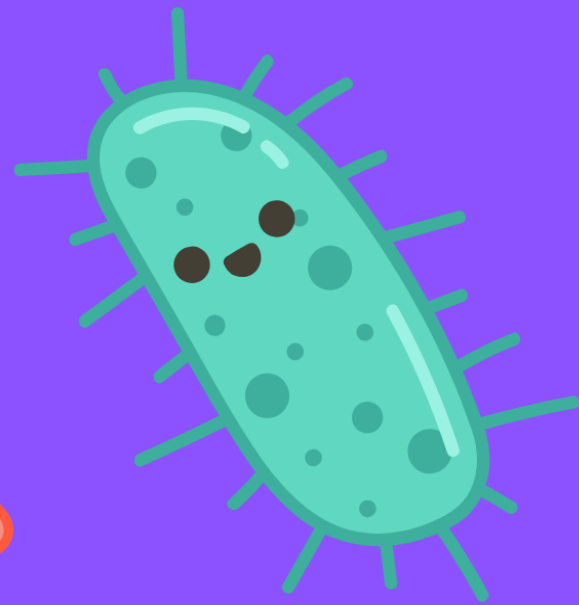
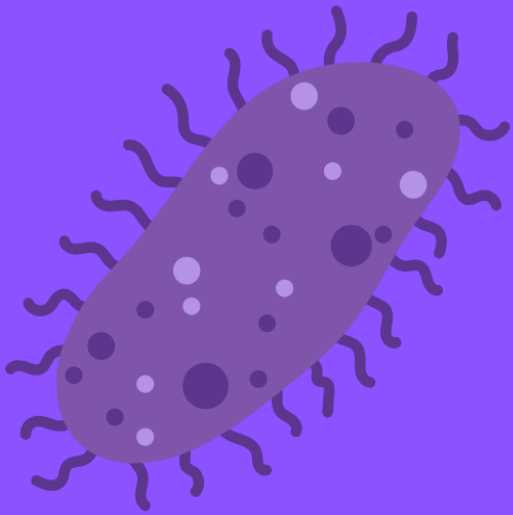


# BACTÉRIOLOGIE

## STRUCTURE, CLASSIFICATION ET IDENTIFICATION



## I) Généralités sur le monde des bactéries

### A- Le monde bactérien :

Les premières bactéries ont vu le jour il y'a 3,5 milliards d'années (alors que les Hommes existent depuis 3,5 millions d'années) ce qui fait 1000x plus longtemps que les Hommes

Les bactéries sont des organismes hautement adaptables dit « tout terrain » par :

- **Plasticité du génome** (éléments mobiles), qui permet de s'adapter aux différentes niches écologiques
- **Leur nombre** (milliers d'espèces)
- **Lieux de vie** (partout)

On peut les classer en 3 types :

- **Saprophytes** : décomposent les végétaux/ matières organiques en matières minérales, présentent dans air/eau/sol ( $10^9$  bactéries/g de terre)
- **Commensales** : en symbiose avec un hôte
- **Pathogène** : infectent/ provoquent des maladies

Les bactérie commensales, flore commensale, microbiote sont partout dans l'organisme humain. Elles sont plus nombreuses dans l'organisme que les cellules eucaryotes, ce qui fait de l'Homme un être hybride.

### Quelques chiffres ++



$10^{14}$  bactéries dans le colon

$10^{12}$  bactéries sur la peau

$10^{10}$  bactéries dans la bouche+Pharynx

Ces bactéries vont jouer un rôle symbiotique, elles jouent un rôle important :

- **Système immunitaire** (elle le stimule)
- **Effet barrière** (inhibe l'implantation d'autres bactéries exogènes et dégradent des toxines)
- **Digestion**

La présence de ce microbiote va avoir 3 conséquences majeurs pour la pratique bactériologique :

- 1- **Impose une asepsie rigoureuse** pour réaliser un prélèvement dans un site stérile. Cela est d'autant plus important pour les sites comme le LCR, le sang et les os.
- 2- Il constitue un **réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques**.
- 3- Nécessite de trouver une **stratégie pour rechercher une bactérie pathogène dans le microbiote** (ex : stratégie de sélection, pour rechercher une bactérie dans une coproculture = culture de selles).

Les bactéries commensales, saprophytes et pathogènes sont toutes en communication et échangent des gènes et outils génétiques. Cela leur permet de s'adapter et de développer de nouvelles fonctions (ex : gènes de résistance aux antibiotiques, gènes de virulence).

## **B- Structure des bactéries :**

La bactérie est un être unicellulaire à structure simple et dénué d'organites, elle est composée :

### → **Paroi cellulaire**

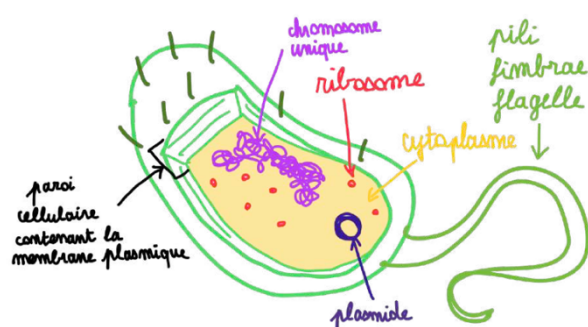
- Définie la forme et la structure de la bactérie, elle peut être ronde (coccus), allongée, spiralée... La forme va nous permettre de nous **orienter+++** vers le type de bactérie (ex : cocci en amas = staphylocoques).
- Protège la bactérie face à la lyse par pression osmotique grâce à son **peptidoglycane**, qui sans elle, gonflerait jusqu'à exploser.

### → **Membrane plasmique**

- Barrière perméable sélective.
- Assure le transport des éléments nutritifs/déchets ainsi que les processus métaboliques.

### → **ADN chromosomique et extra-chromosomique**

- ADN chromosomique n'est pas limité par une membrane, il baigne dans le cytoplasme
- ADN extra-chromosomique forme des plasmide (=ADN circulaire)



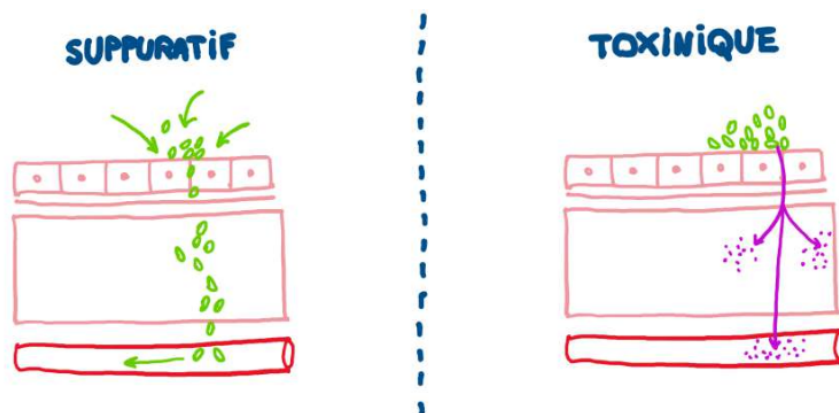
### C- Les voies d'infection par les bactéries :

Il existe 2 façons de s'infecter :

- **Par son propre Microbiote:** des bactéries du microbiote se déplacent
  - ex: Escherichia coli qui se déplace dans la vessie provoquant des cystites.
  - ex: Staphylococcus aureus présent dans le pharynx chez 20% des gens.
- **Par l'environnement :** ingestion eau/ aliments contaminés, aérosols, inoculations cutanées, muqueuse directe par salive/ sécrétions sexuelles, transcutanée par insectes.

Et aussi 2 mécanismes d'infection :

- **SUPPURATIVE:** la bactérie se multiplie et migre/envahit les tissus puis passe dans les vaisseaux sanguins provoquant l'infection elle-même.
  - ex: Staphylococcus aureus qui donne des furoncles
- **TOXINIQUE:** la bactérie adhère à l'épithélium mais le traverse pas: en revanche elle libère des toxines qui traversent l'épithélium et qui provoquent l'infection.
  - ex: Clostridium tetani qui donne le tétanos



*Certaines bactéries peuvent combiner les deux mécanismes d'infection.*

### D- Démarche du diagnostic en bactériologie

Avant toute démarche, on retrouve une problématique essentielle : faire un **BON PRELEVEMENT** en respectant une cinétique de démarche diagnostic (J0, J1, J2).

Les critères d'un bon prélèvement sont les suivants :

- Au site de l'infection et en quantité suffisante
- Avec respect des règles de prélèvement et de transport
- AVANT antibiothérapie SAUF si cas de méningite
- Condition d'asepsie rigoureuse

Une fois le prélèvement réalisé, on va procéder à l'examen direct après coloration de GRAM. Cet examen va nous permettre de donner une **ORIENTATION** sur le type de bactérie (PAS UNE IDENTIFICATION svp) +++. *L'identification n'est pas possible car la coloration de GRAM n'est qu'une observation visuelle ce qui ne permet pas avec certitude de donner une identification).*

### ZOOM sur la démarche :

#### **J0 : Examen Direct**

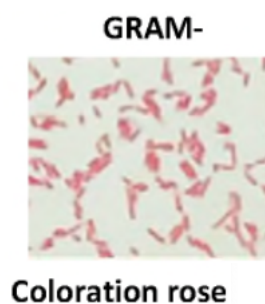
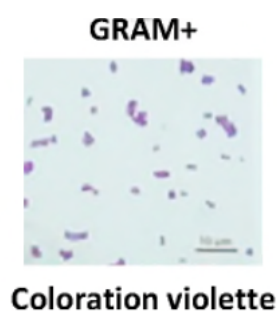
On réalise une coloration de GRAM puis on observe au microscope optique (grossissement x100). Il est possible d'utiliser une coloration de May-Grunwald-Giemsa (permet de caractériser les cellules et déterminer la formule des polynucléaires, macrophages et lymphocytes).

- ➔ **Si positif** : Il y'a une forte présomption d'infection si monomicrobien. Il nous donne une ORIENTATION sur le type de bactérie (PAS UNE IDENTIFICATION) en fonction de la coloration, morphologie et du mode de regroupement. Permet aussi une orientation de la thérapie.

Pendant cet examen on est à la recherche du « *flagrant délit* » c'est à dire la présence de bactéries dans un prélèvement normalement stérile (sang, LCR, os...), et qui peut être due à une infection.

#### Étapes coloration de GRAM : +++

- **Frottis** : prélèvement sur une lame
- **Fixation** : Soit à l'alcool soit à la chaleur
- **Coloration au violet de Gentiane** : Ça va colorier toutes les bactéries
- **Lugol** : Fixe le violet
- **Décoloration à l'alcool** : Les bactéries GRAM- deviennent incolores alors que les bactéries GRAM+ restent violettes (car elles possèdent une paroi épaisse)
- **Recoloration à la fuchsine** : Les GRAM- devenu incolore se retrouve colorer en rose alors que les GRAM+ restent violettes
- **Observation au microscope** : Sur une lame avec un grossissement x100 pour donner une orientation.



## J1 : Identification par spectrométrie de masse

On réalise cette fois-ci l'IDENTIFICATION de la bactérie grâce à l'analyse des cultures par spectrométrie de masse. L'appareil de spectrométrie est appelé MALDI-TOF. D'un point de vue fonctionnement, on utilise une plaque en métal recouverte de la colonie de bactérie et d'une matrice protéique. Le MALDI-TOF va générer un spectre protéique qui permettra une comparaison avec une base de données en seulement quelques minutes.

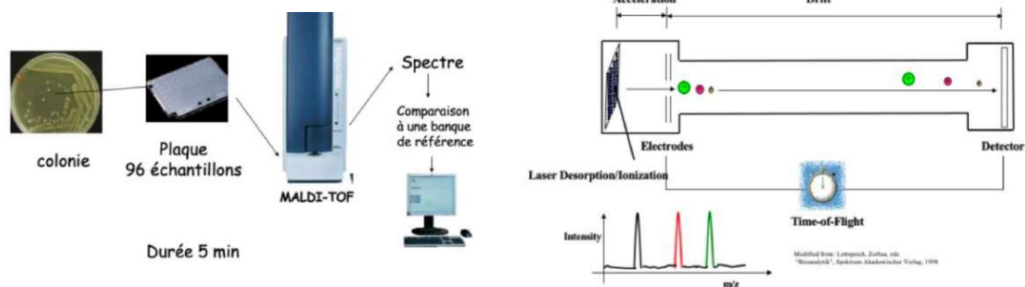
### Déroulement de J1 (en 5min) :

- Dépôt de colonie sur une plaque de 96 échantillons -> recouvrement plaque
- Passage dans un spectromètre de masse (MALDI TOF) -> génération spectre
- Comparaison du spectre à une banque de référence -> IDENTIFICATION

Le MALDI-TOF est utilisé en routine, possède une démarche universelle (peut importer l'espèce bactérienne) et rapide (*en 1min comparée à l'identification sur galerie qui dure 2h*). De plus, le coût d'identification est très modeste.

Mais nous retrouvons aussi des limites :

- Une limite de détection de base de  $10^5$  cellules pour fonctionner (*donc seulement à partir d'une colonie et non directement à partir du prélèvement car pas assez*).
- Nécessite une base de données suffisamment riche pour comparer les bactéries.
- Coût d'équipement élevé.
- Ne permet **pas toujours** de différencier les espèces proches.



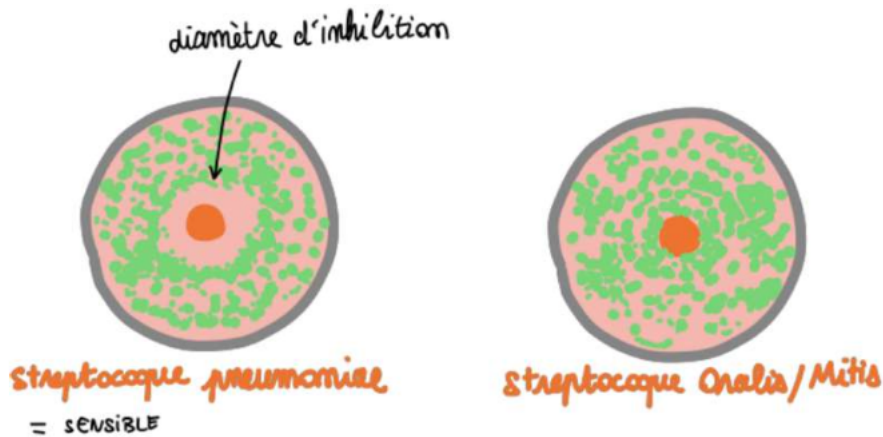
## J2 : Identification spectrométrie de masse & lecture de l'antibiogramme

Le MALDI-TOF n'est pas capable de distinguer certaines espèces bactériennes proches. Nous allons en voir deux exceptions :

- ➔ **E. coli** et **Shigella sp** : Elles ont presque le même ADN mais ne produisent pas les mêmes toxines et donc ne donnent pas les mêmes pathologies = E.Coli est commensale et Shigella sp est pathogène. Pour les distinguer en cas d'infections intestinales/ coprocultures, on utilise une **galerie d'identification phénotypique**.



- **Streptococcus pneumoniae** et **Streptococcus oralis ou mitis** : La première est responsable de la pneumonie alors que la deuxième est peu pathogène et présent souvent dans les voies aériennes supérieures. On utilise un **disque d'optochine++** à laquelle seul le Streptococcus pneumoniae est sensible.



Pour finir, c'est aussi à J2 que l'on va faire la lecture de l'antibiogramme avec le résultat de la sensibilité de la bactérie face aux antibiotiques testés (*disque d'inhibition*).

Tut 'récap :

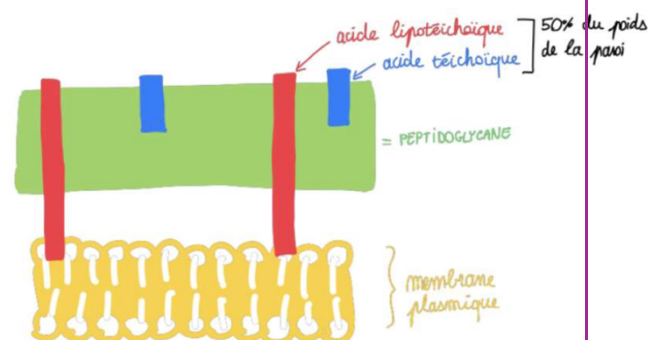
- J0 : Prélèvement, coloration GRAM, Examen direct, **Orientation**, Mise en culture
- J1 : Spectrométrie de masse MALDI-TOF, **Identification**, Préparation antibiogramme
- J2 : Lecture antibiogramme & Identification phénotypique (2 exceptions)

### Mais qu'est-ce qui différencie les bactéries GRAM- et GRAM+?

→ **GRAM+** : De l'extérieur vers l'intérieur

**Paroi peptidoglycanes** : C'est un assemblage AA et de sucres **très épaisse**. Elle contient des **acides téichoïques** (présent seulement chez les bactéries GRAM+, 2<sup>ème</sup> composant majeur de la paroi et ont parfois un pouvoir antigénique) ainsi que des acides lipotéichoïques (amarrent paroi à la membrane plasmique).

**Membrane plasmique** : Phospholipides + Protéines intrinsèques.



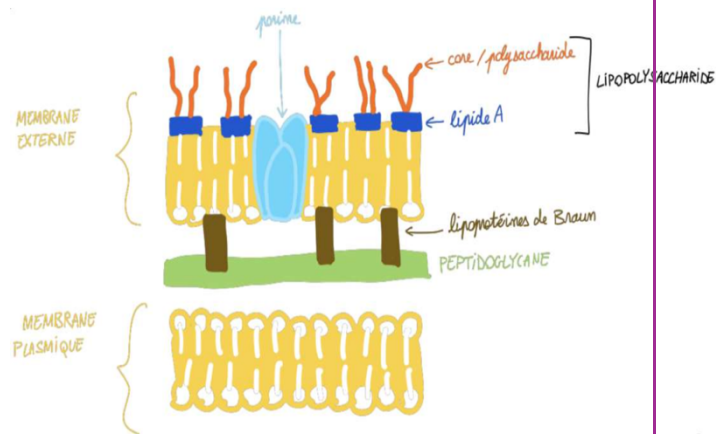
→ **GRAM-** : De l'extérieur vers l'intérieur

**Membrane plasmique** : Bicouche phospholipidique contenant des protéines intrinsèques.

**Paroi peptidoglycane** : Elle est plus fine que chez les Gram+ et se retrouve ancrée à la membrane externe par la lipoprotéine de Braun (lipopeptide jouant un rôle dans la cohésion et la stabilisation de la paroi).

**Membrane externe** : Composée des porines, des protéines intrinsèques ainsi que de **lipopolysaccharide** (LPS) formé de :

- Lipide A
- Core (chaînes latérales plus ou moins longues qui constituent l'antigène somatique jouant un rôle dans le choc septique)
- Endotoxine

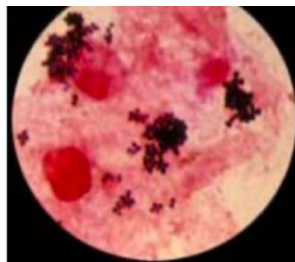


## **E) Identification et caractéristiques des bactéries**

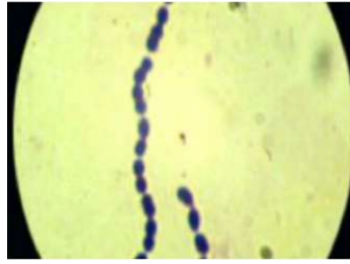
Depuis tout à l'heure, je vous parle de bactérie GRAM+ et GRAM-. Nous allons voir maintenant des exemples de bactéries ainsi que leur habitat et leur pouvoir pathogène.

### **1. Bactéries GRAM+**

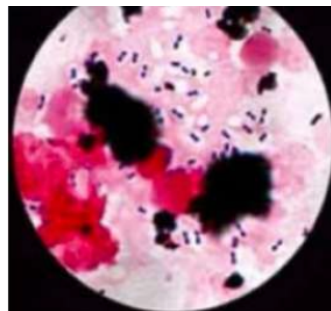
→ **Cocci en amas** :



Nom/ genre d'espèce	<b>Staphylococcus aureus</b>	<b>Staphylococcus epidermis</b> (40 espèces)
Nom courant	Staphylocoque Doré	Staphylocoque Blanc
Habitat	Ubiquitaire (surtout peau et muqueuses, parfois environnement)	Ubiquitaire (surtout peau et muqueuses, parfois environnement)
Pouvoir pathogène	-Suppuratif (furoncles) -Toxinique	Très rare, quelques infections sur matériaux

→ **Cocci en chaînette :**

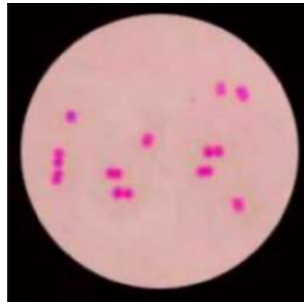
Nom/ genre d'espèce	<b>Streptococcus pyogenes</b>	<b>Streptococcus agalactiae</b>	<b>Streptococcus spp.</b>
Nom courant	Groupe A	Groupe B	Groupe ACG ou alpha-hémolytique
Habitat	Pharynx	Muqueuses digestives et génitales	Pharyngée/ digestif
Pouvoir pathogène	-Angines -Complications infections cutanées	-Infections maternofoetales -Endocardite	Rares infections

→ **Cocci en diplocoques, courtes chainettes :**

Nom/ genre d'espèce	<b>Streptococcus pneumoniae</b>
Nom courant	Pneumocoque
Habitat	Voies respiratoires
Pouvoir pathogène	-Otites chez l'enfant -Pneumonies -Méningites

## 2. Bactéries GRAM- :

→ **Cocci en diplocoque, grain de café :**



Nom/ genre d'espèce	<b>Neisseria meningitis</b>	<b>Neisseria gonorrhoeae</b>	<b>Autres Neisseria spp.</b>
Nom courant	Méningocoque	Gonocoque	X
Habitat	Pharynx	-Muqueuses génitales -Pharynx	Voies aériennes supérieures
Pouvoir pathogène	-Méningites -Méningo-encéphalites	-Urétrites -IST	NON pathogènes

➤ **Méningocoque :** Porté par 5% de la population, seul l'Homme en est portable.

→ **Bacille :**



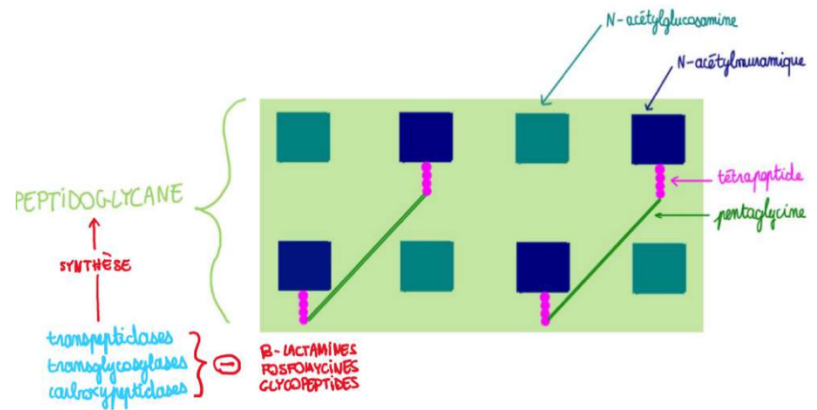
Nom/ genre d'espèce	<b>Famille des Enterobacteriaceae: E. Coli, Citrobacter spp., Klebsiella spp., Enterobacter spp., Proteus spp., Serratia spp., Salmonella spp., Shigella spp.</b>
Nom courant	Pour E. coli = colibacille
Habitat	Intestins
Pouvoir pathogène	-Infections digestives, urinaires, biliaires, méningées, pulmonaires, néonatales -Fièvre typhoïde, toxi-infection alimentaire, dysenterie

## II- Caractérisation structurale des bactéries :

### A) Généralité

#### → Le peptidoglycane

Le peptidoglycane (=muréine ou encore mucopeptide), c'est un polymère de chaînes linéaires de **N-acétyl glucosamine** et **acide N-acétyl muramique (NAM)** : c'est un réseau de sucres et d'acides aminés.



Elles sont liées entre elles au niveau des NAM par des **tétrapeptides** (courtes chaînes peptidiques reliées entre eux par transpeptidation entre D-Ala d'une chaîne et le L-Lys de l'autre chaîne).

*Il est important de connaître cette structure car c'est la **CIBLE DES ANTIBIOTIQUES**. ++*

La biosynthèse du peptidoglycane s'effectue tout d'abord dans le cytoplasme avec des précurseurs générant des sucres et des acides aminés. Ils subissent ensuite une maturation dans la membrane plasmique puis s'insèrent dans la paroi en cours de formation et de dégradation. L'insertion dans la paroi est rendue possible grâce à des enzymes : **Transpeptidase**, **Transglycosylase**, **Carboxypeptidase**. (Les antibiotiques viennent inhiber la synthèse du peptidoglycane en **bloquant** ces enzymes, ce qui impacte la forme de la bactérie qui se gonfle et meurt).

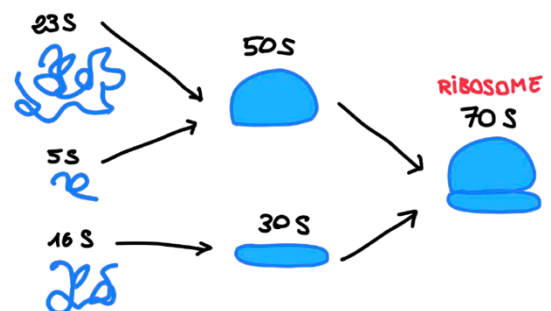
Il existe 3 types d'antibiotiques capables de bloquer la synthèse du peptidoglycane :

- **FOSFOMYCINES**: agissent sur les précurseurs en inhibant la pyruvyl transférase.
- **GLYCOPEPTIDES**: bloquent l'élongation des peptidoglycanes.
- **BÉTA-LACTAMINES**: inhibent les transpeptidase, transglycosylase, carboxypeptidase.

#### → L'ARN ribosomal (ARNr/rRNA)

Dans les bactéries ce sont les ribosomes qui s'occupent de la synthèse des protéines.

Le ribosome est composé de 3 ARN ribosomiques (ARNr) le **23S**, le **5S** et le **16S** (détaillé juste après). Le « S » signifie « Svedberg » : c'est une unité de mesure pour le coefficient de sédimentation.



Ces ARNr vont former des sous-unités : 23S et 5S forment la sous-unité 50S, et 16S forme la sous-unité 30S. L'association de ces deux sous-unités forme le ribosome **70S**.

### Récap ++

- 23s+5s = 50s
- 16s = 30s

### → ARN Ribosomal 16S

L'ARNr 16S est **UNIVERSELLE** chez les procaryotes, et permet ainsi de retrouver les liens de parenté entre les espèces.

Elle est composée d'une **succession de séquences à vitesse d'évolution** variable avec des séquences : **conservées, variables et hypervariables**. Cela nous permet de savoir à quelle espèce appartient une bactérie.

Les séquences conservées de l'ARNr 16S vont être intéressantes car elles vont nous permettre d'**hybrider des amorces et d'amplifier des gènes** de n'importe quelle bactérie). De ce fait, l'amplification et le séquençage de ces gènes sont **UNIVERSELS**.

Ces amorces universelles nous permettent également de réaliser des hybridations in situ avec des ondes fluorescentes. La quantité de ribosomes disponibles dans chaque bactérie est importante puisqu'elle va nous permettre de visualiser les bactéries.

La banque d'ARNr 16S correspond à la **plus grande banque de séquences communes avec plus de 200 000 séquences**.

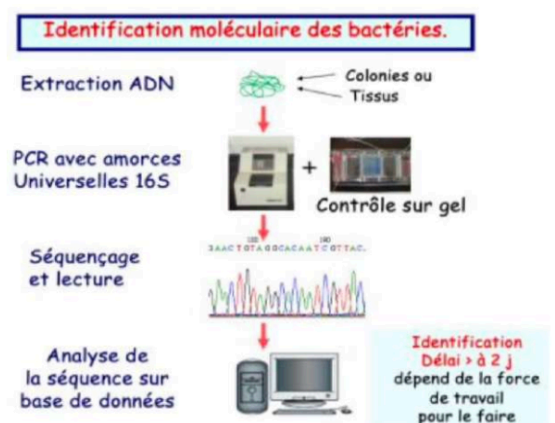
La découverte de cette ARN on la doit à **Carl Woese**, qui en comparant différentes séquences entre d'autres bactéries, a pu remarquer la présence de séquences conservées et différentes. Ainsi il a établi un arbre phylogénétique en comparant les séquences entre elles.

Ainsi on a décidé de séparer les eubactéries (comptant les bactéries commensales et pathogènes) des eucaryotes et des archées. Cependant l'origine de la vie demeure incertaine.

### Identification moléculaire par séquençage ARNr 16S

L'identification moléculaire fonctionne de la méthode suivante :

- Extraction ADN à partir d'une colonie ou prélèvement
- PCR avec amorce **UNIVERSELLES** 16S
- Séquençage/Lecture
- Analyse de la séquence sur la base de données -> **IDENTIFICATION** bactérie



Indication :

- Pour **identifier** une bactérie non reconnue par spectrométrie
- Bactéries **non cultivables** sur milieux de culture habituels
- **Culture négative** après un traitement antibiotique pour s'assurer de l'absence d'une bactérie donnée
- Dans un **prélèvement considéré stérile** sans microbiote, à priori mono bactérien (ex : LCR, liquide articulaire, valve cardiaque)

*Dans les autres cas (quand c'est polymicrobien), on utilise plutôt la spectrométrie de masse qui est plus efficace et moins coûteuse.*

## **B) Plasticité du génome bactérien :**

Cette notion de **plasticité** concerne l'ADN chromosomique et l'ADN extra-chromosomique (plasmide). Elle est rendue possible par 2 mécanismes :

- **Par mutations aléatoires :**

Lors de la réplication de l'ADN chromosomique et plasmidique on retrouve une fréquence de **10\*6 à 10\*7 mutations aléatoires non corrigées**. Ces mutations vont avoir un impact dans la population car elles vont exercer une **pression de sélection** : notamment si la mutation touche la cible des antibiotiques. En effet ces mutations peuvent offrir une résistance aux antibiotiques.

- **Par acquisition d'un nouveau matériel génétique :**

La bactérie va pouvoir recupérer de l'ADN provenant de l'extérieur mais aussi elle a la possibilité de recupérer de l'ADN par transfert de gènes plasmidiques ou chromosomiques d'une bactérie à l'autre par 3 mécanismes :

- Transformation
- Transduction
- Conjugaison

Mais le plasmide c'est quoi finalement ?

Il s'agit d'un ADN circulaire superenroulé, extrachromosomique, localisé dans le cytoplasme de la bactérie. En général de petite taille, son cycle de réplication est indépendant de l'ADN chromosomique.

Elle joue un rôle important dans la diversité des gènes. Il contient des gènes métaboliques et cataboliques, de production de toxines et de résistance aux antibiotiques.

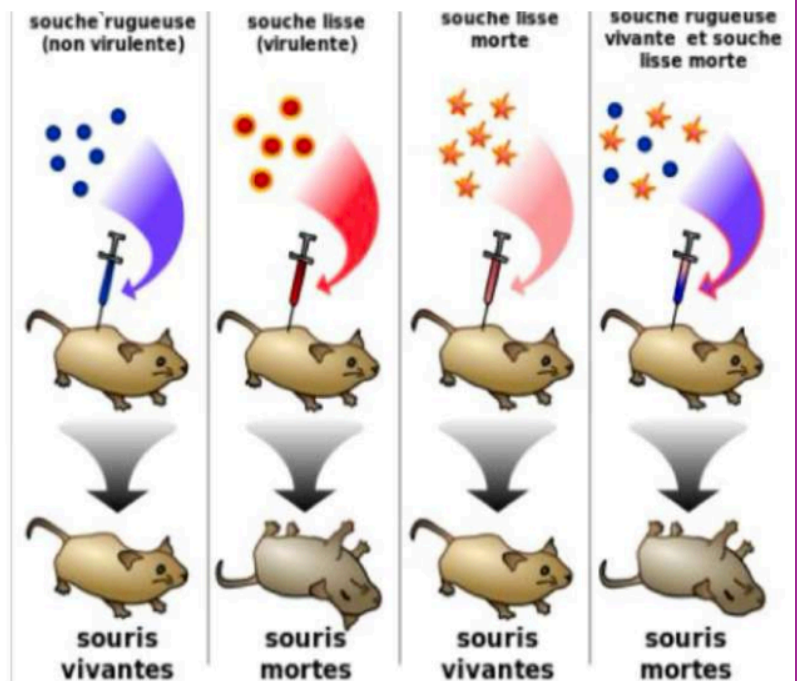
### **A) Transformation**

**Def : Permet le passage d'ADN depuis le milieu extérieur vers la bactérie ++.** Ce mécanisme a été mis en avant par Frederick Griffith en 1928 (*avant la découverte de l'ADN*).

Expérience de Griffith :

→ Injection de différentes souches de *Streptococcus Pneumoniae* à des souris :

- Une souche rugueuse non virulente -> Souris reste vivante
- Une souche lisse virulente -> Souris meurt
- Une souche lisse tuée par chaleur -> Souris reste vivante
- Une souche rugueuse préalablement mélangée à une souche lisse tuée par chaleur -> Souris meurt



En conclusion, il y'a quelque chose qui est capable de passer de la souche lisse détruite à la souche rugueuse et qui lui confère le caractère virulent.

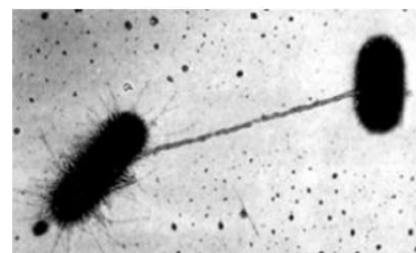
## B) Transduction

**Déf : Transmission par l'intermédiaire d'un virus bactérien appelé bactériophage ++.** Le virus (=bactériophage) se fixe sur une bactérie et infecte, comme une seringue, son ADN dans la cellule

- **Cycle lytique** : le bactériophage se reproduit et détruit la bactérie pour libérer ses clones. Cependant chaque clone peut récupérer un morceau de l'ADN de la bactérie.
- **Cycle lysogénique** : le bactériophage s'intègre dans le chromosome et reste dormant. À ce moment il rapporte à la bactérie de l'ADN issu des précédentes bactéries infectées et qui peut coder pour de nouveaux caractères.

## C) Conjugaison

**Déf : Se déroule entre une bactérie mâle et une femelle par l'intermédiaire d'un pilus sexuel ++.** Au sein de ce pilus sont échangés les fragments ADN, les échanges sont temps-dépendant.



### C) Classification des bactéries :

L'**espèce** correspond à l'unité fondamentale de la classification.

La **souche** correspond à une sous-division de l'espèce.

Un **clone** correspond à la population descendant d'une même souche.

Pour que deux souches appartiennent à la même espèce elles doivent respecter deux critères :

> **Critère Phénotypique** : distinct des autres espèces

> **Critère Génotypique** : qui correspond à une hybridation ADN/ADN  $\geq 70\%$

En réalité ces deux critères commencent à être abandonnés de nos jours.

Maintenant on utilise plutôt des **comparaisons de séquences génomiques complètes** avec une identité moyenne  $\geq 95\%$ .

Ainsi la classification des bactéries est devenue **phylogénétique** et se base sur le séquençage de l'ARN 16S.

La **nomenclature** des bactéries correspond à l'ensemble des règles qui régissent l'attribution d'un nom à chaque taxon distinct : elle est **universelle et hiérarchique**.

Le nom d'une bactérie comprend un nom de **genre** (qui commence par une majuscule), et un nom **d'espèce** (tout en minuscule).

Domaine	Ex. : <i>Bacteria</i>
Règne	<i>Procaryotae</i>
Phylum	
Classe	<i>Schizomyctes</i>
Ordre	<i>Micrococcales</i>
Famille	<i>Micrococcaceae</i>
Genre	<i>Staphylococcus</i>
Espèce	<i>S. aureus</i>

Ex : *Staphylococcus aureus*.

*Dédi à ceux à qui je devais une dédi...*

*Mention spéciale à Thomas T, comme on dit jamais 2 sans 3 (attention homme dangereux se méfier de lui)*