

REPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



MEMOIRE

Année Académique

2021-2022

Présenté pour l'obtention du Diplôme de

MASTER BIOLOGIE-SANTE Option

Phytothérapie et Pharmacologie des Substances Naturelles d'Intérêt

Par

YAO N'goran Jean-Eric

Numéro d'ordre

117-2022

THEME :

Evaluation de la qualité de la conservation des souches de *vibrio cholerae* o1 isolées à l'institut pasteur de côte d'ivoire de 2010 à 2015

Date de soutenance : 03/10/2022

JURY

M. DALLY Theodor	Maître de Conférences, UJLoG	Président
M. OKOU Obou Constantin	Maître de Conférences, UJLoG	Directeur Scientifique
M. ANNÉ Bléssa Jean Claude	Chargé de Recherches, IPCI	Encadreur
M. AKRÉ Djako Sosthène Thierry	Maître-Assistant, UJLoG	Examineur

DEDICACE

Je dédie ce mémoire à :

Mon Père, KONAN Yao, ce travail est le fruit des inestimables efforts que vous avez toujours consentis pour moi. Que cette œuvre reste le témoignage vivant de votre immense amour paternel. Que Dieu t'accorde longue vie,

Ma Mère, N'DRI Kanga, que Dieu t'accorde de nombreuses autres années en bonne santé,

Mes frères et sœurs, pour votre amour inestimable pour moi.

AVANT- PROPOS

Cette étude est une collaboration entre l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et l'Université Jean Lorognon Guédé de Daloa. Elle a pour but de former des étudiant(e)s en Biologie capables de relever les défis futurs par la consolidation de leurs connaissances universitaires. Un stage pratique de 06 mois au laboratoire de Bactériologie Clinique de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire a été nécessaire pour la réalisation de ce mémoire de Master. Je voudrais ainsi exprimer toute ma reconnaissance pour sa contribution dans la réalisation de cette étude scientifique.

REMERCIEMENTS

Au terme de cette étude, nous voudrions exprimer nos remerciements à :

- Professeur TIDOU Abiba Sanogo Epouse KONE, Professeur Titulaire d'Ecotoxicologie et Présidente de l'Université Jean Lorougnon Guédé pour ses encouragements à la recherche scientifique ainsi que pour le cadre propice de travail ;
 - Professeur DOSSO Mireille, Professeur Titulaire de Microbiologie et Directrice de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI), Chef du Département de Bactériologie-Virologie dudit Institut et Directrice du Laboratoire Centrale du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Yopougon pour avoir accepté de m'accorder ce stage et facilité les demandes administratives tout au long de ma formation ;
 - Professeur KONE Tidiani, Professeur Titulaire d'Hydrobiologie et Vice-Président chargé de la Pédagogie, de la Vie Universitaire, de la Recherche et de l'Innovation pour son dévouement à la bonne marche de l'Université Jean Lorougnon Guédé (UJLoG) ;
 - Professeur AKAFFOU Doffou Sélastique, Professeur Titulaire de Génétique et Vice-Président chargé de la Planification, de la Programmation et des Relations Extérieures à UJLoG de Daloa pour son dévouement à la bonne marche de l'Université Jean Lorougnon Guédé ;
 - Docteur TONESSIA Dolou Charlotte, Maître de Conférences de Phytopathologie et Directrice de l'UFR Agroforesterie pour ses enseignements et pour avoir autorisé mon inscription en Master 2 ;
 - Docteur ACKAH Jacques Auguste Alfred Bognan, Maître de Conférences de Biochimie-Microbiologie et Responsable de la Filière Biologie-Santé. Cher Maître, le Master que vous avez créé avec vos collaborateurs est un véritable instrument de transmission de connaissance, de compétence, de savoir-faire et de savoir-être. Que Dieu continue de vous inspirer dans le management et la gouvernance de ce parcours ;
- Nous tenons aussi à exprimer notre gratitude aux membres du jury pour avoir accepté de lire et d'apporter leur contribution à l'amélioration de ce mémoire ;
- Docteur OKOU Obou Constantin, Maître de Conférences de Biochimie-Pharmacologie pour avoir accepté de diriger ce travail, tout en apportant votre pierre à l'édification de ce travail et vos encouragements, votre rigueur scientifique et bien évidemment vos conseils ;
 - Docteur Dally Theodor, Maître de Conférences de physiologie pour avoir accepté de présider ce jury ;
 - Docteur ANNÉ Bléssa Jean Claude, PHD Chargé de Recherches à l'Unité de Bactériologie Clinique et Responsable du CNR Choléra et Shigelloses à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire,

qui m'a donné le thème de ce mémoire et accepté l'encadrement. Cher Maître il n'y a pas de mot assez fort pour vous traduire ma gratitude et ma reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour moi. Malgré vos nombreuses occupations, à chaque fois que ma vie oscille, vous avez été toujours là pour me prendre par la main et m'indiquer la bonne direction. Merci de m'avoir guidé dans ce mémoire. Merci tout simplement ;

- Docteur AKRE Djako Sosthène Thierry, Maitre-Assistant de Biochimie-Microbiologie. Cher Maître, je vous remercie d'avoir accepté de participer au jury de ce mémoire de Master en tant que l'examineur. Vos contributions aussi bien dans la forme que dans le fond m'a été très précieuse.

Je voudrais dire grand merci :

- Aux enseignants de Biologie Santé, les Docteurs : SOUMAHORO Ibrahim Aimé, YAYA Kamissoko, KOUASSI Henri, KPOROU Kouassi Elisée, OUATTARA Abou, KOFFI Allali Eugène, COULIBALY Bakary, OBOUAYEBA Abba Pacôme, pour tous leurs enseignements et conseils.

- Aux personnels du laboratoire de Bactériologie Clinique de l'IPCI, les Docteurs : KOUAME Elogne Clarisse, KANGA N'goran Tatiana, OKPO Sophia et les Techniciens : M. N'GUESSAN Kouadio, M. KOICHI Désiré, DALLO Dallo et à tous les Stagiaires.

Enfin, un grand merci :

Aux étudiants de Master 2 Biologie amis de la promotion 2021-2022.

TABLE DES MATIERES

DEDICACE.....	i
AVANT- PROPOS	ii
REMERCIEMENTS	iii
TABLE DES MATIERES	v
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES	x
INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES	3
1. GENERALITES.....	3
1.1. Présentation de la structure d'accueil	3
1.1.1. Département de Bactériologie-Virologie.....	3
1.1.2. Unité de Bactériologie Clinique (UBC).....	3
1.1.2.1. Infrastructure	4
1.1.2.2. Personnel	4
1.2. Etude Bactériologique	4
1.2.1. Généralités sur le Vibron Cholérique	4
1.2.2. Morphologie.....	4
1.2.2.1. Caractères cultureux et biochimiques.....	5
1.2.2.2. Caractère antigéniques des <i>Vibrio cholerae</i>	8
1.2.3. Taxonomie et Nomenclature	8
1.2.4. Physiopathologie et virulence du <i>Vibrio cholerae</i>	10
1.2.5. Epidémiologie	10
1.2.5.1. Habitat et réservoir	10
1.2.5.2. Source de contamination et facteur favorisant la contamination	11
1.2.6. Techniques d'isolement et de caractérisation des <i>Vibrio cholerae</i>	11

1.2.6.1. Techniques d'isolement des <i>V. cholerae</i>	11
1.2.6.2. Identification des bactéries du genre <i>Vibrio cholerae</i>	11
1.3- Evaluation de la qualité des géloses de conservation des souches de <i>V. cholerae</i> O1..	12
1.3.1- Evaluation de la qualité des géloses	12
1.3.2- Conservation.....	12
DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES	13
2. MATERIEL ET METHODES	13
2.1. MATERIEL	13
2.1.1. Site d'étude	13
2.1.2. Matériel technique	13
2.1.3. Matériel biologique.....	14
2.1.4. Milieux de culture	14
2.1.5. Réactifs et colorant	14
2.2. Méthodes	14
2.2.1. Critères de sélection.....	14
2.2.2. Méthode de revivification des souches de <i>V. cholerae</i>	15
2.2.2.1. Phase pré-enrichissement	15
2.2.2.2. Phase d'enrichissement	15
2.2.3. Isolement sur milieu gélosé.....	16
2.2.3.1. Sur la gélose TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Saccharose).....	16
2.2.3.2. Sur la Gélose Nutritive Alcaline (GNA).....	17
2.2.4. Examens microscopique des souches cultivées	18
2.2.4.1. Etat frais	18
2.2.4.2. Coloration de Gram.....	18
2.2.5. Identification biochimique	18
2.2.5.1. Mise en évidence de la production de cytochrome oxydase C.....	18
2.2.5.2. Mise en évidence de la production de la catalase.....	19

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION	20
3. RESULTATS ET DISCUSSION	20
3.1. RESULTATS.....	20
3.1.1. Caractères cultureux des souches bactériennes.....	20
3.1.2. Identifications morphologiques	21
3.1.3. Identifications biochimiques des isolats de <i>V. cholerae O1</i>	22
3.2. DISCUSSION.....	29
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	31
CONCLUSION	31
PERSPECTIVES.....	31
REFERENCES.....	37
ANNEXES	36

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ATCC	: American Type Culture Collection
AMPc	: Adénosine Monophosphate Cyclique
BCC	: Bouillon-Coeur-Cervelle
Ctx A	: toxine cholérique codée par les gènes A
Ctx B	: cholérique codée par les gènes B
CT	: Toxine Cholérique toxine
GNA	: Gélose Nutritive Alcaline
IPCI	: Institut Pasteur de Côte d'Ivoire
LPS	: Lipopolysaccharide
TCBS	: Thiosulfate-Citrate-Bile-Saccharose
TCP	: Toxin Coregulated Pilus
UA-ITG	: Unité des Agents des Infections du Tractus Génital
USBV	: Unité de Sérologie Bactérienne et Virale
UNERCO	: Unité d'Etude et de la Recherche sur les Contaminants Alimentaires
UMTA	: Unité des Mycobactéries Tuberculeuses et Atypiques

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	: Caractères biochimiques pour l'identification des espèces du genre <i>Vibrio</i>	7
Tableau II	: Caractères biochimiques pour l'identification des espèces du genre <i>Vibrio cholerae</i> O1.....	8
Tableau III	: Répartition des isolats en fonction de la mobilité par année.....	24
Tableau IV	: Répartition des isolats en fonction des caractères biochimiques par année.....	26

LISTE DES FIGURES

Figure 1	: Classification de <i>Vibrio cholerae</i>	5
Figure 2	: Structure de <i>V.cholerae</i> O1.....	9
Figure 3	: Tubes contenant de gélose.....	17
Figure 4	: souches ne contenant plus de gélose.....	17
Figure 5 a	: Mise en culture sur le milieu GNA.....	18
Figure 5 b	: Mise en culture sur le milieu TCBS.....	18
Figure 6	: Colonies saccharoses positives sur milieu TCBS.....	19
Figure 7	: Colonies bleutées sur milieu GNA.....	19
Figure 8	: Photo des colonies suspectes de <i>V. cholerae</i> sur TCBS.....	22
Figure 9	: Photo des colonies suspectes de <i>V. cholerae</i> sur GNA.....	23
Figure 10	: Photo de l'oxydase positive.....	25
Figure 11	: Histogramme de la répartition des isolats en fonction de la production d'oxydase par année.....	27
Figure 12	: Histogramme de la répartition des isolats en fonction de la production d'indole par année.....	28
Figure 13	: Histogramme de la répartition des isolats en fonction de l'utilisation du lactose par année.....	29
Figure 14	: Histogramme de la répartition des isolats en fonction de la production du gaz par année.....	30
Figure 15	: Histogramme de la répartition des isolats en fonction de l'utilisation du citrate par année.....	30

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les souches bactériennes conservées sont utilisées dans le cadre de la recherche, du contrôle qualité et de l'enseignement. La conservation connaît actuellement un essor dans le monde entier, et ce grâce au développement de la génétique humaine et des outils de l'informatique (Amal, 2007). Il est alors nécessaire de conserver ces souches bactériennes afin d'avoir une bio-banque. La conservation des souches bactériennes peut être subdivisée en deux groupes à savoir les méthodes de conservation à courte durée et les méthodes de conservation à longue durée. La conservation à longue durée comporte plusieurs techniques aux nombres desquelles on note la technique de conservation par la congélation qui peut se faire à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, et dans l'azote liquide à $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Aswood, 1980). La congélation dans l'azote liquide permet de conserver les bactéries avec une bonne vitalité, sur une période allant de 10 à 20 ans. L'azote liquide empêche les réactions enzymatiques telle que les ribonucléases qui sont actives aux températures supérieures à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. La congélation à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ permet de conserver les souches bactériennes sur une période allant de 4 à 10 ans (Simione, 1992). La méthode de conservation à courte durée comporte plusieurs techniques parmi lesquelles figure la technique de conservation par la congélation qui peut se faire à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ et permet une conservation des souches bactériennes pendant 1 à 3 ans (Simione, 1992). Aujourd'hui, des milliards de spécimens biologiques et d'échantillons collectés par des chercheurs du milieu universitaire, des instituts de recherche, des hôpitaux et des organisations commerciales sont souvent stockés dans des environnements froids (Omoshile, 2009). Vu l'intérêt considérable de la conservation et de l'utilisation ultérieure des échantillons biologiques d'origine humaine dans le diagnostic, la thérapie et la recherche (Amal, 2007) ; le Centre National de Référence Choléra (CNR Choléra) a conservé des souches de *V. cholerae* O1 d'origine humaine au cours des grandes épidémies du choléra sur toute l'étendue du territoire national. Ces souches de *V. cholerae* O1 ont été conservées en gélose profonde à la température du laboratoire ($\approx 28 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ce type de conservation, malgré de nombreux inconvénients a pour avantages son faible coût et ne nécessite pas de matériels lourds et sophistiqués pour sa mise en œuvre. Elle est donc pratiquée par de nombreux laboratoires ayant des moyens limités. Malheureusement, l'observation des tubes de conservation des souches de *Vibrio cholerae* isolées a montré que certains ne contenaient plus ou presque de gélose de conservation. La problématique qui se dégage de cette situation est de savoir si les souches de *V. cholerae* initialement conservées dans les tubes de conservation y sont toujours présentes et dans quels états sont-elles ?

Au regard de ce constat, cette étude a été entreprise avec pour objectif général de contrôler la qualité des souches de *V. Cholerae* O1 conservées dans la gélose profonde.

Plus spécifiquement, il s'agira de :

- vérifier les caractères cultureux des isolats de *V. cholerae* O1,
- vérifier les caractères morphologiques des isolats de *V. cholerae*,
- caractériser biochimiquement les isolats de *V.cholerae* O1.

Ce travail comprend une première partie consacrée à la synthèse bibliographique axée sur le contexte général de la conservation des souches bactériennes en Côte d'Ivoire. La deuxième partie consacrée à l'expérimentation. Celle-ci présente le matériel et les méthodes utilisées pour atteindre nos objectifs. Les résultats obtenus y sont indiqués et qui ont fait l'objet d'une discussion. Enfin quelques recommandations sont formulées.

PREMIERE PARTIE : GENERALITES

1. GENERALITES

1.1. Présentation de la structure d'accueil

Le 27 juillet 1972, la loi n° 72511 a fondé l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI). Son inauguration s'est faite en présence de feu Monsieur Félix Houphouët-Boigny, premier Président de la République de Côte d'Ivoire et le Professeur Jacques Monod, anciennement directeur de l'Institut Pasteur de Paris. Entre 1972 et 1984, l'IPCI a été dirigé par des européens. Les décrets n°82 1099 du 26 novembre 1982 et n°91654 du 09 octobre 1991 ont érigé respectivement cette institution en un établissement à caractère commercial. Placé sous la tutelle administrative du Ministère de la Recherche Scientifique qui est un membre statutaire du conseil de gestion. Cet institut est géographiquement situé sur deux sites : les sites d'Adiopodoumé (route de Dabou, à 25 Km d'Abidjan) et de Cocody (au sein du CHU de Cocody). Les autres membres statutaires sont : le Ministre Délégué auprès du Premier Ministre Chargé de l'Economie et des Finances, le ministre de la Santé et de la Lutte contre le SIDA et le Ministre de l'Emploi et de la Fonction Publique. Dirigé depuis 2004 par le Professeur Mireille DOSSO, l'IPCI fait partie du Réseau International des Instituts Pasteur (RIIP) qui est un ensemble de 33 instituts regroupant environ 10000 personnes. L'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire abrite des laboratoires de recherches et d'analyses de référence au sein des Départements Scientifiques (DS) et Départements Techniques (DT).

1.1.1. Département de Bactériologie-Virologie

Le Département de Bactériologie-Virologie est composée de 06 bureaux, une salle de conférence, espace pour l'accueil et information et 02 toilettes. Le département comprend l'Unité de Bactériologie Clinique (UBC), Unité des Antibiotiques, des Substances Naturelles et de la Surveillance des Micro- Organismes aux Anti- infectieux (ASSURMI), Unité des Mycobactéries Tuberculeuses et Atypiques (l'UMTA), Unité d'Etude et de la Recherche sur les Contaminants Alimentaires (UNERCO), Unité des Agents du Tractus Génital (UA-ITG), Unité de Sérologie Bactérienne et Virale (USBV).

1.1.2. Unité de Bactériologie Clinique (UBC)

La surveillance du Choléra en Côte d'Ivoire est une activité historique. Depuis 2002, date de la grande épidémie objet de la création en 2006 du CNR Choléra. Ce CNR Choléra a été intégré dans l'Unité de Bactériologie Clinique du Département de Bactériologie-Virologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

1.1.2.1. Infrastructure

L'Unité de Bactériologie Clinique est subdivisée en 02 salles, 01 salle de Recherches, 01 salle technique cloisonnée à 01 bureau administratif chargé de rendre les résultats des analyses,

1.1.2.2. Personnel

Le personnel de l'UBC est composé de deux médecins-biologistes Chargés de Recherches, trois médecins-biologistes Attachés de Recherches, deux Techniciens Supérieurs de santé et une Secrétaire.

1.2. Etude Bactériologique

1.2.1. Généralités sur le Vibriion Cholérique

Vibrio cholerae est l'agent étiologique du choléra, maladie touchant uniquement l'Homme, dont les symptômes sont d'importantes diarrhées aqueuses responsables de déshydratations et des pertes en électrolytes pouvant amener au décès du patient. Il est Présent dans l'environnement sous forme de cellules libres. *Vibrio cholerae* est aussi capable de coloniser les êtres vivants de façon commensale, comme le mollusque marin, ou bien pathogène (dans l'intestin grêle de l'Homme) (Colwell & Rita, 1996).

1.2.2. Morphologie

Les *Vibrio* sont des bacilles à Gram négatif, droits ou incurvés, de diamètre compris entre 0,5 et 0,8 μm et de longueur comprise entre 1,4 et 2,6 μm . Ils présentent habituellement une mobilité polaire due à un seul flagelle. Certaines souches possèdent plusieurs flagelles latéraux lorsqu'elles cultivent sur un milieu solide en particulier pour l'espèce *Vibrio parahaemolyticus*. *Vibrio cholerae* présente un flagelle «engainé» dans la paroi caractéristique (Bonhomme, 2003) (Figure 2).

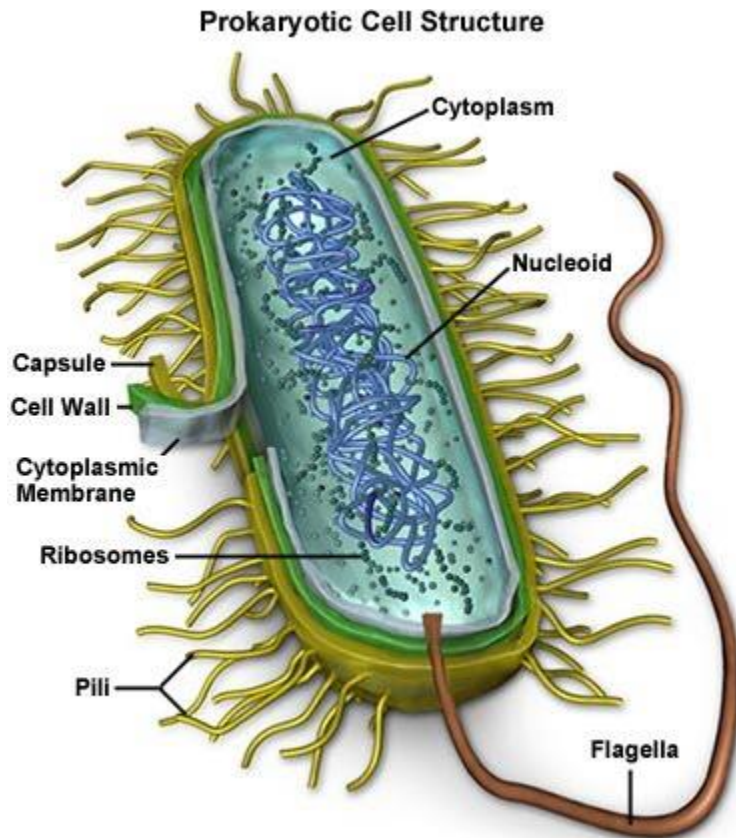


Figure 1 : Structure d'une souche de *V.cholerae* O1

1.2.2.1. Caractères cultureux et biochimiques

➤ Caractères cultureux

Les espèces de *Vibrio* ont peu d'exigence pour leur croissance, si ce n'est la présence d'ions de sodium pour les espèces dites halophiles, par opposition à l'espèce *Vibrio cholerae* qui est halotolérante. Elles cultivent sur le milieu Marine Agar, sur des milieux sélectifs comme le thiosulfate citrate bile saccharose (TCBS) et abondamment en milieux peptonés simples contenant 1 % de NaCl. Les *Vibrio* cultivent à des pH compris entre 5 et 11 (pH optimal de 7,5 et 8). Toutes les espèces cultivent à 20 °C, la plupart des espèces cultivent à 30 °C et plusieurs espèces à 37 °C. Les souches de *Vibrio* possèdent un temps de génération très court, qui peut être de 8 à 9 minutes ; après 18 à 24 heures d'incubation, les colonies obtenues sur une gélose TCBS ont un diamètre de 2 à 4 mm, elles sont convexes, lisses, circulaires, à contour régulier. Les souches produisant beaucoup de polysaccharides capsulaires donnent des colonies opaques alors que les souches produisant peu de polysaccharides capsulaires donnent des colonies plus transparentes (Quilici & Robert-Pillot, 2011).

➤ **Caractères biochimiques**

Les propriétés biochimiques sont utiles pour l'identification conventionnelle des *Vibrio*. Elles sont consignées dans le tableau I (Anonyme, 2001). Ce dernier fait apparaître des caractères communs aux trois espèces (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*) et des caractères distinctifs. Les caractères communs dans une démarche de diagnostic bactériologique, de confirmer l'appartenance des isolats aux trois espèces, ils concernent l'oxydase positive, la lysine décarboxylase positive, la lipase positive et l'arginine dihydrolase négative. Les caractères distinctifs permettent de différencier les trois espèces entre elles. Ils concernent la fermentation des glucides (saccharose, lactose et arabinose), la croissance en présence NaCl à différentes concentrations (0 %, 3 % et 8 % NaCl) et la sensibilité au composé vibriostatique O129. Cette dernière propriété a originellement été utilisée pour différencier les souches du *Vibrio* (sensibles) des souches d'*Aeromonas* (résistantes). Elle était déterminée par la méthode de diffusion en gélose Mueller-Hinton (disques chargés à 150 g). Cependant, la plupart des souches de *Vibrio* sont aujourd'hui résistantes à ce composé, cette résistance étant associée à celle au triméthoprime et au cotrimoxazole. L'isolement d'une souche résistante n'est donc plus un critère valable permettant d'exclure le genre *Vibrio* comme identification possible lors d'un diagnostic différentiel entre *Vibrio* et *Aeromonas*. C'est pourquoi, on accorde peu de crédit à cette propriété qui, permet de distinguer *Vibrio cholerae* de *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio vulnificus* selon (tableau II).

Tableau I : Caractères biochimiques pour l'identification des espèces du genre *Vibrio*
(Anonyme 2001)

Caractères biochimiques	Espèces du genre <i>Vibrio</i>		
	<i>V. cholerae</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
Oxydase	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	-
Lysine décarboxylase	+	+	+
Ornithine décarboxylase	+	+	V
ONPG	+	-	+
Fermentation des glucides :			
Saccharose	+	-	-
Arabinose	-	-	+
Lactose	-	-	+
Croissance dans NaCl % :			
0 %	+	-	-
3 %	+	+	+
8 %	-	+	-
Voges-proskauer	V	-	-
Lipase	+	+	+
Réaction au composé O129 :			
10 µg	S	R	R
50 µg	S	S	S

S=Sensible

R=Résistant

V=Variable

Positif : +

Négatif : -

Tableau II : Caractères biochimiques pour l'identification des espèces du genre *Vibrio cholerae* O1.

CARACTERE BIOCHIMIQUE	ESPECE DU GENRE <i>V. cholerae</i> O1
Mobilité	Polaire
Coloration de GRAM	Bacille GRAM négatif
Oxydase	+
Catalase	-
Urée	-
Indole	+
H ₂ S	-
Glucose	+
Lactose	-
Gaz	-
Citrate	+

Positif : +

Négatif : -

1.2.2.2. Caractère antigéniques des *Vibrio cholerae*

V. cholerae possède une morphologie en virgule d'où le nom que lui avait attribué Pacini dès 1854 (Pacini, 1854). Au sein de l'espèce *Vibrio cholerae*, 200 sérogroupes distincts ont été répertoriés et se différencient par la structure et la composition de l'antigène O du lipopolysaccharide (LPS) présent à la surface de la bactérie (Yamai *et al.*, 1997). À l'intérieur même d'un séroroupe les souches sont subdivisées en biotypes que l'on différencie selon des caractères phénotypiques et génotypiques. Parmi plus de 200 sérogroupes retrouvés, seulement deux sont capables de produire une épidémie voire une pandémie de choléra, soient les sérogroupes O1 et nouvellement O139 (Klose, 2001).

1.2.3. Taxonomie et Nomenclature

L'origine du séroroupe O139 a beaucoup été discutée depuis son apparition. Ainsi, le séroroupe O139, à la différence de O1 est encapsulé suggérant que l'émergence du séroroupe O139 comme pouvant provoqué le choléra n'est pas simplement due à une simple mutation du LPS du séroroupe O1 (Johnson *et al.*, 1994). Cependant, des études génomiques récentes semblent indiquer que les séquences chromosomiques du séroroupe O139 sont très proches de celles du séroroupe O1 ce qui suggère que le séroroupe O139 serait effectivement dérivé du séroroupe O1 et qu'il aurait acquis un nouvel antigène par

transfert de gènes (Hu *et al.*, 2016). On retrouve dans le séro groupe O1 deux biotypes : Classique et El Tor. L'analyse de la séquence nucléotidique de la toxine cholérique permet de différencier le biotype Classique du biotype El Tor (Waldor & Mekalanos, 1996) (Figure 1). En effet, la séquence *ctxA* de la sous-unité *CtxA* de la toxine cholérique est conservée entre les deux biotypes mais c'est avec la séquence de *ctxB* que l'on peut différencier les deux biotypes (Nair *et al.*, 2002). Seulement deux nucléotides diffèrent et induisent une substitution de deux acides aminés entre *CtxB* El tor et *CtxB* Classique. Les deux biotypes se distinguent aussi par des caractères phénotypiques différents, dont leur susceptibilité aux bactériophages, polymyxine B (PmB) et leur capacité d'hémolyse (Faruque *et al.*, 1998), (Son *et al.*, 2011).

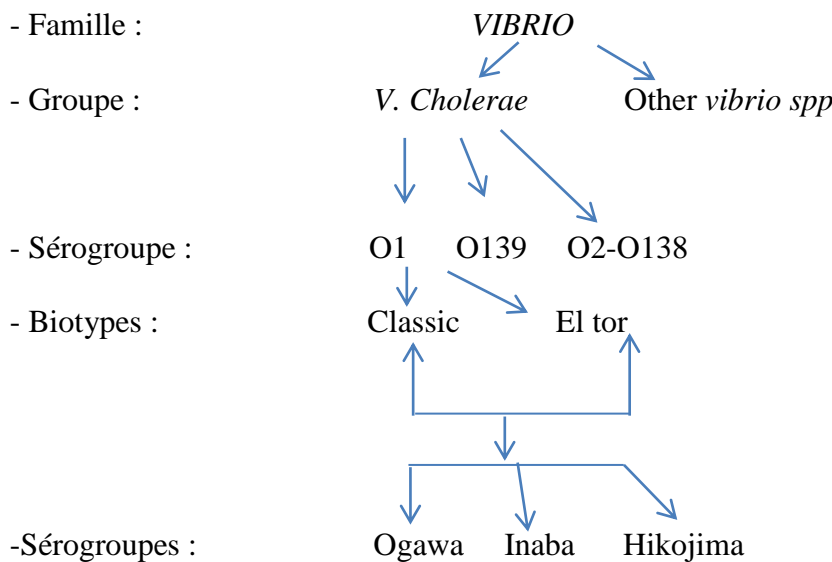


Figure 2 : Classification de *Vibrio cholerae* O1

L'espèce *Vibrio cholerae* est divisée en 206 sérogroupe. Parmi les sérogroupe, O1 et O139 ont causé des épidémies et des pandémies de choléra. Les 204 autres sérogroupe sont environnementaux ou causent des cas sporadiques ou des épidémies de gastro-entérites. Le sérogroupe O1 est subdivisé en deux biotypes, Classique et El Tor qui eux-mêmes sont divisés en trois sérotypes Ogawa, Inaba et Hikojima (Chowdhury *et al.*, 2017).

1.2.4. Physiopathologie et virulence du *Vibrio cholerae*

Après ingestion, les germes prolifèrent pour tapisser la muqueuse intestinale et adhèrent à la bordure en brosse par leur pilis grâce à une protéine codée par le gène *tcpA* (Taylor *et al.*, 1987). La pathologie due à *Vibrio cholerae* est provoquée principalement par une toxine cholérique CT codée par les gènes *ctxA* et *ctxB* (Reidl & Klose, 2002). Cette toxine se fixe à un récepteur lipidique situé à la membrane des entérocyte et active l'adénylate cyclase, ce qui augmente la production d'AMPc intracellulaire et l'excrétion d'ions sodium, ce qui provoque une fuite d'eau et d'électrolytes dans la lumière de l'intestin grêle.

1.2.5. Epidémiologie

V. cholerae est une bactérie aquatique autochtone de nombreuses zones à travers le monde. Elle serait originellement endémique de certains pays d'Afrique et d'Asie du Sud (Kaper, 1995), mais est maintenant retrouvée dans des estuaires en Australie (Desmarchelier & Senn CR, 1989) et à Chesapeake Bay (Colwell *et al.*, 1977). On la retrouve également fréquemment dans les produits de la mer (Thompson, 2004), vecteur par lequel elle est responsable d'infections alimentaires. Il est estimé qu'entre 1,3 et 4 millions de cas de choléra apparaissent chaque année, responsables d'environ 95 000 décès par an (Ali *et al.*, 2015).

1.2.5.1. Habitat et réservoir

L'étude de microbiologie écologique de *V. cholerae* en fait un habitant naturel des eaux saumâtres telles que celles des estuaires et des rivières à marée comme les grands fleuves d'Asie (Colwell & Huq, 1994) ; (Cottingham K *et al.*, 2003). Cette bactérie peut se présenter dans cet environnement sous différentes formes (Cottingham *et al.*, 2003) :

- une forme libre mobile,
- une forme commensale du zooplancton et en particulier des copépodes
- une forme en dormance lorsque les conditions environnementales deviennent préjudiciables à sa survie. Etat qui empêche la détection de *V. cholerae* par la technique de culture sur gélose.

Le réservoir humain est le principal si ce n'est l'unique en période épidémique. Il permet la rapide dissémination au sein d'un territoire. Ce réservoir comprend :

- les malades qui produisent des selles abondantes extrêmement riches en vibrions cholériques dont la virulence est augmentée par le passage intestinal ainsi que des vomissements (Merrel *et al.*, 2002).

- les convalescents et les porteurs asymptomatiques. Leur proportion varie selon le biotype et le sérotype de *Vibrio cholerae*. Il semble que O1 El Tor et O139 soient à l'origine d'un plus grand nombre de porteurs asymptomatiques et de manifestations bénignes que O1 classique (Kaper *et al.*, 1995).

1.2.5.2. Source de contamination et facteur favorisant la contamination

Les principaux vecteurs de contamination humaine sont l'eau et certains organismes tels que les zooplanctons, certains insectes et les cyanobactéries. Après ingestion, les germes prolifèrent pour tapisser la muqueuse intestinale et adhèrent à la bordure en brosse par leur pilis grâce à une protéine codée par le gène *tcpA* (Taylor *et al.*, 1987). La pathologie due à *Vibrio cholerae* est provoquée principalement par une toxine cholérique CT codée par les gènes *ctxA* et *ctxB* (Reidl & Klose, 2002).

1.2.6. Techniques d'isolement et de caractérisation des *Vibrio cholerae*

1.2.6.1. Techniques d'isolement des *V. cholerae*

La souche fait l'objet d'un enrichissement dans le bouillon cœur-cerveille. L'incubation est conduite à 37 °C pendant 18 à 24 heures. L'isolement est effectué sur le seul milieu TCBS avec incubation pendant 24 heures à 37 °C. Après incubation, on prélève 5 colonies caractéristiques saccharose positive (colonies jaunes, bombées de 0,5 à 0,8 mm de diamètre) qui sont repiquées sur gélose nutritive à 2 % NaCl. L'incubation est conduite à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Puis, chaque colonie fait l'objet d'un test oxydase qui, en cas de résultat positif sera retenue. Les souches oxydase positive servent à ensemercer les milieux permettant la recherche de H₂S (dihydrogène sulfureux), le Citrate de Simmons (Cet), le Lactose, le Glucose, le gaz et l'Urée-Indole. Après incubation à 37 °C pendant 18 à 24 heures, les souches exprimant les paramètres biochimiques sont des *Vibrio cholerae*.

1.2.6.2. Identification des bactéries du genre *Vibrio cholerae* O1

L'identification de bactéries du genre *Vibrio* peut néanmoins se faire grâce à l'amplification de gènes tels que le gène *toxR* (Kim *et al.*, 1999). Ce gène code pour l'activateur transcriptionnel *ToxR*. Il est présent chez différentes espèces de *Vibrio* mais avec une faible homologie entre les espèces (52 % d'homologie entre le gène codé chez *V. parahaemolyticus* et chez *V. cholerae*) (Lin *et al.*, 1993). Il permet de discriminer avec une grande sensibilité les espèces du genre *Vibrio* (Crocchi *et al.*, 2007).

1.3- Evaluation de la qualité des géloses de conservation des souches de *V. cholerae* O1

1.3.1- Evaluation de la qualité des géloses

Selon l'organisation internationale de normalisation (ISO), la qualité est : « l'ensemble des caractéristiques d'une entité qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés et implicites ». Les performances de tous les milieux utilisés au laboratoire doivent être vérifiées par des méthodes de contrôle de qualité appropriées. Dans tous les cas, les points suivants des milieux préparés sur place ou achetés devraient être soigneusement vérifiés :

➤ Stérilité

La validation de la stérilité des milieux est une opération qui prouve qu'un milieu de culture ne contient pas des microorganismes vivants (forme végétatif et sporulée). Elle permet de contrôler leur non contamination lors de leur préparation et de leur conservation en les plaçant (milieu prêt à l'emploi donc conditionné en boîte et non ensemencé) à l'étuve pendant le temps et à la température d'incubation utilisé habituellement.

➤ Fertilité

La validation de la fertilité est le contrôle de l'aptitude des milieux de culture à permettre une croissance des germes totaux en nombre défini ; ainsi qu'à la vérification de leur sélectivité vis-à-vis des microorganismes spécifiés. Elle permet de déterminer si le milieu a conservé les qualités nutritionnelles attendues au cours de sa préparation ou de sa conservation. On ensemence le milieu avec une suspension bactérienne de référence (ATCC) de concentration connue de façon à retrouver environ 100 colonies sur le milieu. L'absence de culture ou un résultat < 50 colonies traduit un problème de fertilité :

- une capacité à permettre la croissance de la pathogène cible.
- une capacité à produire des réactions biochimiques appropriées

1.3.2- Conservation

Selon leur composition, on peut conserver aussi bien les bactéries non exigeantes que les bactéries exigeantes. Ainsi, pour :

- les bactéries non exigeantes, on utilise un milieu solide qui est une gélose profonde en capillaires que l'on conserve à température ambiante.
- les bactéries exigeantes, on utilise un milieu liquide qui est du BGT + Glycérol que l'on congèle à -80 °C.

DEUXIEME PARTIE :
MATERIEL ET METHODES

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. MATERIEL

2.1.1. Site d'étude

Ce travail a été réalisé au CNR Choléra et des Shigelloses à l'Unité de Bactériologie Clinique du Département de Bactériologie-Virologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Il s'inscrit dans le cadre général du contrôle qualité des souches biologiques conservées, notamment des souches de *Vibrio cholerae* O1 isolées des selles des patients au cours des épidémies passées.

2.1.2. Matériel technique

➤ Equipements utilisés

Le matériel technique utilisé est essentiellement les équipements et les consommables.

Les équipements utilisés sont entre autres :

- un bec bunsen, produire de flamme alimenté en gaz combustible afin de stériliser du matériel,
- une étuve 37 °C, pour l'incubation,
- un réfrigérateur +4 °C, pour la conservation les milieux de culture et les réactifs.
- des microscopes optiques binoculaires à la lumière blanche pour lire l'état frais et la coloration de Gram,

➤ Consommables

Les consommables suivants ont été utilisés pour cette étude :

- l'eau physiologique, pour le frottis
- l'équipement de protection individuelle (Gants, Blouse, Chaussons, Masques),
- les lames porte-objet, pour l'état frais et la coloration de Gram,
- les lamelles couvre-objets, pour l'état frais,
- les anses jetables, pour la conservation,
- les Pipette Pasteur, pour l'ensemencement,
- les Papiers essuie-tout pour nettoyer les paillasse,
- les sachets poubelle de couleur rouge et jaune pour évacuer les déchets contaminants,
- les tubes à hémolyses stériles pour aliquoter les urées.
- un bac d'eau de javel dilué pour désinfecte.

2.1.3. Matériels biologique

Dans le cadre de la présente étude, 335 souches de *Vibrio cholerae* O1 conservées dans de gélose profonde à température ambiante au CNR Choléra et des Shigelloses de l'IPCI ont été utilisées.

2.1.4. Milieux de culture

Les géloses et les milieux de culture liquide qui ont été utilisé sont entre autres la gélose TCBS pour la culture des souches, la gélose nutritive alcaline (GNA) pour la culture, la gélose profonde pour la conservation des souches, l'eau peptonée alcaline pour l'enrichissement des souches et le Portoir de LE Minor pour l'identification des caractères biochimiques.

2.1.5. Réactifs et colorant

Les réactifs et colorants utilisés pour la réalisation de ce travail sont :

- le Kit de coloration Gram (Biomerieux, France) pour l'identification morphologique des bactéries,
- l'huile à immersion pour augmenter la résolution des microscopes avec fort grossissement,
- le disque d'oxydase marque la mise en évidence de la production de cytochrome oxydase C,
- le bouillon cœur-cerveille (BCC) pour l'enrichissement des souches,
- de l'éthanol 90° pour la précipitation,
- le réactif de Kovacs, destiné à la mise en évidence de la production d'indole,
- le réactif urée-indole, pour la recherche de la production d'une uréase par la bactérie.

2.2. Méthodes

2.2.1. Critères de sélection

Les tubes à bouchon vissable contenant encore de la gélose profonde et ayant servi initialement à la conservation des souches de *V. cholerae* de 2010 à 2015, ont été considérés (Figure 3). Par contre, les tubes à bouchon vissable vides et dont les géloses ont été totalement déshydratées n'ont pas été retenus (Figure 4). Au total, 379 tubes de conservation ont été identifiés dans la souchothèque du CNR choléra, 335 tubes contenant de gélose ont été inclus dans cette étude.



Figure 3 : Tubes contenant de gélose



Figure 4 : souches ne contenant plus de gélose

2.2.2. Méthode de revivification des souches de *V. cholerae*

La revivification des souches de *V. cholerae* s'est fait selon les deux étapes suivantes : la phase de pré-enrichissement et la phase d'enrichissement.

2.2.2.1. Phase pré-enrichissement

Avant l'utilisation du bouillon cœur-cerveille pour la revivification des isolats de *V.cholerae* O1, un contrôle qualité du dit bouillon a été réalisé, à savoir l'aspect limpide en vue de confirmer la stérilité. Il a consisté à mettre 4 mL du bouillon dans un tube à hémolyse stérile puis à l'incuber dans une étuve à 37 °C pendant 6 heures minimum. Après l'incubation, les tubes ont été retirés puis portés à l'identification macroscopique. Les bouillons qui présentaient l'aspect limpide ont été utilisés pour la suite du travail et les autres ont été rejetés. Toutes les manœuvres ont été effectuées dans les conditions aseptiques.

2.2.2.2. Phase d'enrichissement

Cette phase a consisté à ajouter du bouillon cœur-cerveille (BCC) dans chaque tube contenant de la gélose de conservation puis à l'incuber à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Les isolats enrichis de BCC ont été ensemencés par la technique en stries sur gélose TCBS et GNA (Figure 5a et 5b) puis incubées dans une étuve à 37 °C pendant 18 à 24 heures. La technique en stries a été utilisée afin d'avoir des colonies parfaitement isolées.



Figure 5a : Mise en culture sur le milieu GNA

Figure 5b : Mise en culture sur le milieu

2.2.3. Isolement sur milieu gélosé

2.2.3.1. Sur la gélose TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Saccharose)

Une mise en culture de chaque souche préalablement enrichie a été effectuée sur le milieu gélose TCBS pré coulé en boîte de Pétri de 90 mm de diamètre puis incubée dans une étuve à 37 °C pendant 18 à 24 heures en aérobie afin de favoriser la croissance des souches de *Vibrio cholerae* O1. Aussi, la présence des colonies saccharose positive (coloration jaune) sur cette gélose ont été retenues pour l'identification morphologique (Figure 6).

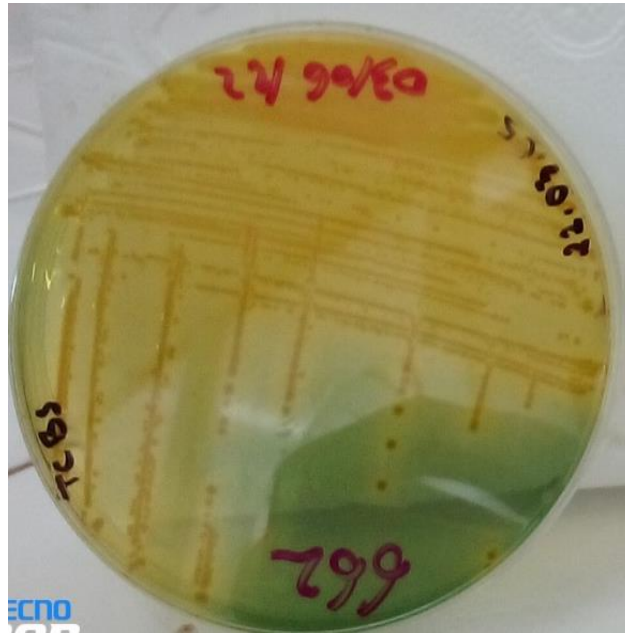


Figure 6 : Colonies saccharoses positives sur milieu TCBS

2.2.3.2. Sur la gélose nutritive alcaline (GNA)

La technique d'épuisement par des stries de chaque souche retenue a été utilisée sur la boîte gélosée nutritive alcaline (milieu enrichi) puis incubée à 37 °C pendant 18 à 24 heures en aérobie. La boîtes gélosée présentant des colonies a aspect bleutées suspectes ont été pris en compte pour la suite de l'analyse (identification des caractères biochimiques) (Figure 7).

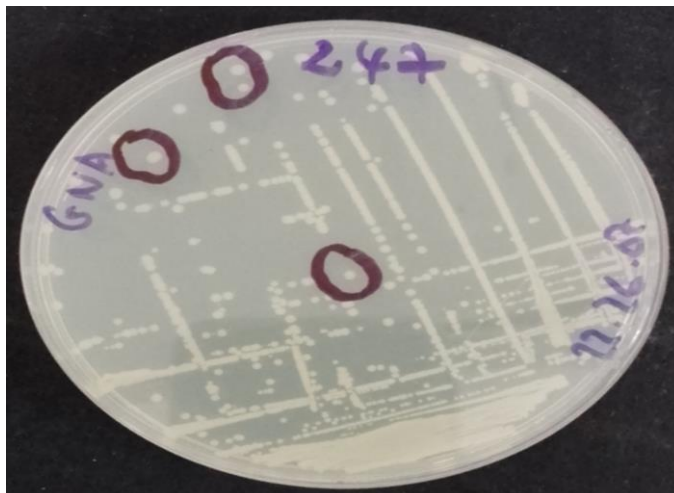


Figure 7 : Colonies bleutées sur milieu GNA

2.2.4. Examens microscopiques des souches cultivées

2.2.4.1. Etat frais

L'état frais est un examen permettant d'observer la mobilité et l'abondance des bactéries. Pour ce faire, une colonie obtenue après culture sur gélose nutritive alcaline (GNA) a été mise en suspension dans 2 mL de BCC contenu dans un tube à hémolyse stérile puis incubée dans une étuve à 37 °C pendant 3 à 6 heures. Après incubation, une goutte du bouillon ensemencé a été prélevé puis déposé sur une lame porte-objet ensuite la goutte a été recouverte par une lamelle couvre-objet. Cette préparation entre lame et lamelle a été observée au microscope optique au grossissement X 40.

2.2.4.2. Coloration de Gram

C'est une coloration différentielle de la paroi bactérienne. Elle permet de mettre en évidence deux populations bactériennes à savoir des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif (caractères tinctorial), d'apprécier également la forme de la bactérie (caractère morphologique). Toutes les colonies ayant cultivées sur le milieu nutritif (GNA) ont été retenues pour une classification en fonction de la coloration de Gram. Seuls les bacilles à Gram négatif incurvés en virgule ou droits ont été retenus pour l'identification biochimique.

2.2.5. Identification biochimique

L'identification biochimique a été réalisée par les principes de base de mise en évidence de la production de certaines enzymes métaboliques (cytochrome d'oxydase, catalase, et l'utilisation de certains substrats tel que le glucose, lactose, citrate ect). Ces différents milieux ont permis de mettre en évidence la capacité ou non qu'a la bactérie de fermenter le glucose (Glu), d'oxyder le lactose (Lac), de produire du gaz (gaz) et/ou de dihydrogène sulfureux (H₂S), de l'uréase (Urée), de l'indole (Ind), et d'utiliser du citrate (Cit) comme seule source de carbone.

2.2.5.1. Mise en évidence de la production de cytochrome oxydase C

La mise en évidence de la production du cytochrome oxydase C (enzyme respiratoire) a été réalisée à l'aide d'un disque imprégné de l'oxalate de N-diméthyl paraphénylène diamine (incolore). Cependant, il faut rappeler que ce disque a été fabriqué au laboratoire en mettant le réactif d'oxydase (incolore) sur le papier buvard. Après quoi, ce disque imprégné du réactif d'oxydase a été déposé sur une lame porte-objet. Une colonie bleutée suspecte a été prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur ensuite écrasée sur le disque. Une apparition de coloration violette en quelques secondes traduit la production du cytochrome oxydase C par la bactérie.

2.2.5.2. Mise en évidence de la production de la catalase

La production de cette enzyme a permis aux bactéries de se protéger du peroxyde d'hydrogène habituellement toxique pour les bactéries aérobies. La mise en évidence de la catalase traduit la capacité qu'a la bactérie de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et en oxygène (O_2). Pour ce faire, une goutte d'eau oxygénée a été déposée sur une lame propre porte-objet dans laquelle a été écrasée une colonie suspecte. La production de catalase par une bactérie a été caractérisée par un dégagement gazeux qui s'est traduit par la formation de bulles d'air dans le liquide.

➤ Réalisation du portoir réduit de Le Minor

La recherche des autres caractères biochimiques a consisté à ensemercer un portoir constitué de 3 milieux de culture en l'occurrence les milieux Kligler-Hajna (Biorad, France), urée-indole (Biorad, France), et citrate de Simmons (Biorad, France). Après ensemencement des différents milieux, le portoir a été placé dans une étuve à 37 °C pendant 24 heures. Les colonies présentant les caractères suivants ont été identifiées comme des bactéries du genre *Vibrio cholerae* à savoir Urée (-) ; Ind (+) ; H_2S (-) ; Glu (+) ; Lac(-) ; Gaz (-) ; Citrate (+).

TROISIEME PARTIE :
RESULTATS ET DISCUSSION

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Résultats

3.1.1. Caractères culturels des souches bactériennes

Après 24 heures d'incubation des isolats de *V. Cholerae* O1 sur le milieu TCBS, certains isolats ont montré une croissance bactérienne tandis que d'autres n'ont pas pu. Parmi les isolats qui ont poussés, certains présentaient de colonies saccharose positif (coloration jaune) alors que d'autres n'ont pas présenté cette coloration. L'apparition des colonies saccharose positif est un caractère phénotypique présumptif des bactéries du genre *V. cholerae* O1 (Figure 8). Cependant, la culture des mêmes isolats sur le milieu GNA a permis d'avoir certaines colonies bleutées avec la survie de tous les isolats et cela après 24 heures d'incubation. La couleur bleutée est un caractère phénotypique permettant de suspecter le *V. cholerae* O1 (Figure 9).

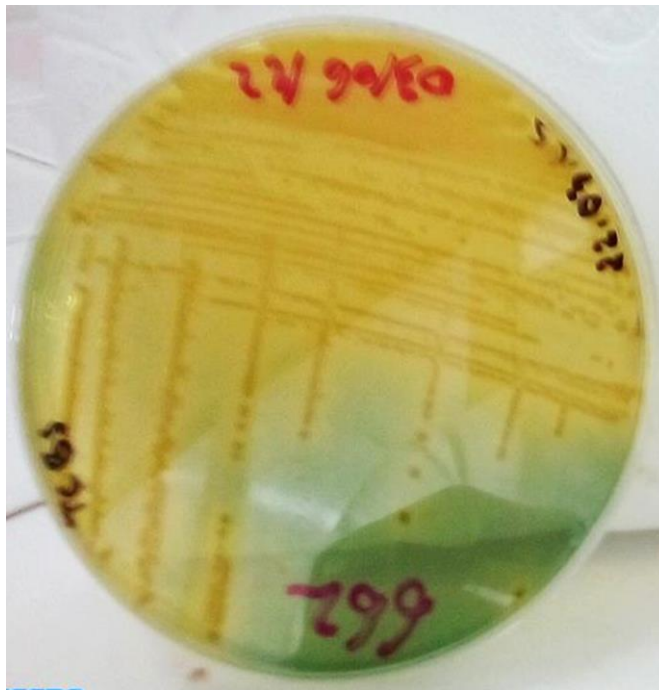


Figure 8 : Photo des colonies suspectes de *V. cholerae* sur TCBS

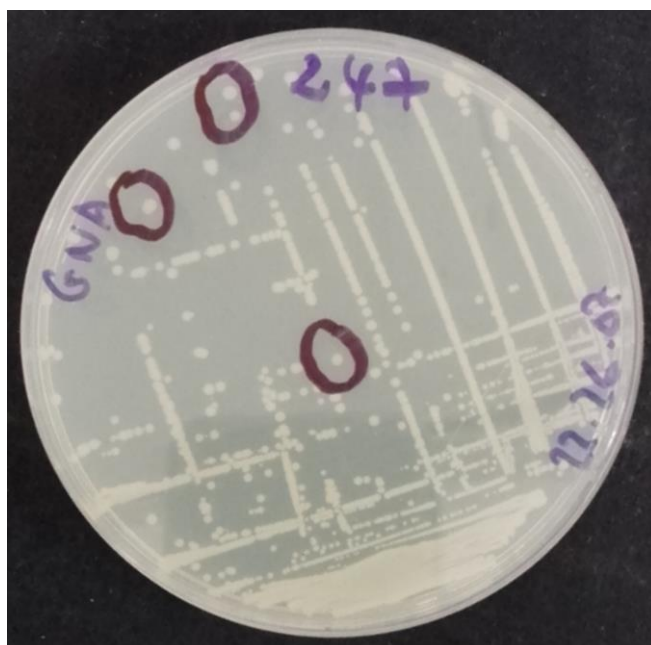


Figure 9 : Photo des colonies suspectes de *V. cholerae* sur GNA

3.1.2. Identifications morphologiques

Elles vont se faire en tenant compte des différents tests : Coloration de Gram, Catalase, Mobilité.

➤ Coloration de GRAM

La coloration de Gram a permis d'observer des bacilles à Gram négatif incurvées en virgule ou droit.

➤ Test de catalase

Le test de catalase a montré que tous les isolats de *V. cholerae* étaient essentiellement catalase négative montrant ainsi qu'ils ne dégradent pas le peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène.

➤ Test de mobilité

Au cours de cette étude, les bactéries mobiles polaires ont été retenues car la mobilité est un caractère physiologique particulier qui a permis à certaines bactéries de coloniser rapidement la lumière intestinale. Cependant, il y a trois types de mobilités à savoir, l'immobile, la mobile à caractère pérित्रiche et la mobile à caractère polaire. Le tableau III est celui de la répartition des isolats en fonction de la mobilité polaire par année. En effet sur 03

souches revivifiées de l'année 2010, 02 ont autres mobilités soit 66,66 % tandis que 01 avait une mobilité polaire soit 33,33 % ; en 2011, 21 sur 23 (91,3 %) ont d'autres mobilités et 02 sur 23 (8,69 %) avaient une mobilité polaire ; sur 54 souches revivifiées de l'année 2012, 27 ont autres mobilités soit 50 % et 27 avaient une mobilité polaire soit 50 % ; en 2013, 14 sur 59 (23,73 %) ont d'autres mobilités alors que 45 sur 59 (76,27 %) avaient une mobilité polaire. En 2014, 47 sur 61 (77,04 %) ont d'autres mobilités et 14 sur 61 (22,95 %) avaient une mobilité polaire. Sur 135 souches revivifiées de l'année 2015, 72 ont autres mobilités soit 53,33 % tandis que 63 avaient une mobilité polaire soit 46,67 %. Ainsi, sur un cumul de 6 ans (2010 à 2015), sur 335 souches revivifiées 152 (45,37 %) ont une mobilité polaire alors que 183 (54,62 %) ont autres mobilités.

Tableau III : Répartition des isolats en fonction de la mobilité polaire par année

Années /Test	Résultats	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Total
Mobilité	Autres	02 (66,66 %)	21 (91,3 %)	27 (50 %)	14 (23,73) (%)	47 (77,04 %)	72 (53,33 %)	183
	Polaire	01 (33,33 %)	02 (8,69 %)	27 (50 %)	45 (76,27 %)	14 (22,95 %)	63 (46,67 %)	152
Total		03	23	54	59	61	135	335

3.1.3. Identifications biochimiques des isolats de *V. cholerae* O1

Elles vont se faire en tenant compte des différents tests : Oxydase et le Portoir de LeMinor.

➤ Test d'oxydase

Les bactéries produisant le cytochrome oxydase C ont été retenues pour la suite de l'analyse parce que l'oxydase est une technique d'identification en bactériologie concernant les bactéries à Gram négatif. Cette détection de l'enzyme d'oxydase permet d'orienter la recherche vers la famille *Vibrionaceae* et *Pseudomonas* (Figure 10).

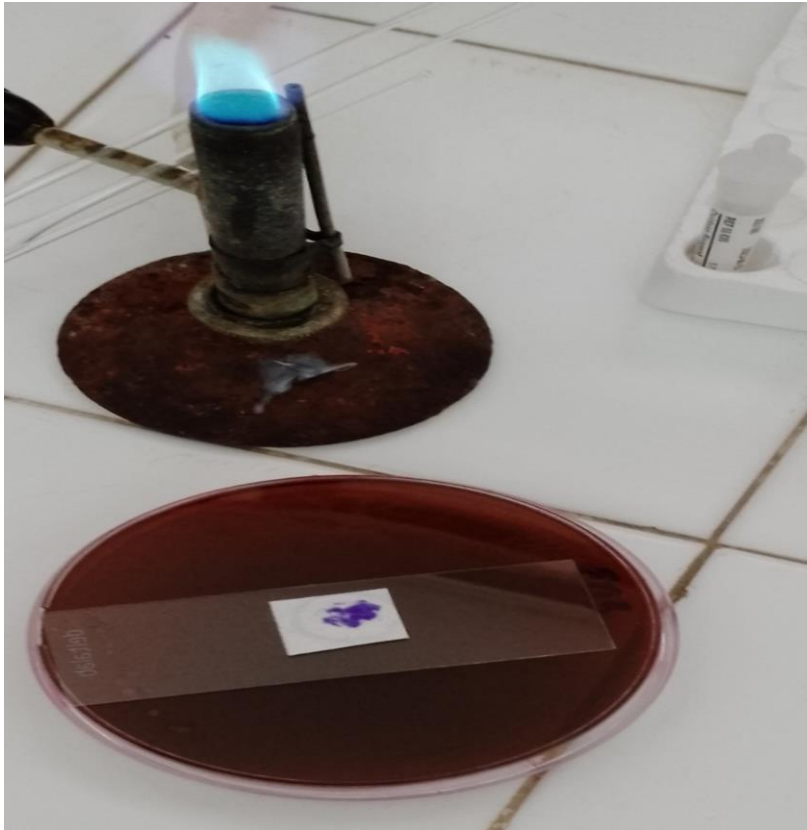


Figure 10 : Photo de l'oxydase positive

➤ Portoir réduit de Le Minor

Le tableau IV suivant présente la répartition des isolats en fonction des caractères biochimiques par année. Le portoir réduit de LeMinor permet de mettre en évidence les caractères biochimiques de la bactérie tel que : Urée (-) ; Ind (+) ; H₂S (-) ; Glu (+) ; Lac(-) ; Gaz (-) ; Citrate (+). Ainsi les colonies présentant les caractères précités ont été retenues. Certaines colonies ont donné des caractères biochimiques inhabituels notamment la présence dihydrogène sulfureux, de l'uréase positive, d'indole négatif et l'absence d'utilisation du citrate comme seule source de carbone.

Tableau IV : Répartition des isolats en fonction des caractères biochimiques par année

Caractères biochimiques		Années						Total
		2010 (n = 03)	2011 (n = 23)	2012 (n = 54)	2013 (n = 59)	2014 (n = 61)	2015 (n = 135)	N = 335
Oxydase	+	01 (33,33%)	02 (8,69%)	27 (50%)	45 (77,04%)	14 (22,95%)	63 (46,67%)	152
	-	02 (66,66%)	21 (91,3%)	27 (50%)	14 (23,73%)	47 (77,04%)	72 (53,33%)	183
Indole	+	01 (33,33%)	02 (8,69%)	27 (50%)	45 (76,27%)	14 (22,95%)	63 (46,67%)	152
	-	02 (66,66%)	21 (91,3%)	27 (50%)	14 (23,73%)	47 (77,04%)	72 (53,33%)	183
Lactose	+	02 (66,66%)	21 (91,3%)	27 (50%)	14 (23,73%)	47 (77,04%)	72 (53,33%)	183
	-	01 (33,33%)	02 (8,69%)	27 (50%)	45 (76,27%)	14 (22,95%)	63 (46,67%)	152
Gaz	+	02 (66,66%)	21 (91,3%)	27 (50%)	14 (23,73%)	47 (77,04%)	72 (53,33%)	183
	-	01 (33,33%)	02 (8,69%)	27 (50%)	45 (76,27%)	14 (22,95%)	63 (46,67%)	152
Citrate	+	01 (33,33%)	02 (8,69%)	27 (50%)	45 (76,27%)	14 (22,95%)	63 (46,67%)	152
	-	02 (66,66%)	21 (91,3%)	27 (50%)	14 (23,73%)	47 (77,04%)	72 (53,33%)	183

➤ Répartition des isolats en fonction de la production d'oxydase

La figure 11 ci-dessous montre l'histogramme de la répartition des isolats en fonction de la production d'oxydase par année. Il révèle que sur 03 souches revivifiées de l'année 2010, 02 ont produits une oxydase négative soit 66,66 % tandis qu'une souche avait une oxydase positive (colonies suspect de *V. cholerae*) soit 33,33 %; en 2011, 21 sur 23 (91,3 %) ont une oxydase négative et 02 sur 23 (8,69 %) avaient une oxydase positive ; sur 54 souches revivifiées de l'année 2012, 27 ont une oxydase négative soit 50 % et 27 avaient une oxydase positive soit 50 %. En 2013 14 sur 59 (23,73 %) ont une oxydase négative, tandis que 45 sur 59 (77,04 %) avaient une oxydase positive. En 2014, 47 sur 61 (77,04 %) ont une oxydase négative et 14 sur 61 (22,95 %) avaient une oxydase positive. Sur 135 souches revivifiées de l'année 2015, 72 ont une oxydase négative soit 53,33 % tandis que 63 avaient une oxydase positive soit 46,67 %. Ainsi, sur un cumul de 6 ans (2010 à 2015), sur 335 souches revivifiées 152 (45,37 %) ont une mobilité polaire alors que 183 (54,62 %) ont autres mobilités.

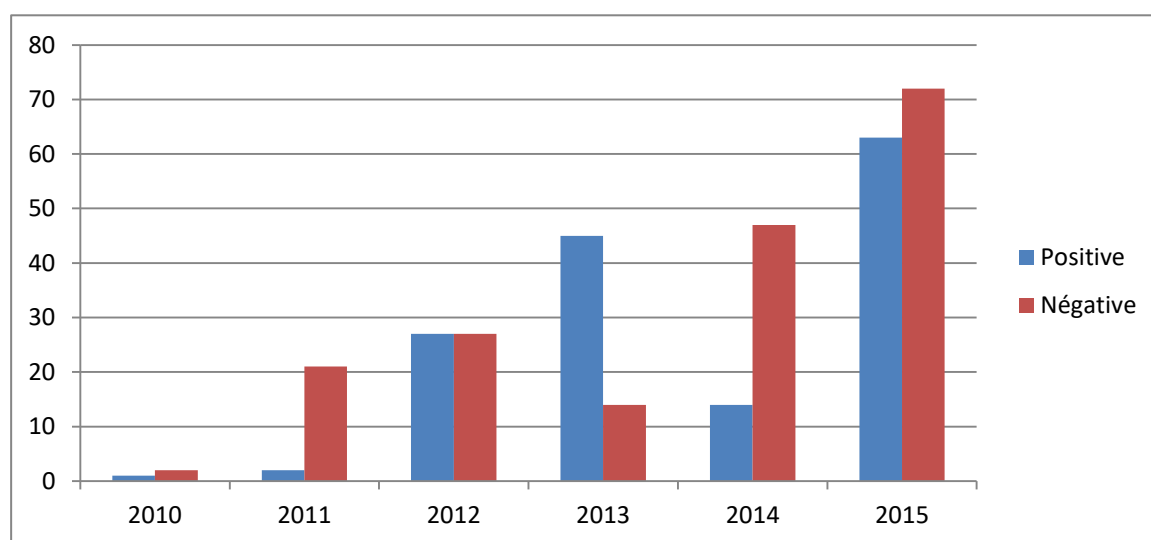


Figure 11 : Histogramme de la répartition des isolats en fonction de la production d'oxydase par année.

➤ Répartition des isolats en fonction de la production d'indole

La figure 12 montre l'histogramme de la répartition des isolats en fonction de la production d'indole par année. En effet, 21 sur 23 (91,3 %) ont un indole négatif et 02 sur 23 (8,69 %) avaient un indole positif en 2011 ; sur 03 souches revivifiées de l'année 2010, 02 ont un indole négatif soit 66,66 % tandis que 01 avait un indole positif soit 33,33 %. En 2012, sur 54 souches revivifiées, 27 ont un indole négatif soit 50 % et 27 avaient un indole positif soit 50 %. En 2013 sur 59 souches revivifiées, 14 (23,73 %) ont un indole négatif tandis que 45 sur 59 (76,27 %) avaient un indole positif. En 2014, 47 sur 61 (77,04 %) ont un indole négatif et 14 sur 61 (22,95 %) avaient un indole positif. Sur 135 souches revivifiées de l'année 2015, 72 ont un indole négatif soit 53,33 % tandis que 63 avaient un indole positif soit 46,67 %. Ainsi, sur un cumul de 6 ans (2010 à 2015), sur 335 souches revivifiées 152 (45,37 %) ont une mobilité polaire alors que 183 (54,62 %) ont autres mobilités.

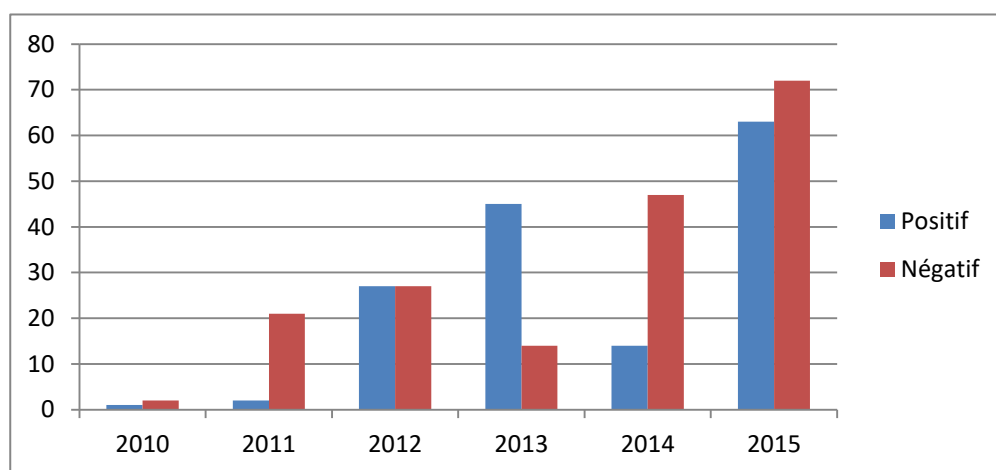


Figure 12 : Histogramme de la répartition des isolats en fonction de la production d'indole par année.

➤ Répartition des isolats en fonction de l'utilisation du lactose

La figure 13 montre l'histogramme de la répartition des isolats en fonction de l'utilisation du lactose par année. Sur 03 souches revivifiées de l'année 2010, 02 ont un lactose positif soit 66,66 % tandis que 01 avait un lactose négatif soit 33,33 % ; en 2011, 21 sur 23 (91,3 %) ont un lactose positif et 02 sur 23 (8,69 %) avaient un lactose négatif ; sur 54 souches revivifiées de l'année 2012, 27 ont un lactose négatif soit 50 % et 27 avaient un lactose positif soit 50 %. En 2013, 14 sur 59 souches revivifiées soit 23,73 % ont un lactose positif tandis que 45 sur 59 (76,27 %) avaient un lactose négatif. En 2014, 47 sur 61 (77,04 %) ont un lactose positif et 14 sur 61 (22,95 %) avaient un lactose négatif. Sur 135 souches revivifiées de l'année 2015, 72 ont un lactose positif soit 53,33 % tandis que 63 avaient un lactose négatif soit 46,67 %. Ainsi,

sur un cumul de 6 ans (2010 à 2015), sur 335 souches revivifiées 152 (45,37 %) ont une mobilité polaire alors que 183 (54,62 %) ont autres mobilités.

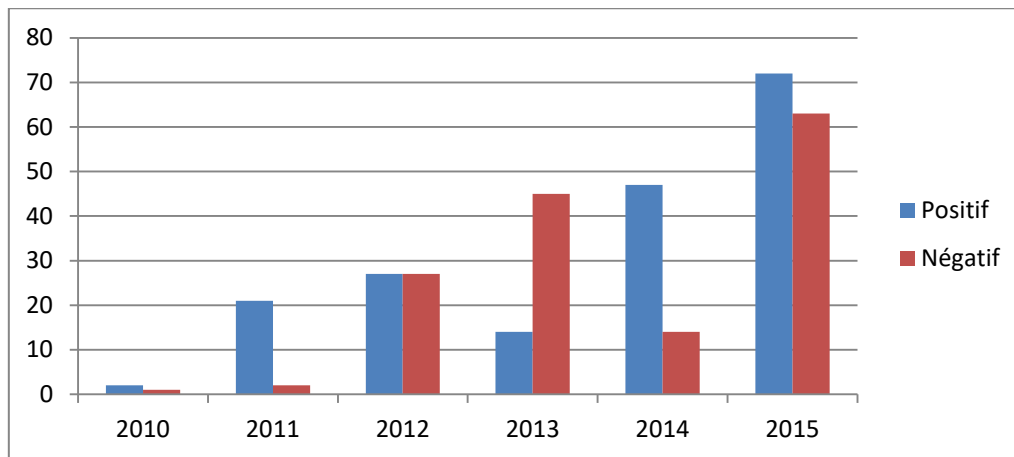


Figure 13 : Histogramme de la répartition des isolats en fonction de l'utilisation du lactose par année.

➤ **Répartition des isolats en fonction de la production du Gaz.**

La figure 14 montre l'historique de la répartition des isolats en fonction de la production du Gaz par année. Il révèle que sur 03 souches revivifiées de l'année 2010, 02 ont produit du gaz soit 66,66 % tandis que 01 n'a pu soit 33,33 %; en 2011, 21 sur 23 (91,3 %) ont produit du gaz et 02 sur 23 (8,69 %) n'ont pu. Sur 54 souches revivifiées de l'année 2012, 27 ont produit du gaz soit 50 % et 27 n'ont pu soit 50 % ; en 2013, 14 sur 59 (23,73 %) ont produit du gaz tandis que 45 sur 59 (76,27 %) n'ont pu. En 2014, 47 sur 61 (77,04 %) ont produit du gaz et 14 sur 61 (22,95 %) n'ont pu. Sur 135 souches revivifiées de l'année 2015, 72 ont produit du gaz soit 53,33 % tandis que 63 n'ont pu soit 46,67 %. Ainsi, sur un cumul de 6 ans (2010 à 2015), sur 335 souches revivifiées 152 (45,37 %) ont une mobilité polaire alors que 183 (54,62 %) ont autres mobilités.

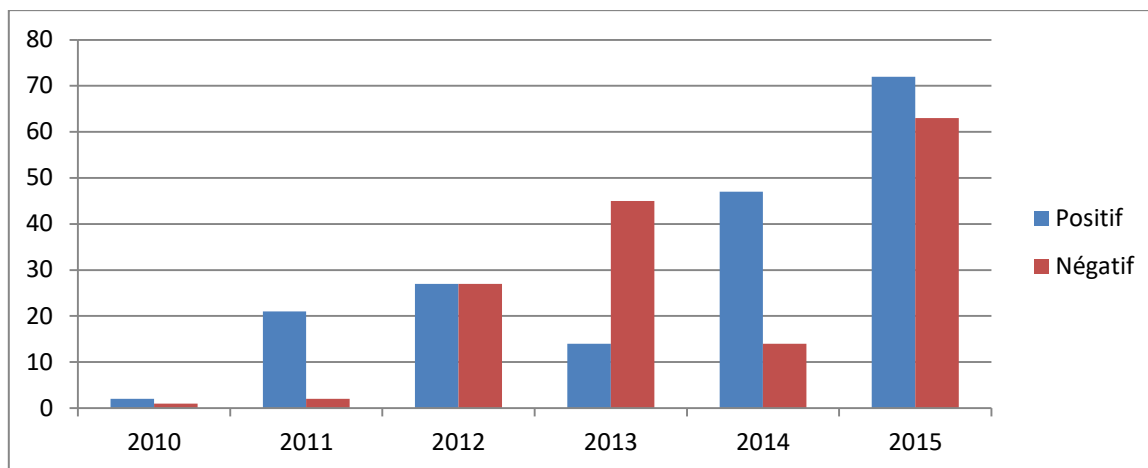


Figure 14 : Histogramme de la répartition des isolats en fonction de la production du Gaz par année.

➤ **Répartition des isolats en fonction de l'utilisation du citrate**

La figure 15 montre l'historique de la répartition des isolats en fonction de l'utilisation du citrate par année. Il révèle que sur 03 souches revivifiées de l'année 2010, 02 n'ont utilisé le citrate comme source de carbone soit 66,66 % tandis que 01 a utilisé soit 33,33 %; en 2011, 21 sur 23 (91,3 %) n'ont utilisé le citrate et 02 sur 23 (8,69 %) ont utilisé ; sur 54 souches revivifiées de l'année 2012, 27 ont utilisé le citrate soit 50 % et 27 n'ont utilisé soit 50 % ; en 2013, 14 sur 59 (23,73 %) n'ont utilisé le citrate. Tandis que 45 sur 59 (76,27 %) ont utilisé. En 2014, 47 sur 61 (77,04 %) n'ont utilisé le citrate et 14 sur 61 (22,95 %) ont utilisé. Sur 135 souches revivifiées de l'année 2015, 72 n'ont utilisé le citrate soit 53,33 % tandis que 63 ont utilisé soit 46,67 %. Ainsi, sur un cumul de 6 ans (2010 à 2015), sur 335 souches revivifiées 152 (45,37 %) ont une mobilité polaire alors que 183 (54,62 %) ont autres mobilités.

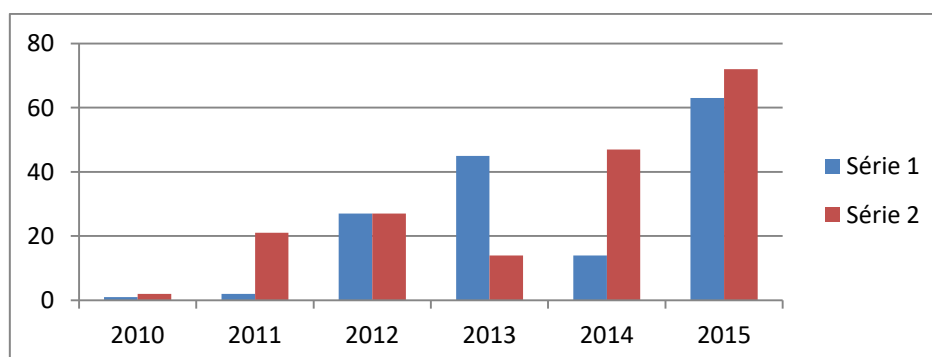


Figure 15 : Histogramme de la répartition des isolats en fonction de l'utilisation du citrate par année.

3.2. DISCUSSION

Pour améliorer la gestion des ressources biologiques du CNR choléra et Shigellose, cette étude a été entreprise afin de savoir si la gélose profonde pourrait être une méthode de conservation des souches de *V. cholerae* O1 dans les laboratoires ayant des moyens limités. L'étude a permis de revivifier 335 souches de *V. cholerae* O1 sur 379 (88,39 %) sur une période de 6 ans (2010 à 2015). Elle a permis ainsi de montrer que la méthode de conservation des souches bactériennes sur gélose profonde est une méthode fiable que peut être utilisée dans nos laboratoires à faible revenu.

Parmi les isolats qui ont été cultivés, certains ne présentaient pas de colonies saccharose (positif) qui est un caractère phénotypique présomptif des bactéries du genre *V. cholerae* O1. Cette absence de colonies saccharose positive pourrait s'expliquer par la perte de caractères biochimiques des souches. Les précautions prises pour éviter la dégradation doivent être telles qu'elles ne doivent pas avoir d'effet sur d'éventuels microorganismes qui devraient être révélés lors du test pendant l'essai. Il faut surveiller régulièrement les conditions de travail par échantillonnage de l'air et des surfaces du poste de travail. Cependant, la culture des mêmes isolats sur le milieu GNA a permis d'avoir certaines colonies bleutées avec la survie de tous les isolats. La couleur bleutée est un caractère phénotypique permettant de suspecter le *V. cholerae* O1. Les résultats obtenus corroborent ceux de l'OMS (2008). La présence de colonies bleutées pourrait être capitale dans le diagnostic du *Vibrio cholerae*, ce qui conduirait rapidement à l'identification biochimique.

La coloration de Gram a permis d'observer des bacilles à Gram négatif incurvés en virgule ou droit. Les résultats obtenus sont conformes à ceux de Pacini (1854). Cela pourrait expliquer que les bacilles Gram négatif étaient un caractère présomptif des bactéries du genre *V. cholerae* O1. Au niveau de l'identification biochimique, les résultats ont montré que certaines souches présentes dans les tubes de conservation contenant de la gélose ont été cultivées avec les caractères biochimiques non spécifiques aux bactéries du genre *V. cholerae*. Les résultats sont similaires à ceux de Haider (2006). Cela pourrait s'expliquer par la dégradation des isolats de *V. cholerae* O1 initialement conservés. Ces souches pourraient être soit viables mais non cultivables, soit viables et cultivables mais phénotypiquement modifiées. Aussi, la modification des caractères biochimiques serait liée aux processus d'identification et de conservation des isolats de *V. cholerae* O1.

Cependant Daniel *et al.* (2015) ont montré qu'après 6 mois de conservation par la méthode de conservation en gélose profonde à la température ambiante du laboratoire, le nombre de microorganismes viables baisse drastiquement jusqu'à s'annuler. Dans cette étude, la plus courte durée de conservation des souches de *V. cholerae* de cette étude était comprise entre 07 et 12 années. Par ailleurs, même si certaines (54,62 %) souches conservées ont cultivé avec les caractères biochimiques non spécifiques aux bactéries du genre *V. cholerae*, cette étude a montré que plusieurs (45,37 %) souches conservées ont donné des colonies bactériennes suspectes de *V. cholerae* O1 sur le milieu nutritif GNA. L'analyse de ces colonies bactériennes a révélé qu'elles possédaient un cytochrome d'oxydase, produisaient le réactif d'indole, utilisaient le citrate comme source de carbone, fermentaient le glucose, ne dégradait pas le lactose, ne produisaient pas l'uréase et ne produisaient pas dihydrogène sulfureux. Les résultats obtenus sont conformes à ceux de Anonyme (2001). Cela signifierait que ces caractères biochimiques pourraient être habituels chez les bactéries du genre *V. cholerae* O1.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Cette étude avait pour but de savoir si l'utilisation de la gélose profonde pourrait contribuer à améliorer la qualité la méthode de conservation des souches de *V. cholerae* O1 dans les laboratoires aux ressources limitées. Pour ce faire, une évaluation des caractères cultureux, morphologiques et biochimiques de 335 souches de *V. cholerae* conservées dans la gélose profonde pendant plus de 06 ans a été effectuée. Les résultats de cette étude ont montré qu'un taux de dégradation des isolats de *V. cholerae* O1 conservés était de 54,62 %. Cependant, 45,37 % des isolats conservés ont maintenus les caractères cultureux, morphologiques et biochimiques de *Vibrio cholerae* O1. Les souches de *V. cholerae* O1 peuvent donc être conservées en gélose profonde plus de six mois (6) comme le recommande certaines études pour l'ensemble des bactéries.

PERSPECTIVES

Quant au CNR Choléra et des Shigelloses, il serait judicieux de poursuivre l'identification par les méthodes moléculaires et l'extraction de l'ADN des souches de *Vibrio cholerae* O1 en vue de les conserver. Dans la perspective d'éviter la dégradation des isolats de *V. cholerae* O1 isolés, identifiés et conservés dans la gélose profonde, il serait judicieux de les conserver au CEREB disposant de plusieurs méthodes de conservation.

REFERENCES

- Ali M., Nelson A. R., Lopez A. L. & Sack D. A. (2015). Updated Global Burden of Cholera in Endemic Countries. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003832>
- Amal T. (2007). Les implications éthiques de la conservation des échantillons biologiques. Rapport de stage au Centre de Recherche en Droit Public de l'Université de Montréal, (Montréal), 34 p.
- Anonyme (2001). Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures related to Public Health on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* (in raw and undercooked seafood). European Commission. Directoral C- Scientific Opinions. C2- Management of scientific committees; scientific cooperation and networks.
- Aswood-Smith M. J. (1980). Low temperature preservation of cells, tissues and Organs in low temperature perservation in medicine and biology, p19-44
- Bonhomme A.J.C. (2003). Les bactéries du genre *Vibrio* et la santé publique vétérinaire. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (France), 112 p
- Chowdhury F.R., Nur Z., Hassan N., von Seidlein L. & Dunachie S. (2017). Pandemics, pathogenicity and changing molecular epidemiology of cholera in the era of global warming. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16(1): 10. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0185-1>.
- Colwell & Rita R. (1996). Global Climate and Infectious Disease : The Cholera Paradigm *Science*, 274 (5295) : 2025-2031. <https://doi.org/10.1126/science.274.5295.2025>
- Colwell R., Kaper J. & Joseph S. (1977). *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and Other Vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay. *Science*, 198(4315) : 394–396.
- Colwell R.R. & Huq A. (1994). Environnemental reservoir of *Vibrio cholerae*. The causative agent of cholera. *Annals of the New York Academy Sciences*, 740 : 44-54.
- Cottingham K., Chiavelli A.D. & Taylor R.K. (2003). Environnemental microbe and human pathogen : the ecology and the microbiology of *Vibrio cholerae*. *Front Ecology Environnemental*, 1 (2) : 80-86.
- Croci L., Suffredini E., Cozzi L., Toti L., Ottaviani D. & Pruzzo C. (2007). Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Jornal of Applied Microbiology*, 102 (1) : 229–37.
- Daniel S. N., Money M., Doumbia S., Cisse S., Odi N., Faye K. H. & Dosso M. (2015). The effects of storage conditions on the viability of enteropathogenics bacteria in

- biobanking of human stools : Cases of *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica* *Typhimurium* and *Vibrio cholerae* O1. *African Journal of Biotechnology*, 38-41.
- Desmarchelier P.M. & Senn C.R. (1989). A molecular epidemiological study of *Vibrio cholerae* in Australia. *Medical Journal Australia*, 150(11) : 631– 634.
- Faruque S.M., Albert M.J. & Mekalanos J. J. (1998). Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4) : 1301-1314.
- Haider S.I. (2006). Validation Standard Operating Procedures, second edition, A Step by Step Guide for Achieving Compliance in the Pharmaceutical, Medical Device, and Biotech Industries, P : 3-11.
- Hu D., Liu B., Feng L., Ding P., Guo X., Wang M. & Wang L. (2016). Origins of the current seventh cholera pandemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(48), E7730-E7739. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608732113>
- Johnson J.A., Salles C.A., Panigrahi P., Albert M.J., Wright A.C., Johnson R.J. & Morris J. G. (1994). *Vibrio cholerae* O139 synonym bengal is closely related to *Vibrio cholerae* El Tor but has important differences. *Infection and Immunity*, 62(5) : 2108-2110.
- Kaper J.B., Morris J.G. & Levine M.M. (1995). Cholera. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(1) :48–86.
- Kim Y.B., Okuda J., Matsumoto C., Takahashi N., Hashimoto S. & Nishibuchi M. (1999). Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(4) : 1173–1177.
- Klose K. E. (2001). Regulation of virulence in *Vibrio cholerae*. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(2) : 81-88. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00104>.
- Lin Z., Kumagai K., Baba K., Mekalanos J.J. & Nishibuchi M. (1993). *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* *toxRS* operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. *Journal of Bacteriology*, 175(12) : 3844–3855.
- Merrel D.S., Butler S.M., Qadri F. & Dolganov N.A. (2002). Host induced epidemic spread of the cholera bacterium. *Nature*, 417 : 642-645.
- Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K. & Sack D.A. (2002). New Variants of *Vibrio cholerae* O1 Biotype El Tor with Attributes of the Classical Biotype from Hospitalized Patients with Acute Diarrhea in Bangladesh.

Journal of Clinical Microbiology, 40(9) : 3296-3299.
<https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002>.

- Omoshile (2009). Biological Sample Storage and Management. *Lab Manager : temperature Storage medium for Compatibility in microarray Gene Expression Analysis*, BioTechniques, 47: 667-670. <http://www.labmanager.com/laboratory-technology/2009/10/biological-sample-storage-and-management>
<http://www.labmanager.com/laboratory-technology/2009/10/biological-sample-storage-and-management>
- OMS. (2008). Choléra : bilan de la surveillance mondiale. *Relevé Epidémiologique Hebdomadaire*, 31(84) : 309-24.
- Pacini F. (1854). Osservazioni microscopiche e deduzioni patologiche sul cholera asiatico. *Gazzetta Medica Italiana*, 6 : 405-422.
- Pollitzer R. (1954). Cholera studies. *Bulletin of the World Health Organization*, 10(3) : 421-461.
- Quilici M.L. & Robert-Pillot A. (2011). Infections à vibrions non cholériques. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris). *Maladies Infectieuses*, 8-026-F-15.
- Reidl J. & Klose K.E. (2002). *Vibrio cholerae* and cholera: Out of the water and into the host. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(2) :125–39.
- Simione F.P. (1992). Key issues relating to the genetic stability and preservation of cells and cell banks. *Journal Parenter Sciences Technology*, 46 : 226-232.
- Son M.S., Megli C.J., Kovacikova G., Qadri F. & Taylor R.K. (2011). Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor Biotype Variant Clinical Isolates from Bangladesh and Haiti, Including a Molecular Genetic Analysis of Virulence Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(11) : 3739-3749. <https://doi.org/10.1128/JCM.01286-11>
- Taylor R.K., Miller V.L., Furlong D.B. & Mekalanos J.J. (1987). Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(9) : 2833–2837.
- Thompson FL., Iida T. & Swings J. (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3) : 403–431.
- Waldor., Matthew K. & Mekalanos J.J. (1996). Lysogenic Conversion by a Filamentous Phage Encoding Cholera Toxin. *Science*, 272 (5270) : 1910-1914.
<https://doi.org/10.1126/science.272.5270.1910>

Yamai S., Okitsu T., Shimada T. & Katsube Y. (1997). Distribution of serogroups of *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 with specific reference to their ability to produce cholera toxin, and addition of novel serogroups *Kansenshogaku Zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*, 71(10) : 1037-1045.

ANNEXES



Microscope optique



Bec-besen



Etuve



Géloses



Congélateur



Pipettes Pasteur, Anses jetables



Réactif du test de GRAM



Briquet, Bic, Crayon, Marker



Gants latex



Réactif



Portoir réduit de LeMinor



Portoir réduit de LeMinor

RESUME

Les bactéries du genre *Vibrio cholerae* sont responsables du Cholera chez l'être humain. L'observation des tubes de conservation des souches de *Vibrio cholerae* O1 isolées, identifiées puis conservées a montré que certains ne contenaient presque plus de gélose de conservation. La problématique qui se dégageait de cette situation était de savoir si les souches de *V. cholerae* initialement conservées dans les tubes de conservation y étaient toujours présentes et dans quels états se trouvaient-elles ? L'objectif général de cette étude était de savoir si l'utilisation de la gélose profonde pourrait contribuer à améliorer la méthode de conservation des souches de *V. cholerae* O1 dans les laboratoires aux ressources limitées. L'évaluation des caractères cultureux, morphologiques et biochimiques des isolats de *Vibrio cholerae* conservés depuis plus de 06 années a été effectuée. Les résultats de l'étude ont montré qu'un taux de dégradation des isolats de *V. cholerae* O1 conservés était de 54,62 %. Cependant, 45,37 % des isolats conservés ont exprimé les caractères cultureux, morphologiques et biochimiques de *Vibrio cholerae* O1. La recommandation majeure de cette étude était de conserver les isolats de *V. cholerae* O1 dans la gélose profonde à la température ambiante n'excédant pas 06 ans. Pour une meilleure conservation, il serait judicieux de les conserver les isolats de *V. cholerae* O1 dans les conditions de froid (-70 °C) dans une biobanking.

Mots clés : *Vibrio cholerae*, conservation, Cholera

ABSTRACT

Bactérie of the genus *V. cholerae* are responsible for cholera in humans. Observation of the storage tubes of the isolated, identified and preserved *V. cholerae* O1 strains showed that some contained almost no storage agar. The général objectif of this study was to find out whether the use of deep agar could contribute to improving the method of conservation of *V. cholerae* O1 strains in laboratories with limited resources. The evaluation of the cultural, morphological and biochemical characteristics of *V. cholerae* O1 isolates stored for more than 06 years has been carried out. The results of this study showed that a rate of degradation of the preserved *V. cholerae* O1 isolates was 54,62 %. However, 45,37 % of the retained isolates expressed the characteristics of *V. cholerae* O1. The major recommendation of this study was to store *V. cholerae* O1 isolates in deep agar at room temperature for no more than 06 years. For better preservation, it would be juicy to preserve the *V. cholerae* O1 isolates under cold conditions in the biobanking.

Keywords : *V. cholerae* O1, conservation, Choléra