

STRUCTURE, CLASSIFICATION & IDENTIFICATION

PARTIE 1

✦ QUELLE EST LA CONSTITUTION DU MONDE BACTÉRIEN ?

Le monde bactérien existe depuis 1000× plus longtemps que les hommes. On estime que les premières bactéries sont apparues il y a **3,5 MILLIARDS** d'années, alors que les hommes ne seraient apparus qu'il y a **3,5 MILLIONS** d'années.

Les bactéries sont donc des organismes hautement adaptables, qu'on pourrait qualifier de "tout-terrain". Cette capacité d'adaptation est due à trois critères importants :

- ◆ Une importante plasticité du génome, avec beaucoup d'éléments mobiles permettant aux bactéries de pouvoir s'adapter aux différentes **niches écologiques**.
- ◆ Leur **nombre**, soit plusieurs milliers d'espèces.
- ◆ Leur **lieux de vie**, c'est-à-dire absolument PARTOUT.

On peut classer les bactéries selon divers types :

Les SAPROPHYTES	Les COMMENSALES	Les PATHOGÈNES
Ce sont des bactéries environnementales qui participent à la <u>décomposition des végétaux</u> .	Celles qui vivent en symbiose avec un hôte	Celles qui peuvent <u>infecter</u> un hôte et provoquer des maladies :(

Concernant les bactéries commensales, on en retrouve partout dans notre organisme. Par exemple, on a :

10¹⁴ bactéries dans le **CÔLON**

10¹² bactéries sur la **PEAU**

10¹⁰ bactéries dans la **BOUCHE et le PHARYNX**

Ce qui fait que nous sommes des êtres hybrides, car nous possédons à la fois des **cellules eucaryotes** (les nôtres) et des cellules **procaryotes** (les bactéries). D'ailleurs, nous avons en nous autant de cellules procaryotes que d'eucaryotes.

Les bactéries **commensales** constituent ce qu'on appelle la **flore commensale**, plus communément appelée microbiote. Celui-ci joue un rôle important dans :

- ◆ l'**IMMUNITÉ**, puisqu'elles vivent en symbiose avec nous (ce qui fait qu'on est capables de les tolérer) et stimulent notre système immunitaire
- ◆ l'**EFFET DE BARRIÈRE** qu'elles génèrent, elles inhibent l'implantation d'autres bactéries exogènes et participent à la **déplétion** des nutriments mais aussi à la **dégradation** des toxines
- ◆ la **DIGESTION** des aliments

Les trois grands types de bactéries sont tous **en communication** entre eux. En effet, toutes ces bactéries **échantent** entre elles des gènes et des outils génétiques, ce qui leur permet d'évoluer, de s'adapter et de développer de nouvelles fonctions.

✦ **QUELS SONT LES ÉLÉMENTS ESSENTIELS DE LA STRUCTURE DES BACTÉRIES ?**

La bactérie correspond à un être **unicellulaire** qui possède une structure simple, dépourvue d'organite. À l'intérieur d'une bactérie se trouve un **unique chromosome**, lequel n'est pas séparé du cytoplasme par une membrane nucléaire, mais aussi de l'**ADN extra-chromosomique** qui forme des **plasmides**, possédant une **forme circulaire**.

Une bactérie possède également :

- ◆ Une **PAROI CELLULAIRE**
- ◆ Parfois un **flagelle** et des **pili/fimbriae** (c'est la même chose)
- ◆ Une **MEMBRANE PLASMIQUE** qui correspond à une **barrière perméable sélective** qui est impliquée dans le transport des éléments nutritifs et des déchets mais aussi dans les processus métaboliques
- ◆ Des **ribosomes** participant à la **synthèse des protéines** (diapo schéma bactérie)

La **paroi cellulaire** est un composant essentiel de la bactérie : c'est elle qui va **définir sa forme** et qui va lui permettre de **résister aux pressions osmotiques**.

Si cette paroi n'existait pas, la bactérie **gonflerait** jusqu'à ce qu'elle **explose**. La forme de la bactérie donnée par la paroi est importante car c'est elle qui va nous permettre de la visualiser, ces éléments nous permettront de nous orienter vers le type de bactérie qu'on observe.

✦ **COMMENT S'INFECTE-T-ON PAR UNE BACTÉRIE ?**

On considère qu'il existe **deux façons** de s'infecter :

- ◆ Soit par les bactéries de son **PROPRE MICROBIOTE** : une bactérie localisée dans un microbiote bien précis peut se **déplacer** vers un microbiote inhabituel et causer une infection.

Deux petits cas cliniques pour illustrer :

☆ Des bactéries localisées dans les intestins comme la bactérie *E. coli* peuvent **se déplacer** et se retrouver dans la vessie. Cela cause alors une **cystite** qui entraîne des brûlures et qui nécessite de bien boire et parfois de prendre des antibiotiques.

☆ On sait que **20%** d'entre nous sont porteurs d'un germe qui s'appelle *Staphylococcus aureus*, notamment dans le rhinopharynx. Ainsi, si quelqu'un a une plaie à ce niveau-là et qu'il la touche en se mettant le doigt dans le nez (qui fait ça??? bref), il peut amener la bactérie vers la plaie et provoquer une **infection purulente**.

Ce type d'infection peut être favorisé par **certains actes de soin** et notamment par un **acte opératoire**.

- ◆ Soit par les bactéries de **L'ENVIRONNEMENT** : par ingestion d'eau ou d'aliments contaminés, inhalation d'aérosols, inoculation cutanée, muqueuse directe par la **salive** ou les

sécrétions sexuelles ou alors transcutanée par les **insectes**.

Schématiquement, il existe **deux** types de mécanisme d'infection :

◆ L'infection **SUPPURATIVE** dans laquelle la bactérie se trouve au contact d'un épithélium ou d'une muqueuse et va ensuite se **multiplier** et entraîner une **réaction inflammatoire**. Elle va alors **migrer**, parfois **envahir** le tissu voire même passer dans les vaisseaux sanguins, ce qui peut causer des infections graves.

◆ L'infection **TOXINIQUE** : dans ce cas on a une **adhésion**, une **colonisation** puis une **libération de toxines**, lesquelles seront responsables de toutes les manifestations de la maladie.

Certaines bactéries sont capables de coupler les deux mécanismes (sinon c'est pas drôle).

✚ **QUELLES SONT LES ÉTAPES DU DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE ?**

Toute la **problématique** dans la démarche diagnostique correspond à une étape souvent négligée mais pourtant essentielle : un **bon prélèvement**.

En effet, son résultat va **influencer le diagnostic et/ou le traitement** de la maladie, ce qui explique la nécessité de le faire dans des conditions **rigoureuses**.

Plus précisément, le prélèvement doit se faire **au site de l'infection** et ne doit pas être "tous azimuts" car le résultat pourrait de ce fait ne plus être informatif.

De plus, il doit être fait **avant toute antibiothérapie** (excepté dans les cas de **méningites** où l'urgence est de traiter le patient), **en quantité suffisante** et doit être **bien réalisé** afin d'éviter le risque de contamination par les flores. Enfin, les **règles de transport** des prélèvements doivent être également respectées.

Il existe en réalité une certaine **cinétique**, une séquence pour la démarche diagnostique qui doit être respectée.

☀ **CE QUI SE PASSE À J-0 :**

Cette séquence commence donc avec l'examen direct et la **coloration de GRAM** qui se fait à J-0. Cette coloration est importante car elle nous donnera une **orientation** sur le type de bactéries. Lors de cet examen, on recherche un **"flagrant délit"**, c'est-à-dire la présence de bactéries dans un prélèvement normalement stérile qui ne peut être **due qu'à une infection**, et non pas une contamination au laboratoire. Une fois l'examen direct réalisé, les prélèvements sont mis en culture sur différentes géloses.

La **coloration de GRAM** se fait en plusieurs étapes :

- ◆ D'abord, on réalise un **frottis** du prélèvement sur une lame
- ◆ On fixe le prélèvement, à l'alcool ou à la chaleur
- ◆ On recouvre la lame de **violet de Gentiane** qui colore **toutes les bactéries**, puis on y met du lugol pour fixer le violet
- ◆ On **décolore** à l'alcool jusqu'à ce qu'il n'y ait **plus de violet** : cette étape est **très**

importante pour différencier les bactéries **GRAM négatif (GRAM-)** des bactéries **GRAM positif (GRAM+)** parce que l'alcool dissout les graisses, lesquelles sont essentiellement présentes chez les bactéries GRAM-.

Ainsi, à ce stade, les **GRAM- sont incolores** tandis que les **GRAM+ vont rester violets** à cause de leur paroi épaisse qui résiste à l'alcool.

◆ On recolore à la **fuchsine** (qui donne une coloration **rose**) afin de pouvoir visualiser les bactéries GRAM-, les bactéries GRAM+ restant en violet

◆ Et pour terminer on observe la lame au microscope avec un grossissement x100, après l'avoir recouverte d'huile à immersion.

+++ Après coloration, les GRAM+ sont donc en violet et les GRAM- en rose +++

La différence entre une bactérie GRAM- et une bactérie GRAM+, en plus de nous aider à identifier les bactéries, vient de la structure de leur paroi.

Bactéries GRAM +	Bactéries GRAM -
<p>On a de l'extérieur vers l'intérieur :</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ un peptidoglycane, une molécule qui correspond à l'association d'<u>acides aminés</u> et de <u>sucres</u>, et qui n'est retrouvée que chez les bactéries (très épaisse chez les GRAM +) ◆ une membrane plasmique ◆ le cytoplasme 	<p>On a de l'extérieur vers l'intérieur :</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ une membrane externe qui contient des <u>structures protéiques</u> lesquelles forment des canaux appelés porines ◆ un peptidoglycane (très petit ici) ◆ une membrane plasmique ◆ le cytoplasme (tous les schémas sont dans le diapo <3)

La coloration de GRAM est donc essentielle pour savoir vers quel type de bactéries s'orienter. On peut néanmoins utiliser une **autre coloration** : celle de **May-Grunwald-Giemsa** (MGG pour les intimes). Elle est nécessaire pour caractériser les cellules et déterminer la formule des polynucléaires, des macrophages et des lymphocytes.

☀ **CE QUI SE PASSE À J-1 :**

À J-1, on observe, on analyse les cultures et on procède surtout à l'**identification** des bactéries par la méthode de **spectrométrie de masse**. On réalise ensuite, si nécessaire, un antibiogramme par diffusion en milieu gélosé.

La **spectrométrie de masse** est une technique qui fonctionne de façon assez simple : on prend une colonie puis on la place dans une plaque en métal qu'on va recouvrir d'une matrice. On met ensuite la plaque dans un spectromètre de masse appelé "**MALDI-TOF**" qui générera un **spectre protéique** qui sera, par la suite, comparé à une base de données. Cette méthode permet d'obtenir des résultats en **quelques minutes** et d'**affirmer** que tel spectre protéique obtenu correspond au spectre de telle bactérie.

D'un point de vue plus théorique, voici ce qui se passe au sein du **MALDI-TOF** : un laser est émis et vient "**taper**" une **cible**, ce qui provoque un **transfert d'énergie**. Les protéines se chargent alors

positivement et vont migrer en fonction du rapport entre la masse et la charge. Ainsi, les protéines avec une **petite masse et une charge élevée vont migrer très rapidement** et donner sur le spectre le **premier pic**, puisqu'elles atteignent le détecteur en premier. Les protéines à **masse et charge intermédiaires** donnent le **deuxième pic**, tandis que les protéines **plus lourdes et moins chargées** migrent lentement et donnent le **troisième pic**. On obtient alors plusieurs pics générés par les protéines bactériennes qui forment un spectre.

Le **MALDI-TOF** correspond à une innovation **utilisable en routine**, dans la mesure où elle réduit le délai de rendu de l'identification de 18 à 24h sur galerie à moins d'une minute, et elle correspond à une **démarche universelle** qui fonctionne quelle que soit l'espèce bactérienne considérée (avec cependant deux exceptions). Les autres avantages correspondent au fait que la manipulation soit **simple**, qu'elle peut se faire à **haut débit** et que le coût nécessaire à l'identification est **très modeste**.

Cependant, le **MALDI-TOF** possède également des **limites** : le coût de l'équipement reste élevé, il faut que la bactérie qu'on recherche soit dans la base de données, et la **limite de détection est basse** (10^5 cellules), ce qui implique que l'identification ne peut pas se faire directement à partir du prélèvement et qu'il faut donc faire pousser des colonies.

☀ **CE QUI SE PASSE À J-2 :**

Le **MALDI-TOF** présente cependant un problème : il n'est pas capable de distinguer certaines espèces bactériennes proches. Heureusement, cela ne concerne que deux cas :

◆ Entre *E. coli* et *Shigella sp.* : ces bactéries possèdent pratiquement le **même ADN**, mais ne produisent **pas les mêmes toxines**, et n'entraînent **pas la même pathologie**. *E. coli* correspond à une bactérie généralement **commensale**, tandis que *Shigella sp.* correspond **toujours à une bactérie pathogène**. La distinction entre les deux n'est recherchée que dans les cas d'infections intestinales et de réalisation de coprocultures. Dans ces cas, on identifie les bactéries avec l'**ancienne méthode**, en utilisant des galeries d'identification.

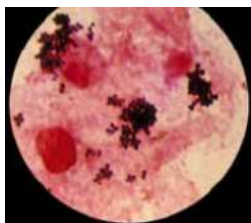
◆ Entre *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus oralis* ou *mitis* : alors que *Streptococcus pneumoniae* correspond à une **bactérie pathogène** responsable de la pneumonie, *Streptococcus oralis* et *mitis* sont des bactéries **souvent peu pathogènes** localisées dans les voies aériennes supérieures. Pour faire la différence, il existe un petit test assez simple : on ensemence les bactéries sur une gélose, puis on dépose dessus un **disque d'optochine**, molécule à laquelle seul *Streptococcus pneumoniae* est sensible. Si un **diamètre d'inhibition** se développe autour du disque, la bactérie correspond par conséquent à *Streptococcus pneumoniae*, sinon il s'agit de *Streptococcus oralis* ou *mitis*.

Ces deux tests correspondent à des **méthodes d'identification phénotypique**, réalisée à **J-2**. Le même jour, on va également lire l'antibiogramme, qui présente **plusieurs disques d'inhibition** autour des antibiotiques.

Dans tous les cas, il est important d'identifier l'espèce bactérienne mise en cause, parce qu'à **chaque espèce bactérienne** correspond un panel d'infections, un degré de virulence et un spectre de sensibilité aux antibiotiques (ce qui influencera le traitement).

✦ À QUELLE(S) ESPÈCE(S) DE BACTÉRIE(S) FAUT-IL PENSER SELON LE GRAM, L'HABITAT ET LE POUVOIR PATHOGÈNE ?

Nous allons maintenant voir des exemples d'identification de bactéries selon plusieurs éléments.



PREMIER CAS : Bactéries de morphologie **Cocci GRAM+** regroupées **en amas**

Nom & Genre d'Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (incluent 40 espèces)
Nom Courant	Staphylocoque Doré	Staphylocoque Blanc
Habitat	Ubiquitaires , en particulier peau et muqueuses , parfois dans l'environnement	Ubiquitaires , en particulier peau et muqueuses , parfois dans l'environnement
Pouvoir Pathogène	Suppurations, infections toxiques	Très rare , quelques infections sur matériaux uniquement

Notez qu'on est tous porteurs de staphylocoques blancs à coagulase négative.

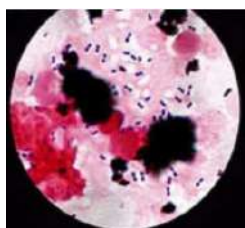


DEUXIÈME CAS : Bactéries de morphologie **Cocci GRAM+** **en chaînettes**

Nom & Genre d'Espèce	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
Nom Courant	Streptocoque du groupe A	Streptocoque du groupe B	Streptocoque du groupe ACG... ou α-hémolytique
Habitat	Pharynx	Muqueuses digestive et génitale	Pharyngée / Digestive
Pouvoir Pathogène	Angine et complications, infections cutanées	Infections maternofoétales, endocardite	Rares infections (commensales)

Le *Streptococcus pyogenes* est en particulier capable de donner des **angines blanches** mais aussi des **érysipèles** parfois graves. Pour vérifier sa présence chez un patient qui consulte pour un mal de gorge par exemple, le médecin généraliste va effectuer un **prélèvement de gorge** puis faire un test. Si le test est **positif**, on peut alors **traiter le patient avec de l'AMOXICILLINE** (à laquelle *Streptococcus pyogenes* est toujours sensible). S'il est **négatif**, l'origine de la douleur est probablement **virale** et donc on ne la traite pas avec des antibiotiques.

Bien que le *Streptococcus agalactiae* soit d'ordinaire trouvé dans le **tube digestif** de façon **commensale**, il peut coloniser la muqueuse vaginale, ce qui peut occasionner des **infections materno-fœtales**. C'est pourquoi il est d'ailleurs important de faire un dépistage chez les femmes enceintes, en particulier lors du **dernier trimestre**, et si le *Streptococcus agalactiae* est effectivement détecté, on traitera la patiente par **AMOXICILLINE**.



TROISIÈME CAS : Bactéries de morphologie Cocci GRAM+ en diplocoques

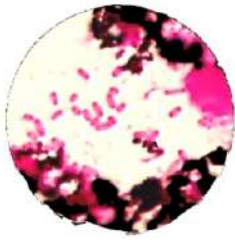
Nom & Genre d'Espèce	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Nom Courant	Pneumocoque
Habitat	Voies respiratoires
Pouvoir Pathogène	Otites (chez les enfants avec un certain risque contagieux), pneumonies et méningites



QUATRIÈME CAS : Bactéries de morphologie Cocci GRAM- en diplocoques

Nom & Genre d'Espèce	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Autres Neisseria spp.</i>
Nom Courant	Méningocoque	Gonocoque	/
Habitat	Pharynx	Muqueuses génitale et pharynx	Voies aériennes supérieures
Pouvoir Pathogène	Méningites, méningo-encéphalites	Urétrites, infections sexuellement transmissibles	Non Pathogènes

La *Neisseria meningitidis* correspond à une “**impasse évolutive**” qui peut de temps à autre **devenir virulent** et provoquer des méningites ou des méningo-encéphalites. Elle est **portée par 5% de la population**, et de façon plus générale seul l'Homme en est porteur.



CINQUIÈME CAS : Bactéries de morphologie **Bacille GRAM-**

Nom & Genre d'Espèce	Famille des <i>Enterobacteriaceae</i> : <i>E. coli</i> , <i>Citrobacter spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Serratia spp.</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Shigella spp.</i> (aled)
Nom Courant	Pour <i>E. coli</i> : colibacille
Habitat	Intestins
Pouvoir Pathogène	Infections digestives, urinaires, biliaires, méningées, pulmonaires et néonatales , fièvre typhoïde , toxi-infections alimentaires , dysenterie

Notez que les salmonelles peuvent être responsables de diarrhées.

FIN de cette première fiche!!! j'espère qu'elle vous plait!! (hésitez pas à me faire un retour si jamais)
j'ai pas mis beaucoup de petites annotations, je les réserve pour ma fiche complète (qui est encore plus belle) que je vous sortirai plus tard dans le semestre (vous avez mes commentaires dans la vidéo de toute façon :D)
gros bisous et bon courage pour ce second semestre (vous allez kiffer) <3