



Structure, classification et identification

Bactériologie 1



CONSTITUTION MONDE BACTÉRIEN

- Apparition bactéries: 3,5 MILLIARDS d'années
- Apparition Hommes: 3,5 MILLIONS d'années

↪ 1000

- Organismes hautement adaptable = « tout-terrain »
 - Plasticité du génome
 - Partout
 - Plusieurs millier d'espèces



On classe les bactéries selon 3 types:

01

SAPROPHYTES

Retrouvées dans
l'environnement: air, eau, sol

02

COMMENSALES

En symbiose

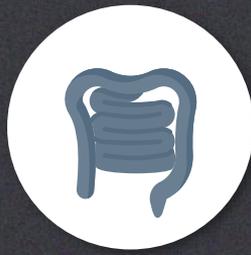
03

PATHOGÈNES



Toutes ces bactéries
sont en communication
et échangent des gènes
= ADAPTATION





Les bactéries commensales

Colon: 10^{14}

Peau: 10^{12}

Bouche/ pharynx: 10^{10}

Cela fait de nous des êtres **HYBRIDES**, Eucaryotes et procaryotes



La flore commensales

Elle a différents rôles:

- **IMMUNITÉ**: elle nous stimule
- **BARRIÈRE**: elle inhibe l'implantation d'autres bactéries
- **DIGESTION**

—> Cela va avoir des conséquences importantes sur le
prélèvement !!!

3 Conséquences sur le prélèvement:

ASEPSIE RIGoureuse

Surtout si c'est un site stérile
comme le LCR, l'os, le sang



STRATÉGIE DE SÉLECTION

Quand on cherche un pathogène dans
la microbiote, il faut avoir une
stratégie de sélection: par exemple
dans les selles avec une coproculture



Conséquences

RÉSERVOIR DE GÈNES

Notamment des gènes de
résistances



Structure des bactéries:

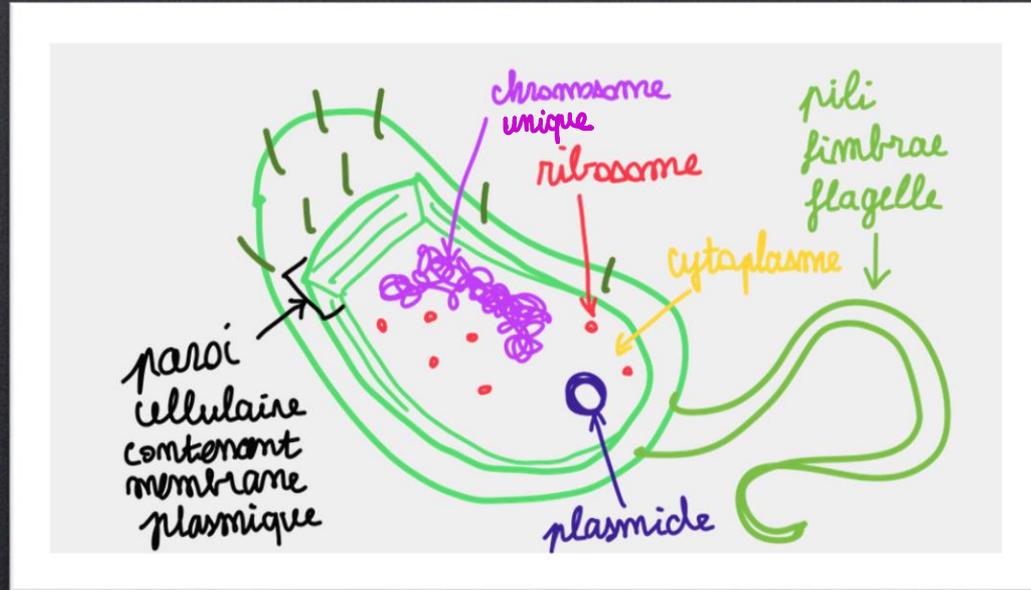
- Unicellaire

- Pas d'organites ^{mais ribosomes}

- Plasmide = ADN extra chromosomique circulaire

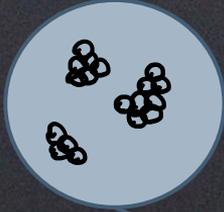
- Paroi = permet résistance pressions osmotiques ^{délimit FORME}

- Membrane plasmique = barrière perméable sélective
↳ permet nutrition + métabolisme

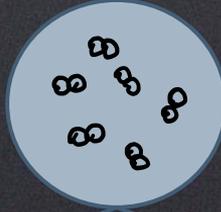


Les différentes formes de parois:

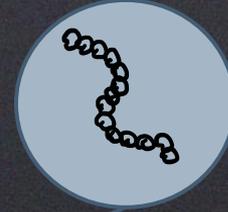
COCCI EN AMAS



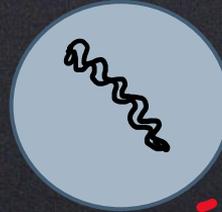
COCCI EN DIPLOCOQUE



COCCI EN CHAINETTE



BACILLÉ



SPIRALLÉ



Au laboratoire en pratique on observe les différentes formes au Microscope Optique MO.

Ces différentes formes vont nous **ORIENTER** +++ vers un type de bactérie, et NON PAS IDENTIFIER



2 Façons de s'infecter:

- **AVEC NOTRE PROPRE MICROBIOTE:** les bactéries de notre microbiote se déplacent
 - **E. Coli** passe des intestins à la vessie et provoque une cystite, notamment chez les femmes
 - 20% de la population porte des **Staphylocoques aureus** (dorés) dans leur rhino-pharynx: infection possible en cas de contact avec une plaie
- **AVEC L'ENVIRONNEMENT:** eau, aliments, aérosols, inoculation cutanée, muqueuse directes (salive, sécrétions sexuelles, transcutané via insecte)



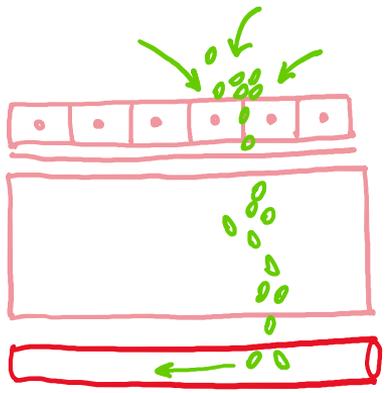
2 mécanismes d'infection:

- **SUPPURATIVE:** la bactérie au contact de l'épithélium migre/ envahit le tissu et passe dans le sang = la bactérie cause l'infection
 - **Staphylocoque aureus** qui donne des furoncles
- **TOXINIQUE:** adhésion de la bactérie à l'épithélium puis libération de toxines = la toxine cause l'infection
 - **Clostridium tetani** qui donne le tétanos

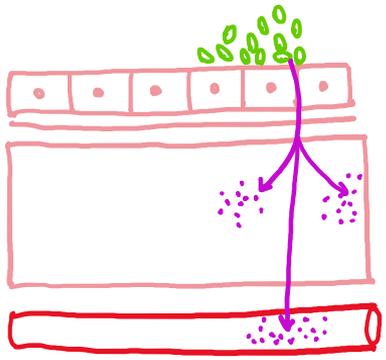


→ Certaines bactéries peuvent faire les 2 = *staphylocoque aureus*

SUPPURATIF



TOXINIQUE





Diagnostic bactériologique:

- IL FAUT UN BON PRÉLÈVEMENT++
- ON RESPECTE UNE CINÉTIQUE DE DÉMARCHE DIAGNOSTIC++
 - J0
 - J1
 - J2

QU'EST-CE QU'UN BON PRÉLÈVEMENT?

SAUF

MÉNINGITE++

On traite avant
dans ce cas

Pour éviter
contamination

**Au site de
l'infection**



**Avant
antibiothérapie**



Asepsie



**Respect des règles
de transport**





JO

- 
- 
- 
- 
- 
- Prélèvement
 - Examen direct
 - Coloration Gram

Donne l'ORIENTATION:

- 
- Type de bactérie
 - GRAM - ou GRAM +
 - forme
 - Regroupement



– Coloration Gram



①

Frottis
prélèvement sur
lame

②

Fixation à
l'alcool ou chaleur

③

Violet de Gentiane
+ lugol pour fixer:
on colore toutes les
bactéries

④

Décoloration
à l'alcool:
On dissout les
graisses des
bactéries GRAM -

⑤

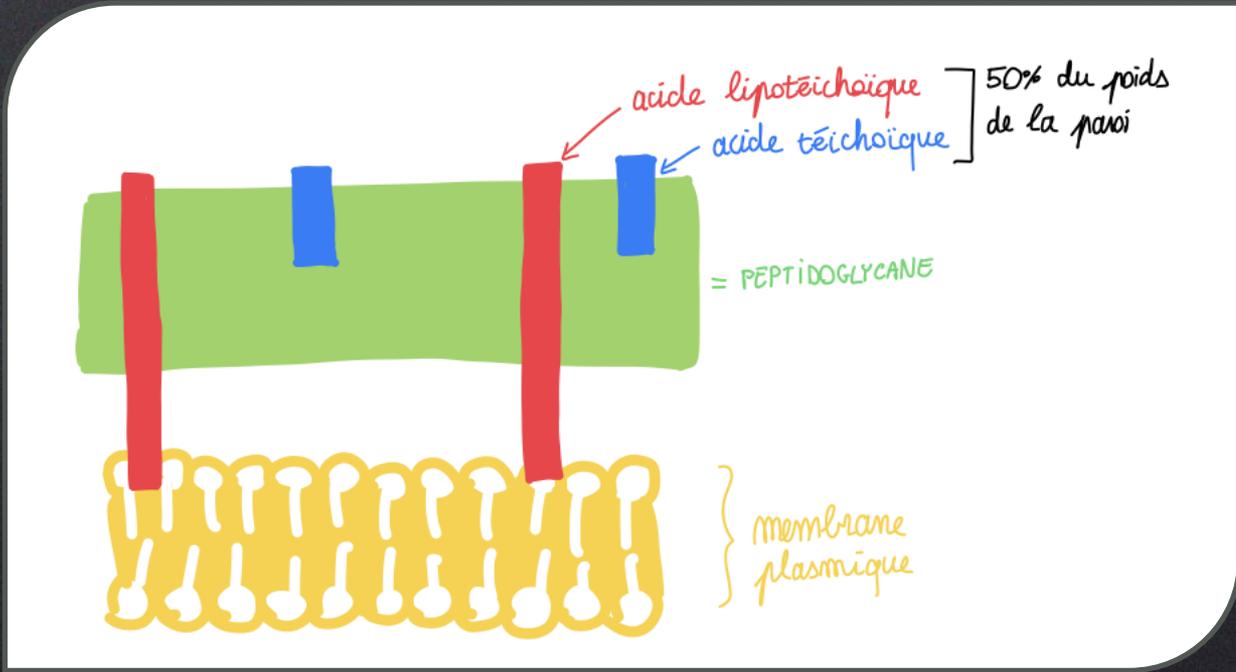
Fushine:
coloration des
GRAM -

Après coloration on observe les bactéries au MO x100

Autre coloration= May Grunwald Giemsa **MGG**—> permet de caractériser les cellules

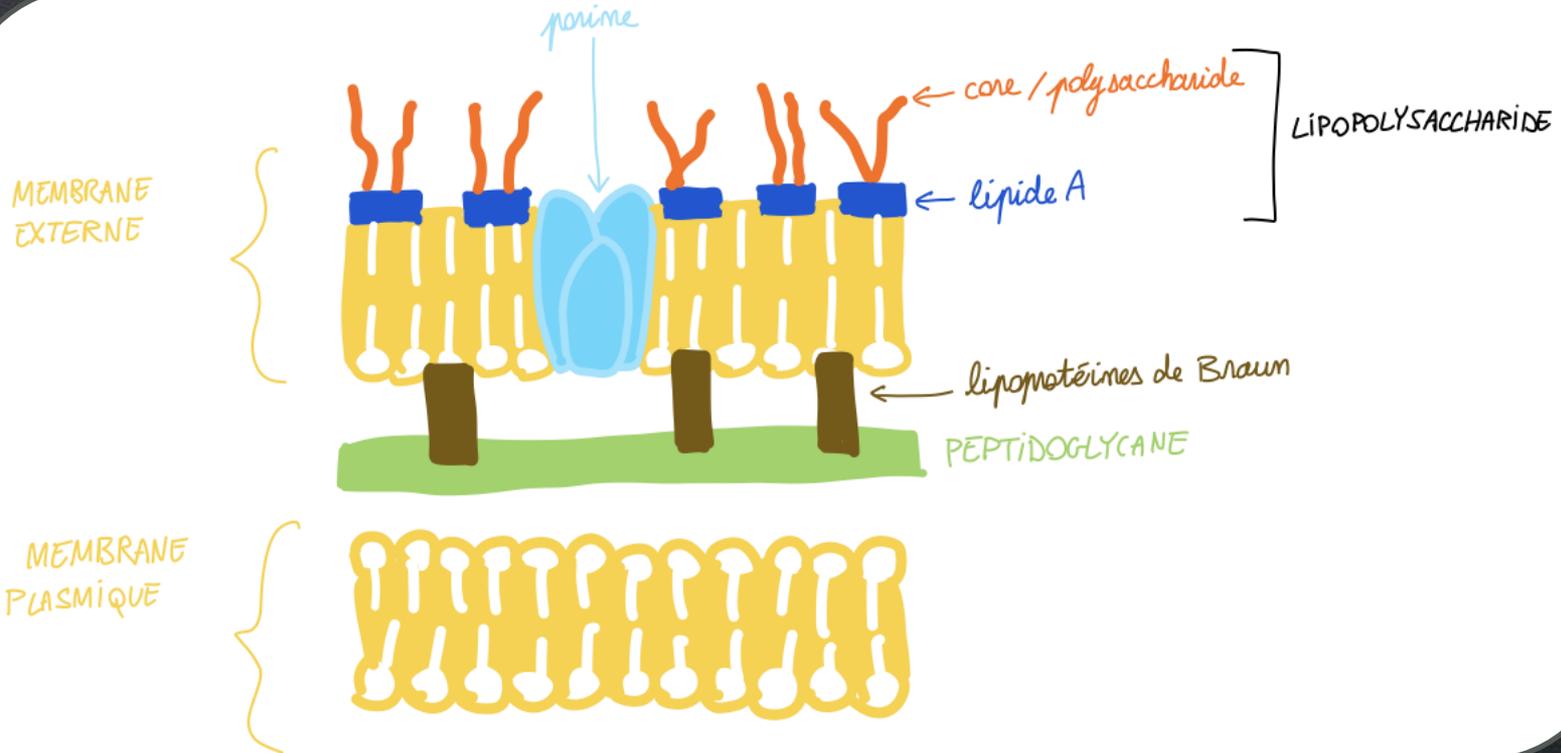
GRAM +

On a un peptidoglycane très épais



GRAM -

On a un PETIT peptidoglycane et une membrane externe





J1

Analyse de la culture= IDENTIFICATION

Avec spectrométrie de masse MALDI-TOF:

- On réalise un transfert d'énergie laser qui va charger les protéines de la bactérie et les fait **migrer** selon la masse/charge
- On obtient un **spectre protéique** qu'on compare à une base de données
- Rapide mais équipement cher

→ spectre: 

MINIMUM 10^5 bactéries



J2

- Lecture antibiogramme
- 2 exceptions où l'identification via le MALDI-TOF est impossible:

E. Coli + Shigella sp= elles ont presque le même ADN mais on retrouve des toxines et des pathologies différentes

—> Galerie d'identification phénotypique

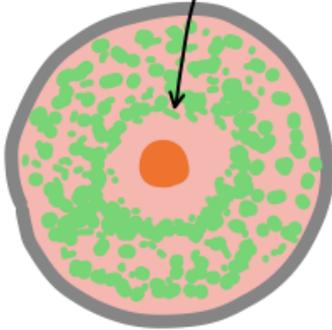
Streptocoque pneumoniae + Streptocoque oralis/ mitis= le streptocoque O/M est peu pathogène et va infecter les voies aériennes supérieures

—> Gélose avec disque d'Optochine

Gélose avec disques d'Optochine:

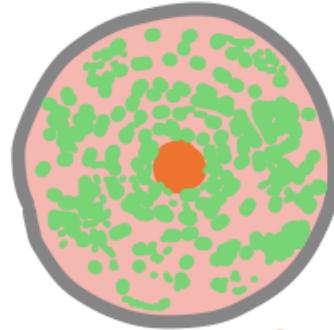
d'Optochine:

diamètre d'inhibition



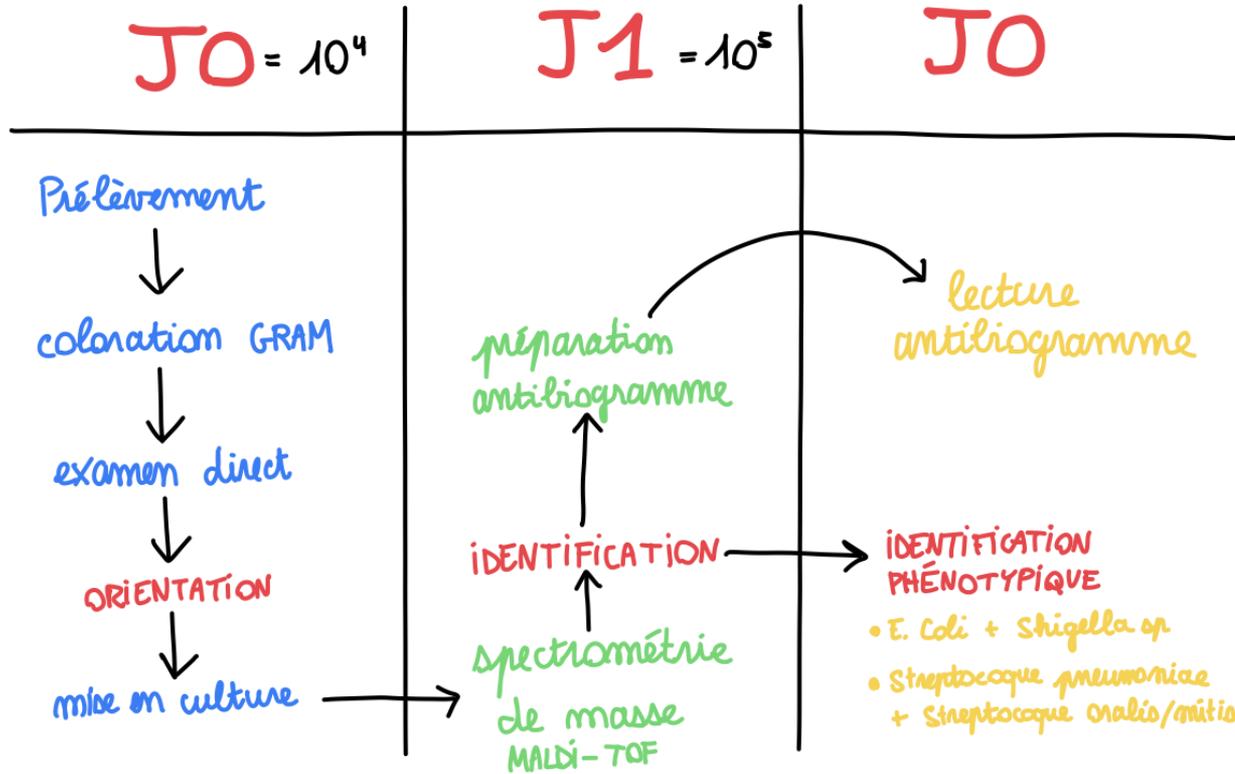
Streptocoque pneumoniae

= SENSIBLE



Streptocoque Oralis/Mitis

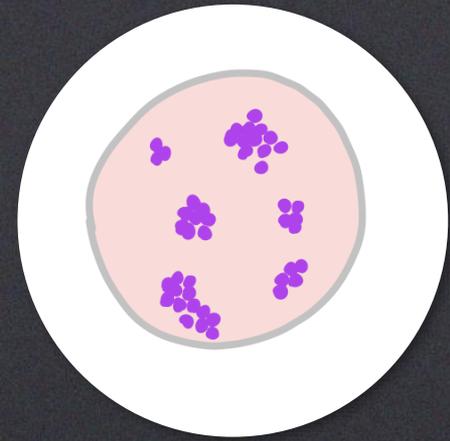
RÉCAP





RECONNAITRE LES ESPÈCES DE BACTÉRIES





COCCI **GRAM +** EN AMAS

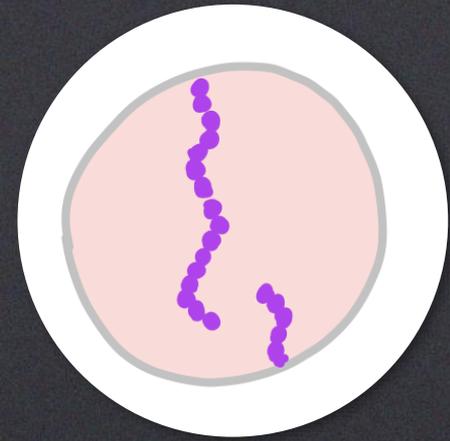
Staphylocoque aureus = doré

- Ubiquitaire (surtout muqueuses)
- Suppuratif = furoncles
- Toxinique

Staphylocoque epidermis = blanc

- Ubiquitaire (surtout muqueuses)
- Rares infections sur matériaux uniquement





COCCI GRAM + EN

CHAINETTE



Streptocoque pyogène

= groupe A

- Pharynx
- Angines, complications injections cutanées

Streptocoque agalactiae

= groupe B

- Muqueuse digestive et génitale
- Infections maternofoetales, endocardite

Streptocoque spp

= groupe ACG ou alpha-hémolytique

- Pharynx, digestif
- Rares infections

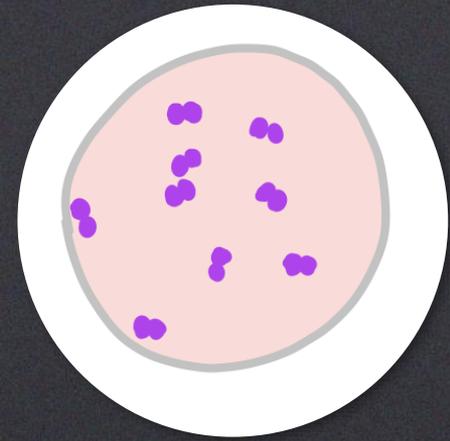
COCCI GRAM + EN

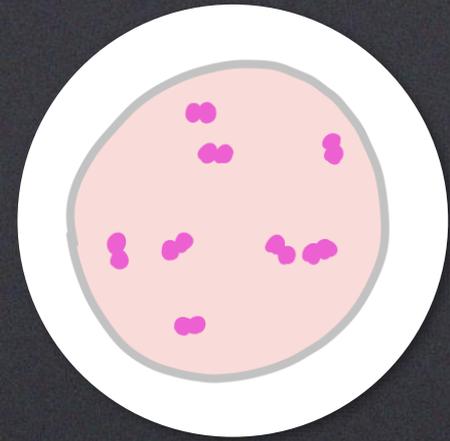
DIPLOCOQUE = COURTE CHAÎNETTE



Streptocoque pneumoniae

- Voies respiratoires
- Otites chez l'enfant, pneumonies, méningites





COCCI GRAM – EN DIPLOCOQUE = COURTE CHAÎNETTE



Neisseria meningitidis = méningocoque

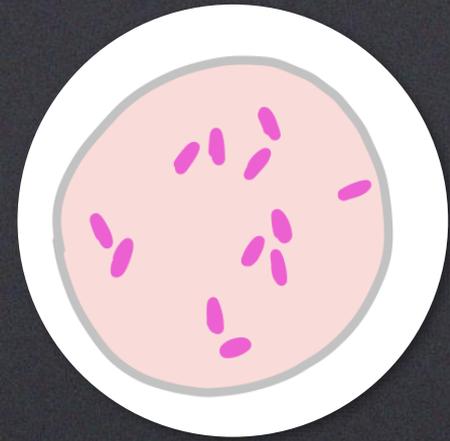
- Pharynx
- Méningites, méningo-encéphalites
- Porté par **5%** de la pop.

Neisseria gonorrhoeae = gonocoque

- Pharynx, muqueuses génitales
- Urétrites, IST

Autres Neisseria spp

- Voie aérienne sup
- NON PATHOGÈNE

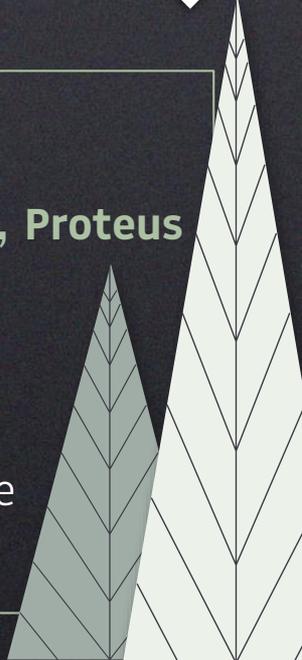


BACILLE GRAM -



Famille des entérobactéries

- **E. Coli, Shigella spp, Citrobacter spp, Klebsiella spp, Enterobacter spp, Proteus spp, Serratia spp, Salmonella spp** = retrouvée dans les intestins
- Autre nom E. Coli = Colibacille
- Infection digestive, urinaire, biliaire, méningée, pulmonaire, néonatale, fièvre typhoïde, dysenterie





STRUCTURE PEPTIDOGLYCANE:

peptidoglycane = muréine = mucopeptide



C'est un polymère de chaînes linéaires de sucre et d'acides aminés suivantes:

- **N-acétylglucosamine**
- **N-acétylmuramique**

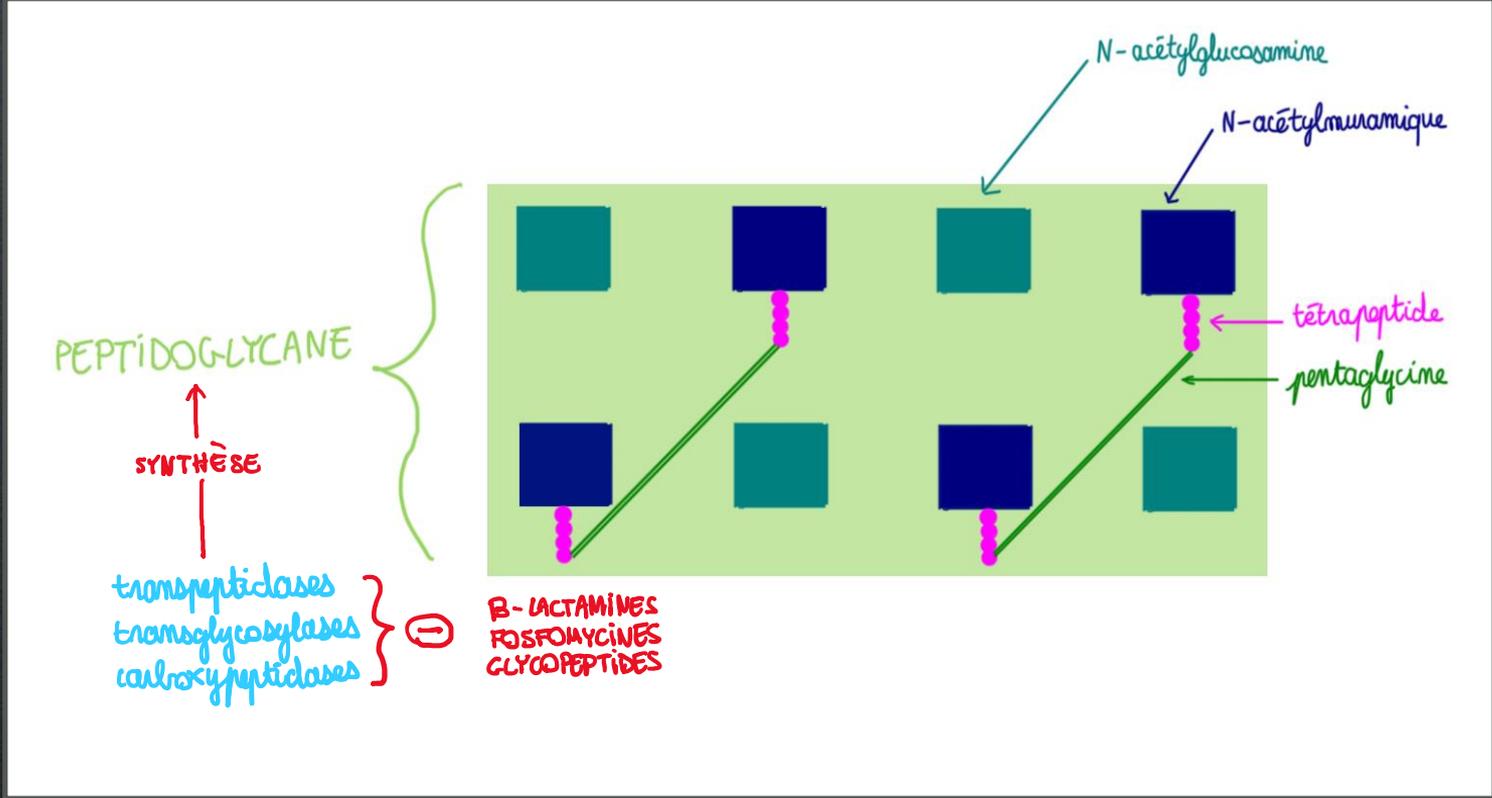


Les chaînes N-acétylmuramiques sont liées à de courtes chaînes peptidiques appelées **tétrapeptides**.

Ces tétrapeptides sont reliés entre leur D-Alanine et leur L-Lysine par des **pentaglycines**, par transpeptidation.

Donc les pentaglycines font le lien entre les chaînes N-acétylmuramiques

C'est le peptidoglycane qui va être ciblé lors de la prise d'antibiotiques





SYNTHÈSE PEPTIDOGLYCANE:



On voit 3 enzymes impliquée dans la synthèse, qui vont être une cible pour les antibiotiques.

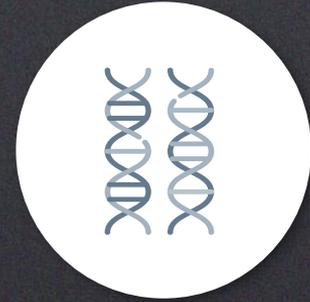


—> **Transglycosylase, transpeptidase, carboxypeptidase**

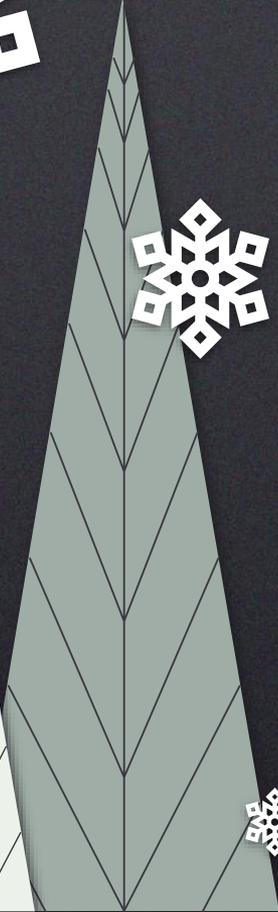


Voici les grands familles d'antibiotiques que l'on va retrouver:

- **Fosfomycine** = agit sur les précurseurs
- **Glycopeptide** = bloque l'élongation
- **Bêta-lactamine** = inhibe les enzymes de synthèse



COMPOSITION ARN RIBOSOMIQUE





Le Ribosome est un organite responsable de la synthèse de protéines.



On réalise une expérience en chauffant un ribosome. Initialement le ribosome a un taux de sédimentation **70S**. Mais avec la chaleur il se divise pour donner d'abord les 2 sous-unités **50S** et **30S**. Puis ces sous-unités se divisent à leur tour pour donner **23S**, **16S**, **5S**.



Finalement on a découvert qu'il était composé de **3 brins d'ARN** ribosomiques.

—> ici S ça veut dire Svedberg, c'est l'unité de mesure du coefficient de sédimentation

RIOSOME BACTERIEN



70S



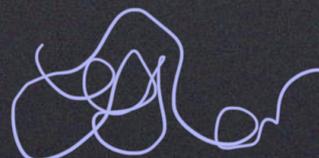
30S



16S



23S



50S



5S





SOUS-UNITÉ 16S:



ARN ribosomale 16S est un peu spécial car il nous permet de retrouver les **liens de parenté** chez les bactéries.



16S est composée de différents types de séquences ARN:

- **Séquences conservée** = elles permettent d'hybrider et d'amplifier les gènes de n'importe quelle bactérie → se sont chez les procaryotes des **amorces UNIVERSELLES**
- **Séquences variables**
- **Séquences hyper variables**





SOUS-UNITÉ 16S:



La banque d'ARN 16S est la **plus grande banque** de séquences communes.



La quantité importante de ribosomes dans les bactéries nous permet de les visualiser par une technique d'hybridation in situ → on comprend l'importance des amorces universelles



Le séquençage de cet ARN ribosomal nous a permis d'établir **l'arbre phylogénétique**

↳ C'est pour cette raison qu'on a séparé

- ↗ EUBACTERIES
- ↘ EUCARYOTES / ARCHÉES

COMMENT FAIRE UNE IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES BACTÉRIES ET DANS QUELLES CIRCONSTANCES?



Après avoir amplifié notre ARN ribosomal, on réalise son séquençage. Ensuite on vient comparer les séquences du ribosome à celle dans notre base de données pour les analyser.

Quand faire l'identification moléculaire?

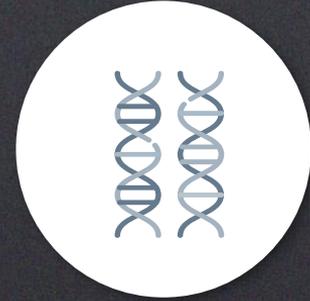
- À partir d'une colonie isolée:

- bactérie non reconnue par spectrométrie



- À partir d'un prélèvement:

- Bactérie non cultivable
- Culture négative } souvent après traitement antibio → on vérifie l'absence
- Prélèvement stérile/ mono bactérien/ sans microbiote



PLASTICITÉ DU GÉNOME





- Mutations aléatoires non corrigées = Pression de sélection } 1 sur $10^6 - 10^7$ nucléotides
- Acquisition de nouveau matériel génétique par plusieurs procédés:

- Transformation
- Transduction
- Conjugaison

} récupération ADN externe

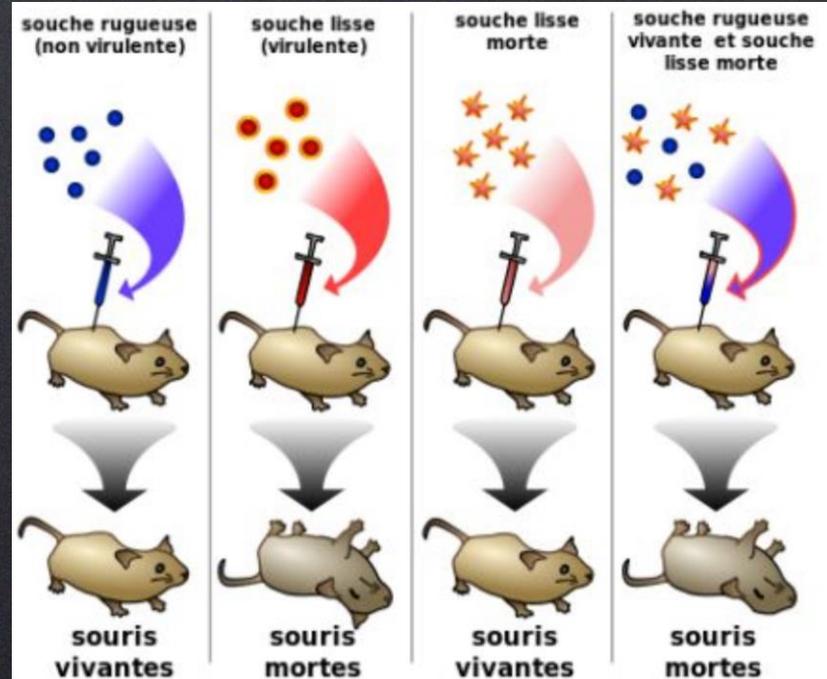


→ grâce au plasmide: petit mais grande diversité de gènes

TRANSFORMATION:

—> **Expérience de Griffith** 1928 sur des *Streptococcus pneumoniae*

- souche rugueuse non virulente
- souche lisse virulente





TRANSDUCTION:

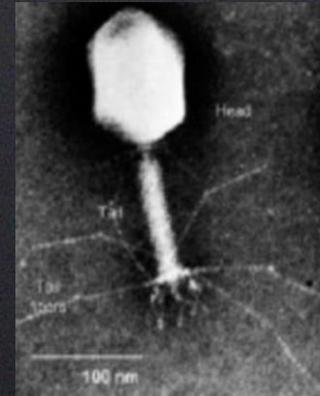


Elle se fait via un **bactériophage** = virus qui infecte que les bactéries



Il injecte son ADN, et peut réaliser 2 types de cycles:

- **Cycles lytique**: détruit la bactérie, crée des clones et récupère son ADN
- **Cycle lysogénique**: s'intègre dans le chromosome de la bactérie et reste dormant = apporte ADN issu d'autres bactéries





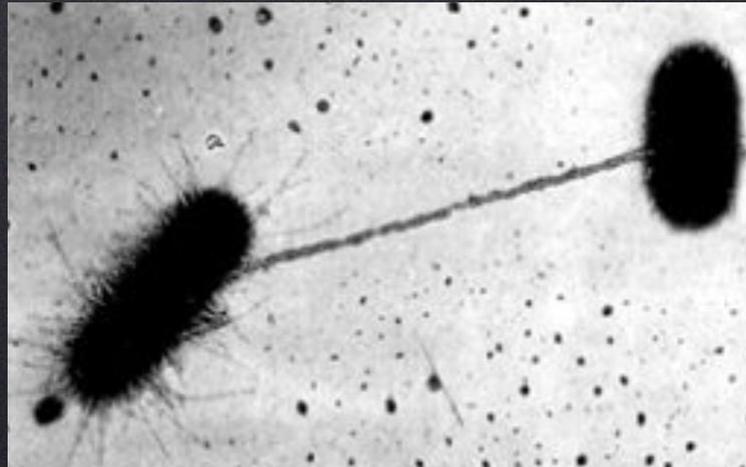
CONJUGAISON:

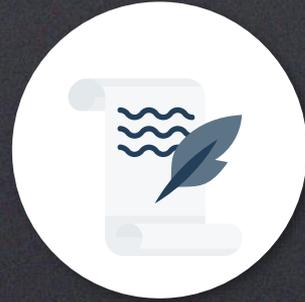


Cela se fait entre une bactérie mâle et femelle par un **pilus sexuel**:

—> permet échange fragments d'ADN d'origine chromosomique ou plasmidique

—> Le transfert dépend du temps de contact





CLASSIFICATION DES BACTÉRIES





- **ESPÈCE**= unité fondamentale
- **SOUCHE**= sous-division d'une même espèce
- **CLONE**= population descendant d'une même souche



2 bactéries sont de la même espèce si elles respectent les critères suivants:

- **Critère phénotypique:**
- **Critère génotypique:** hybridation ADN/ADN $\geq 70\%$



Cependant on a un peu abandonné ces deux critères: on utilise plus la **comparaison de séquences génomiques complètes**, avec une comparaison d'identité $\geq 95\%$



Cela est rendu possible grâce à l'ARN ribosomal 16S.



On parle maintenant d'une classification **phylogénétique**

||
étude des liens de parentés



NOMENCLATURE:



- > Universelle et hiérarchique
- > nom de genre en majuscule
- > nom d'espèce en minuscule



ex:

Staphylococcus aureus



Domaine Ex.: *Bacteria*
Règne *Prokaryotae*
Phylum
Classe *Schizomyctes*
Ordre *Micrococcales*
Famille *Micrococcaceae*
Genre *Staphylococcus*
Espèce *S. aureus*



FIN !!!

