sur une gélose Columbia au sang frais et une gélose au sang cuit, incubée l'une en anaérobiose et l'autre en aérobie, ainsi que pour vérifier les résultats de la galerie en vérifiant la concordance du test d'idole à l'aide d'une solution de kovacs, dont la réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge à la surface de la suspension.

C. La lecture :

Elle se fait après 24 à 48 heures, en se référant au tableau de lecture.

Annexe -07- : Tableau de Lecture API 20A. (Source : Manuel d'emploi API 20 A, Biomérieux).

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
IND	L-tryptophane	0.98	INDole formation	XYL - mix / 2-3 min + EHR / 5 min yellow red	
URE	urea	0.648	UREase	yellow-orange	red
GLU MAN LAC	D-glucose D-mannitol D-lactose (bovine origin)	1.96 1.96 1.96	acidification (GLUcose) acidification (MANnitol) acidification (LACtose)	BCP	
SAC MAL SAL XYL ARA	D-saccharose (sucrose) D-maltose salicin D-xylose L-arabinose	1.86 1.96 1.64 1.64 1.64	acidification (SACcharose) acidification (MALtose) acidification (SALicin) acidification (XYLose) acidification (ARAbinose)	purple	yellow / yellow-green
GEL	gelatin (bovine origin)	0.6	hydrolysis (protease) (GELatin)	no diffusion of pigment (1)	diffusion of black pigment (1)
ESC	esculin ferric citrate	0.36 0.11	hydrolysis (β -glucosidase) (ESCulin)	yellow (2)	brown-black (2)
				in UV (365 nm)	
				fluorescence	no fluorescence
GLY CEL MNE MLZ RAF SOR RHA TRE	glycerol D-cellobiose D-mannose D-melezitose D-raffinose D-sorbitol L-rhamnose D-trehalose	1.82 1.86 1.96 1.96 2.18 2.18 1.96 1.96	acidification (GLYcerol) acidification (CELlobiose) acidification (ManNosE) acidification (MeLeZitose) acidification (RAFfinose) acidification (SORbitol) acidification (RHAMnose) acidification (TREhalose)	BCP	
				purple	yellow / yellow-green
CAT		—	CATalase	After 30 min in air H ₂ O ₂ in a positive tube no bubbles bubbles	
SPOR		—	spores	absent	present
GRAM		—	Gram reaction	pink	violet
COCC		—	morphology	rod	coccus

Annexe -08- : Tableau d'identification. (Source : Manuel d'emploi API 20 A, Biomérieux).

API 20 A V4.0		IND	URE	GLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA	GEL	ESC	GLY	CEL	MNE	MLZ	RAF	SOR	RHA	TRE	CAT	SPOR	GRAM	COCC
<i>Actinomyces israelii</i>	0	0	99	99	89	99	99	99	99	99	97	0	30	25	90	90	38	82	40	45	90	1	0	100	0
<i>Actinomyces meyeri/odontolyticus</i>	1	0	99	1	72	98	93	31	62	37	5	5	50	0	0	0	10	1	15	0	2	0	100	1	
<i>Actinomyces naeslundii</i>	0	5	99	26	72	96	94	55	0	0	16	21	47	50	70	5	60	16	0	46	11	0	99	0	
<i>Actinomyces viscosus 1</i>	0	0	99	0	65	99	99	22	0	0	7	1	60	17	95	0	99	0	0	0	5	90	0	100	0
<i>Actinomyces viscosus 2</i>	0	0	60	0	0	60	0	5	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	0	80	0	100	0
<i>Bacteroides caecae</i>	0	0	100	0	100	100	75	0	100	100	0	90	10	0	100	25	100	0	60	70	0	0	0	0	0
<i>Bacteroides distasonis</i>	0	0	99	0	99	99	93	73	86	27	1	30	4	60	95	65	98	1	80	70	77	0	0	0	0
<i>Bacteroides fragilis</i>	0	0	99	0	99	99	99	0	99	0	1	99	1	41	99	0	99	0	2	0	96	0	0	0	1
<i>Bac.ovatus/therafoatomicron</i>	80	1	99	7	99	99	99	28	99	99	3	95	1	65	99	23	99	2	99	83	65	0	0	0	0
<i>Bacteroides stercoris/eggerthii</i>	99	0	99	1	92	25	90	10	75	70	10	65	0	30	99	0	30	0	65	0	50	0	0	0	0
<i>Bacteroides uniformis</i>	91	0	99	0	99	99	95	97	99	95	3	99	0	99	99	1	98	0	42	1	9	0	0	0	0
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacteroides vulgatus</i>	0	0	99	0	99	98	98	0	99	92	5	23	1	8	99	0	94	0	77	3	2	1	0	0	1
<i>Bifidobacterium spp 1</i>	0	0	99	30	99	99	99	70	60	75	2	40	0	40	70	20	91	25	0	35	0	0	0	99	0
<i>Bifidobacterium spp 2</i>	0	0	99	99	99	99	99	90	90	80	1	75	45	99	99	85	100	75	50	99	0	0	0	99	0
<i>Clostridium baratii</i>	0	0	99	8	75	99	80	99	0	0	0	75	54	99	99	0	0	8	8	8	0	99	99	0	0
<i>Clostridium beijerinckii/butylicum</i>	1	0	99	47	95	99	98	97	97	80	10	76	54	95	95	20	80	31	25	90	0	100	89	0	0
<i>Clostridium bifermians</i>	90	0	75	0	0	0	70	10	0	0	90	6	5	0	50	0	4	0	0	0	0	97	99	0	0
<i>Clostridium botulinum/sporogenes</i>	20	0	55	0	0	1	72	0	0	0	99	20	1	1	1	0	0	1	0	40	0	99	99	0	0
<i>Clostridium cadaveris</i>	98	0	87	0	0	6	0	0	1	84	0	0	0	0	40	0	0	1	0	5	0	99	97	0	0
<i>Clostridium clostridioforme</i>	0	0	90	0	77	99	99	88	91	94	5	75	0	77	99	75	94	1	86	88	25	75	75	0	0
<i>Clostridium difficile</i>	0	0	99	80	0	0	0	20	5	0	44	30	0	5	66	83	0	5	1	5	0	98	99	0	0
<i>Clostridium histolyticum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	90	0	0
<i>Clostridium innocuum</i>	0	0	99	99	0	46	0	99	5	15	1	45	1	99	99	4	1	0	0	25	0	99	99	0	0
<i>Clostridium paraputrificum</i>	0	0	99	0	99	92	99	99	0	0	0	99	0	99	99	0	7	7	0	21	0	99	99	1	0
<i>Clostridium perfringens</i>	0	0	99	2	95	95	99	1	0	0	99	4	54	4	99	0	16	10	0	76	1	84	99	0	0
<i>Clostridium ramosum</i>	1	0	99	80	99	99	99	99	0	0	0	40	0	99	99	0	60	0	57	94	0	92	75	0	0
<i>Clostridium septicum</i>	0	0	99	1	99	0	94	94	0	1	75	35	0	76	99	0	0	1	84	1	99	99	0	0	0
<i>Clostridium sorbellii</i>	99	99	95	0	0	0	90	0	0	0	95	0	0	1	4	0	0	4	0	0	0	99	99	0	0
<i>Clostridium spp</i>	10	1	1	0	0	0	1	0	0	0	90	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	99	0	0
<i>Clostridium tertium</i>	0	0	99	99	99	99	99	99	70	0	0	35	0	99	99	62	0	1	0	85	0	99	99	0	0
<i>Collinsella aerofaciens</i>	0	0	100	0	99	90	90	75	0	0	0	40	0	75	99	0	0	0	0	70	0	0	0	100	0
<i>Eggerthella lenta</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	60	0	100	0	0
<i>Eubacterium limosum</i>	0	0	100	70	0	0	0	4	1	1	4	4	10	0	4	0	0	0	0	0	0	5	0	100	0
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	0	0	99	0	0	70	15	75	5	0	5	25	25	25	75	0	75	0	23	3	0	0	0	0	0
<i>Fusobacterium necrophorum/nucleatum</i>	94	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Fusobacterium varium</i>	70	0	81	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gemella morbillorum</i>	0	0	100	8	5	90	100	8	0	0	0	5	0	5	100	0	5	5	0	20	0	0	100	99	0
<i>Lactobacillus acidophilus/sensenii</i>	0	0	99	3	80	99	96	99	1	0	3	75	8	99	99	5	15	5	3	90	0	0	100	0	0
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0	98	99
<i>Peptostreptococcus group</i>	0	5	5	0	1	0	1	1	0	0	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	94	100
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3
<i>Prevotella bivia</i>	1	0	99	1	99	0	99	1	1	1	50	0	80	0	99	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Prevotella intermedia/disiens</i>	32	0	99	0	0	35	98	0	0	0	70	1	4	1	85	0	19	0	1	1	1	0	0	3	
<i>Prevotella melaninogenica/oralis</i>	0	0	97	1	97	83	97	31	2	1	20	51	18	53	97	1	89	0	12	4	0	0	0	1	0
<i>Propionibacterium acnes</i>	67	0	97	20	1	5	0	0	0	0	69	0	97	0	97	0	0	10	0	1	89	0	100	1	0
<i>Propionibacterium granulosum</i>	0	0	99	41	0	82	31	0	0	1	18	0	99	0	98	25	35	0	4	67	79	0	100	0	0
<i>Propionibacterium avidum</i>	0	0	92	50	50	73	80	0	2	5	40	0	45	0	56	2	75	0	1	30	30	0	82	0	0
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	0	25	87	0	5	0	0	0	0	5	0	5	75	0	75	0	0	0	5	5	99	0	100	100	0
<i>Streptococcus constellatus</i>	0	0	100	0	22	100	100	100	0	0	0	22	0	33	100	0	0	0	0	66	0	0	100	100	0
<i>Streptococcus intermedius</i>	0	0	99	20	99	99	99	95	0	0	0	75	0	90	99	6	26	0	0	99	0	0	100	100	0
<i>Veillonella parvula</i>	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	50	0	1

Annexe -09- : Fiche de résultats.

MINISTÈRE DE LA SANTÉ, DE LA POPULATION ET DE LA RÉFORME HOSPITALIÈRE
CENTRE HOSPITALO - UNIVERSITAIRE DE BLIDA
 UNITÉ DE FRANTZ - FANON
 LABORATOIRE CENTRAL DE BIOLOGIE
 UNITÉ DE MICROBIOLOGIE

FEUILLE DE RESULTATS DES EXAMENS BACTERIOLOGIQUES

EXAMENS DIRECTS

1 - Examens à l'état frais :

* Numération : **Globules blancs** []
 Globules rouges []

* Parasites : []

* Levures : [] * Recherche de capsules []

* Cellules épithéliales : [] * Microscopie à fond noir (Recherche de spirochètes) []

* Cristaux : []

* Cylindres : []

1 - Frottis colorés :

* Gram : **Bacilles à Gram négatif** [] **Cocci à Gram négatif** []
 Bacilles à Gram positif [] **Cocci à Gram positif** []

		0	1	2	3	4
Score :	(Prélèvements vaginaux)	[]	[]	[]	[]	[]
		1	2	3	4	5
Classe :	(Sécrétions broncho-pulmonaires)	[]	[]	[]	[]	[]

* **MGG :**

	Numération	Aspect
PNN	[] []	[]
Lymphocytes	[] []	

* IFD : (Immuno - fluorescence directe)

* Autres colorations :

CULTURE

	Positive	Négative
	[]	[]

Numération : [] UFC * / ml (* Unité format colonie)

IDENTIFICATION

Espèce bactérienne N° 1

Espèce bactérienne N° 2

Espèce bactérienne N° 3

INTERPRETATION ET COMMENTAIRES

.....

.....

BLIDA LE :

Annexe -10-: cachets de remise des résultats

Culture anaérobie en cours

Résultat dans 10 j

Absence de germes
anaerobies

Pour plus d'informations, nous sommes joignables sur les e-mails suivants :

Trinome.amirouche.driouech.mazouz@gmail.com

Amirouchenada97@gmail.com

Driouech.ray@gmail.com

Mazouzimene19@gmail.com

Résumé

Les bactéries anaérobies strictes sont des micro-organismes ubiquitaires, retrouvés au niveau des flores endogènes de l'homme et de la flore exogène, qui se distinguent par leur incapacité à survivre à des concentrations atmosphériques en oxygène.

Elles peuvent être responsables de pathologies de gravité et de localisations variables et dont le diagnostic est conditionné par l'utilisation de méthodes appropriées qui permettent la survie de ces espèces fragiles et dont la culture est lente et fastidieuse.

Le traitement des infections à bactéries anaérobies strictes implique souvent l'utilisation d'antibiotiques, cependant, ces espèces connaissent une augmentation notable de leur résistance, ce qui pousse les chercheurs à s'intéresser d'avantage à leur recherche et leur identification.

Dans le cadre de notre étude, 90 prélèvements ont été récoltés et analysés, ce qui a permis de diagnostiquer 21 (23%) infections à bactéries anaérobies strictes.

Les principales infections étaient les infections de la sphère ORL (28%), suivies par les infections intra-abdominales issues du service de chirurgie (28%) et par les infections ostéo-articulaires (24%).

Les bactéries anaérobies strictes isolées appartenaient essentiellement aux genres Porphyromonas (32%), Peptostreptococcus (16%), Bacteroides (13%) et Clostridium (10%).

Abstract

Strict anaerobic bacteria are ubiquitous microorganisms, found in the endogenous flora of humans and exogenous flora, and they are distinguished by their inability to survive at atmospheric oxygen concentrations.

They can be responsible for pathologies of varying severity and localization and their diagnosis is conditioned by the use of appropriate methods that allow the survival of these fragile species whose culture is slow and difficult.

The treatment of infections caused by strict anaerobic bacteria often involves the use of antibiotics. However, these species are showing a notable increase in their resistance, which has led researchers to take a greater interest in their research and identification.

In the present study, 90 specimens were collected and analyzed, resulting in the diagnosis of 21 (23%) strict anaerobic infections.

The main infections were ENT infections (28%), followed by intra-abdominal infections from the surgical department (28%) and osteoarticular infections (24%).

The strict anaerobic bacteria isolated belonged mainly to the genera Porphyromonas (32%), Peptostreptococcus (16%), Bacteroides (13%) and Clostridium (10%).

المخلص

البكتيريا اللاهوائية هي كائنات مجهرية منتشرة في جسم الانسان وفي الوسط الخارجي، تتميز بعدم قدرتها على التكاثر في وجود تركيزات عالية من الأوكسجين.

هذه البكتيريا مسؤولة عن أمراض ذات شدة ومواقع مختلفة، ويستدعي تشخيصها استخدام طرق مناسبة تضمن نموها الذي يكون عادة بطيء و مضني

كثيرا ما ينطوي علاج العدوى بالبكتيريا اللاهوائية على استخدام المضادات الحيوية، إلا أن هذه البكتيريا تشهد زيادة ملحوظة في مقاومتها، مما يدفع الباحثين إلى الاهتمام أكثر بدراساتهم

في إطار دراستنا، تم جمع وتحليل 90 عينة، مما مكن تشخيص 21 إصابة (23%) ببكتيريا لاهوائية

كانت الإصابات الرئيسية هي إصابات الأذن والأنف والحنجرة (28%)، تليها الإصابات البطنية من قسم الجراحة (28%) وإصابات العظام و المفاصل (24%)

البكتيريا اللاهوائية المعزولة كانت تنتمي في المقام الأول إلى جنس البورفيروموناس (32%)، يليه جنس الببتوستريبتوكوكوس (16%)، ثم جنس البكتريودس (13%) و جنس الكلوستريديوم (10%)