

université
PARIS-SACLAY

FACULTÉ DE
PHARMACIE

UE 3A Sciences biologiques 1
Bactériologie générale

Cours 2 - Identification bactérienne

Pr Claire Janoir (claire.janoir-jouveshomme@universite-paris-saclay.fr)

Identification bactérienne et principes du diagnostic des infections bactériennes

**Diagnostic étiologique d'une infection bactérienne =
identification de la bactérie responsable**
(au rang de l'espèce et parfois, de la souche bactérienne)

Définitions

□ Identification

Caractérisation de marqueurs (phénotypiques ou génétiques) permettant de placer un individu dans un taxon

□ Rappel : Code international de nomenclature

Domaine	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>
Phylum (embranchement)	<i>Proteobacteria</i>	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>γ- Proteobacteria</i>	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Streptococcaceae</i>
Genre	<i>Escherichia</i>	<i>Streptococcus</i>
Espèce	<i>coli</i>	<i>pyogenes</i>

Noms utilisés en routine

Caractérisation du taxon « espèce »

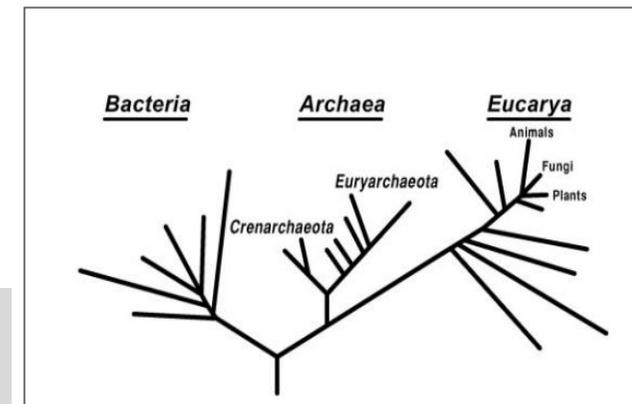
□ Historiquement, sur l'analyse de l'ADN

- GC% (25 à 75% chez les bactéries) : différence < 3%
- Hybridation ADN/ADN : bactérie identique à une souche de référence si :
 - $\geq 70\%$ hybridation
 - $\Delta T_m \leq 5^\circ\text{C}$ (différence de stabilité thermique des hybrides)
- Récemment, sur la base de la comparaison de génomes complets

□ Sur la base de l'analyse des ARNr

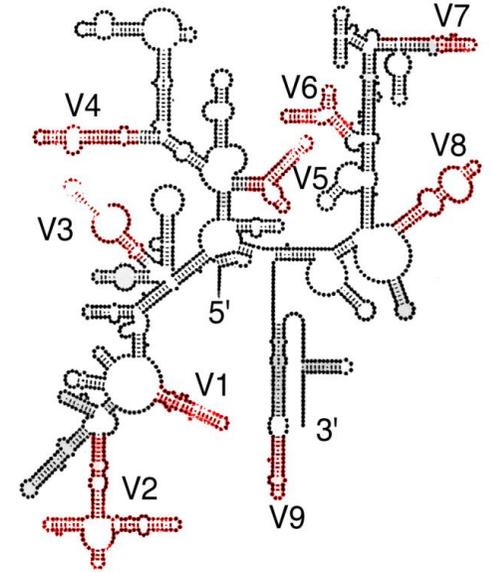
- Séquençage des ADNr
- Même espèce : $\geq 98\%$ similitude

Arbre phylogénétique universel, d'après la comparaison des séquences de l'ARN16S (Woese, PNAS, 2000)



Intérêt des ADNr

- ❑ Molécule ancestrale, de structure globale conservée
- ❑ Homologie fonctionnelle
- ❑ Signal génétique naturellement amplifié, en relation avec l'activité métabolique de la bactérie
- ❑ Structure primaire mosaïque



- Régions conservées, dont certaines chez toutes les bactéries
- Régions variables
- Régions hypervariables, dont certaines spécifiques de genre ou d'espèce

- ❑ Comparaison des séquences avec celles présentes dans les banques de données

Identification bactérienne

□ Pourquoi ?

- **Médecine** humaine et vétérinaire
 - **Diagnostic** précis de l'infection → adaptation du traitement antibiotique (sensibilité différente des espèces bactériennes aux antibiotiques)
 - **Études épidémiologiques** : identification des souches (typage) ; investigation d'une épidémie à l'hôpital, recherche d'une source de contamination,...
- **Industrie** : dépôt de brevet sur des souches
 - Industrie agro-alimentaire (ex. : bactéries lactiques)
 - Industrie pharmaceutique (ex. : probiotiques)

□ Comment ?

- Identification phénotypique : caractères observables
 - Identification génotypique : marqueurs génétiques
- } **Identification directe**

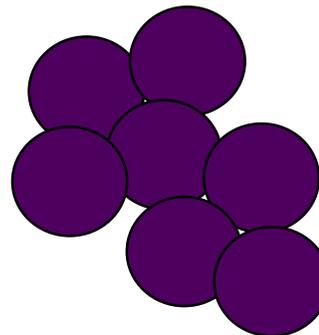
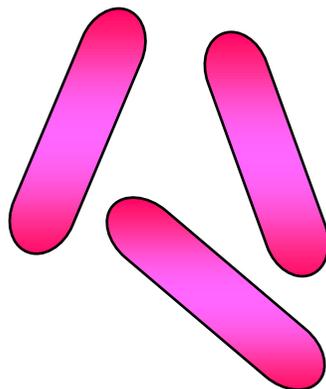
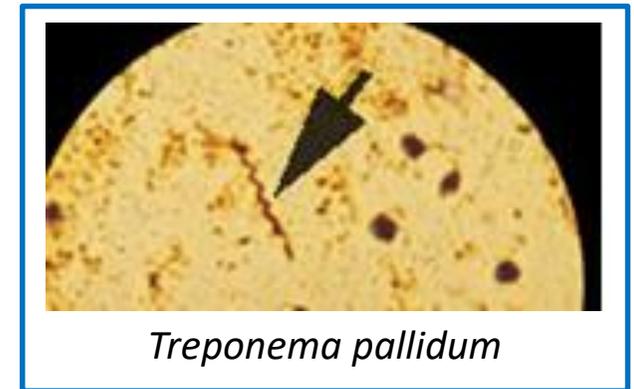
Quelle démarche à la réception d'un prélèvement bactérien ?

1- Observation microscopique

Observation microscopique

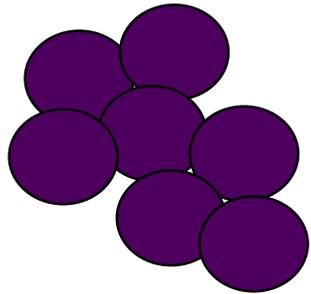
□ Caractères morphologiques

- À l'état frais
 - Morphologie (bacille, coque, spirille, ..)
 - **Mobilité**
- Après coloration de Gram
 - **Morphologie, caractère tinctorial**
 - Présence d'une endospore (*Clostridium*, *Bacillus*)



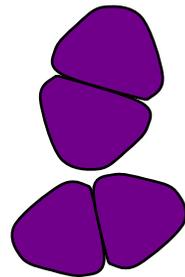
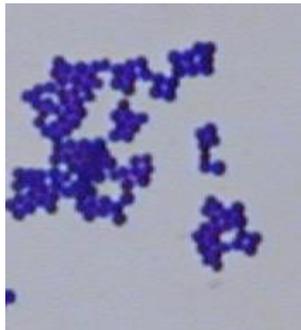
Morphologie fine des cocci

Cocci à Gram positif



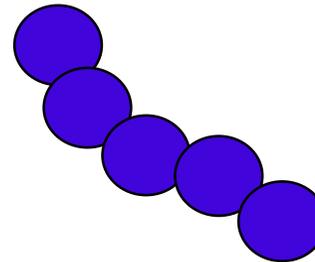
Grappes :

Genre *Staphylococcus*



Paires (diplocoques)

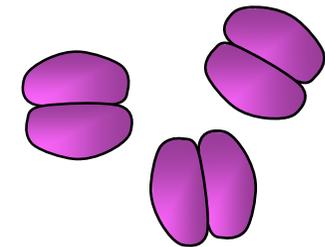
Genre *Streptococcus*



Chaînettes

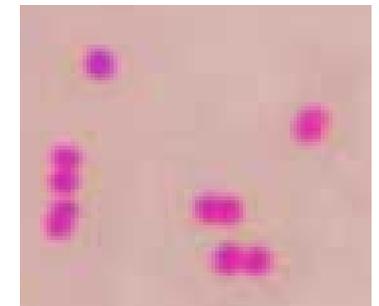


Cocci à Gram négatif



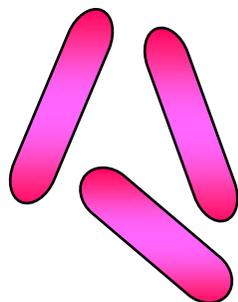
Diplocoques :

Genre *Neisseria*



Morphologie fine des bacilles

Bacilles à Gram négatif



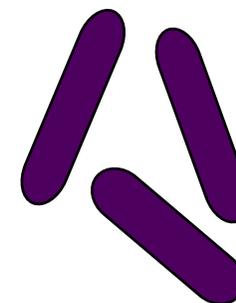
Bouts ronds :

Famille des Enterobactéries :
E. coli, genre *Salmonella*,...



Coccibacilles :
Genre Haemophilus

Bacilles à Gram positif



Bouts ronds :

Genre Clostridia



Présence
d'endospores

Quelle démarche à la réception d'un prélèvement bactérien ?

1- Observation microscopique

2 - Mise en culture

Mise en culture

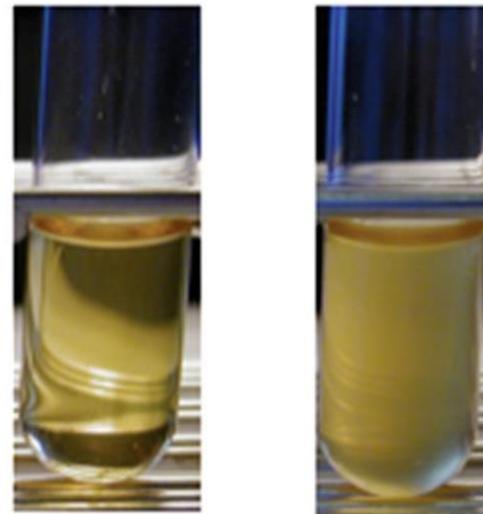
- La plupart des bactéries pathogènes pour l'homme peuvent croître sur des milieux synthétiques ou semi-synthétiques solides (agar) coulés en boîte de Pétri, ou en milieux liquide.
 - **Isolement** = multiplication des bactéries du prélèvement sous forme de **colonies en culture pure** ; étape importante pour l'identification bactérienne.
 - **Enrichissement** : mise en culture en milieu liquide en cas de prélèvement pauvre pour obtenir suffisamment de matériel biologique (avant l'étape d'isolement)

Milieu solide : isolement



Colonies

Milieu liquide : enrichissement



Trouble = croissance bactérienne

Mise en culture

□ Pour se multiplier, les bactéries ont besoin de :

▪ **Nutriments élémentaires**



Indispensables pour toutes les bactéries

- Eau
- Sources d'énergie et d'électrons
- Carbone (composés organiques : bactéries **hétérotrophes**)
- Azote
- Sels minéraux et oligoéléments (**Fe**)

▪ **Base de la synthèse des éléments constitutifs des macromolécules.**

Les bactéries ne sont pas toutes capables de synthétiser toutes les briques de base.

- Si la bactérie ne peut pas synthétiser une brique de base, elle est « **auxotrophe** » pour cet élément
- Si la bactérie peut le synthétiser, elle est « **prototrophe** »

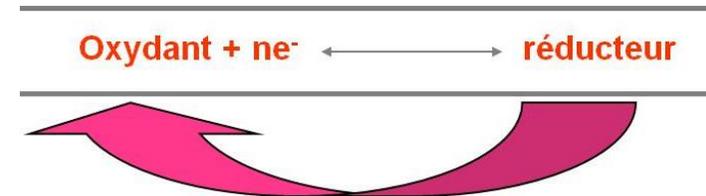
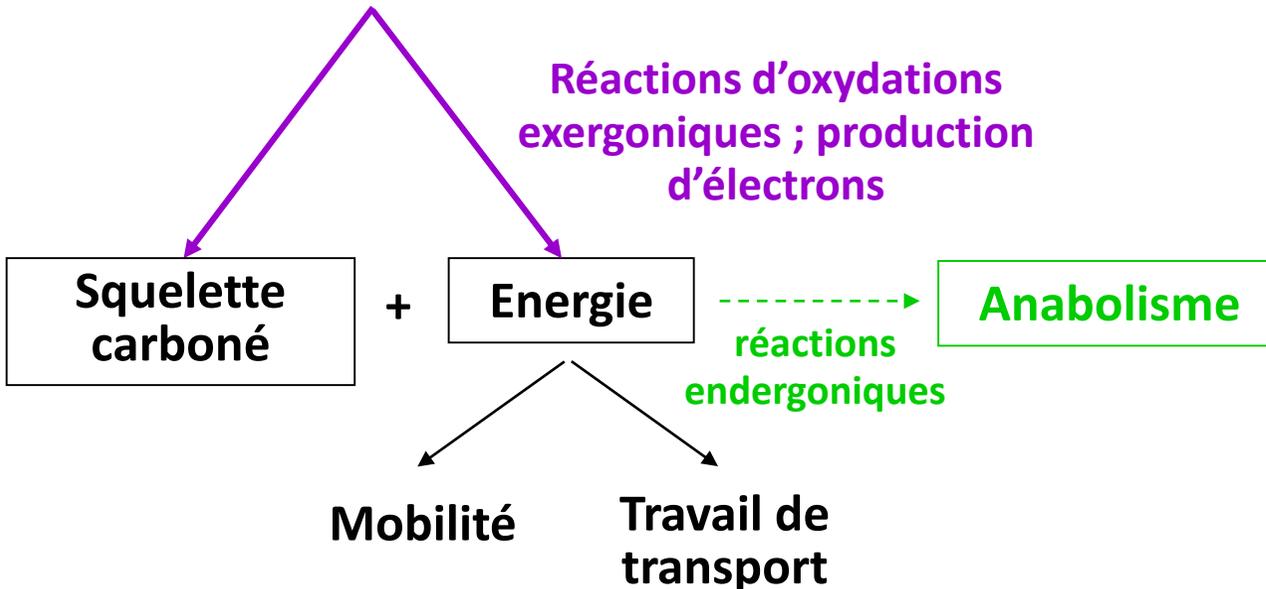
Facteur de croissance : composé organique spécifique indispensable à la croissance bactérienne

▪ D'une **atmosphère** adaptée à leur métabolisme respiratoire

Métabolisme bactérien

Les bactéries d'intérêt médical sont généralement **hétérotrophes chimio-organotrophes**. Elles se multiplient (= production de biomasse) en générant de l'énergie par **oxydation des composés organiques**.

Composés chimiques organiques
(oses +++, protéines, lipides)



La ré-oxydation des accepteurs d'e- réduits est associée à la production d'ATP par différents mécanismes qui dépendent essentiellement de l'accepteur final des électrons.

Production d'énergie

□ Respiration

Réactions d'oxydation induisant la production d'énergie essentiellement grâce à des **phosphorylations oxydatives** membranaires (chaîne de transfert des électrons).

- Accepteur final O_2 : respiration aérobie
- Accepteur final autre : respiration anaérobie (généralement une molécule inorganique, CO_2 , NO_3^- , ...)

□ Fermentation

Processus dans lequel l'accepteur final d'électron est une **molécule organique** et le transfert des électrons se fait par couplage entre la réaction initiale d'oxydation et une réaction de **phosphorylation au niveau du substrat**.

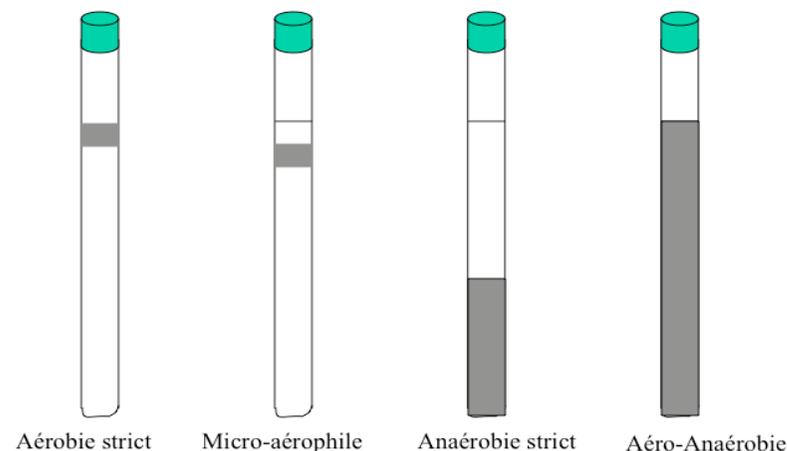
- Nombreux types de fermentations
- Les produits issus de la fermentation peuvent être utilisés pour l'identification bactérienne
- Rendement énergétique faible

Types respiratoires des bactéries

Type respiratoire	Accepteur (s) final(aux) des électrons	Conditions de culture possibles
Aérobie strict	O_2	Aérobiose
Aérobie-anaérobie facultatif	O_2 Composés organiques	Aérobiose/anaérobiose (croissance plus faible)
Anaérobie-aérobie tolérant	Composés organiques	Anaérobiose / aérobiose (tolérance à l'oxygène)
Anaérobie strict	Composés organiques	Anaérobiose
Microaérophilie	O_2	Aérobiose (avec diminution de la pp d' O_2)

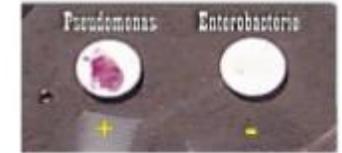
□ Détermination du type respiratoire au laboratoire

- Test de la gélose VF (gélose profonde)
- Non fait en routine
- Montré en TP

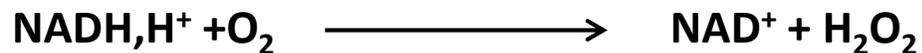


□ Bactéries aérobies strictes

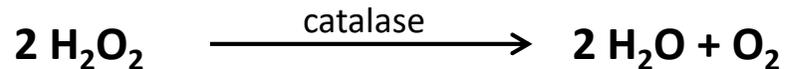
- Respiration aérobie : principal mode de production d'ATP ; chaîne respiratoire cytochromique
- Recherche de la cytochrome oxydase : test chromogénique
- Souvent des systèmes de respiration anaérobie (survie en anaérobiose)
- Présence de chaînes non cytochromiques



- Formation d'ions toxiques superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) ou peroxyde (H_2O_2) dans le cytoplasme



- Différents systèmes de détoxification (superoxyde dismutase ou catalase) :



□ Bactéries aérobies/anaérobies facultatives

- Respiration aérobie : principal mode de production d'ATP
- Voies fermentaires utilisées en anaérobiose (+ respiration anaérobie)
- Systèmes de détoxification des composés toxiques issus de l' O_2

□ Bactéries anaérobies

- **Voies fermentaires** souvent spécifiques d'un groupe bactérien
- Utilisées en industrie alimentaire ou autre
 - Bactéries lactiques : pyruvate → lactate
 - *Alcaligenes eutrophus* : production de polymères type plastique
- Comportement par rapport à l'O₂ :
 - Bactéries anaérobies strictes : mort ou arrêt de la croissance en aérobiose (toxicité de l'O₂)
 - Bactéries anaérobies/aérobies tolérantes : tolérance (systèmes enzymatiques de détoxification)

Conditions de mise en culture

- **Choix des milieux** : orientation en fonction de la coloration de Gram et de l'épidémiologie
 - Milieux minimum
 - Milieux riches
 - Milieux enrichis en un ou plusieurs facteurs de croissance particuliers
 - Milieux sélectifs



Streptococcus pneumoniae
sur gélose au sang



Haemophilus influenzae :
exigences en facteur V et X

Conditions de mise en culture

- **Atmosphère d'incubation en fonction du type respiratoire**



Enceintes anaérobies



Conditions de mise en culture

□ Facteurs physico-chimiques

▪ Température

- Bactéries thermophiles : 45° C → 65° C
- **Bactéries mésophiles : 30° C → 40° C**
- Bactéries psychrophiles : 5° C → 10° C

▪ pH

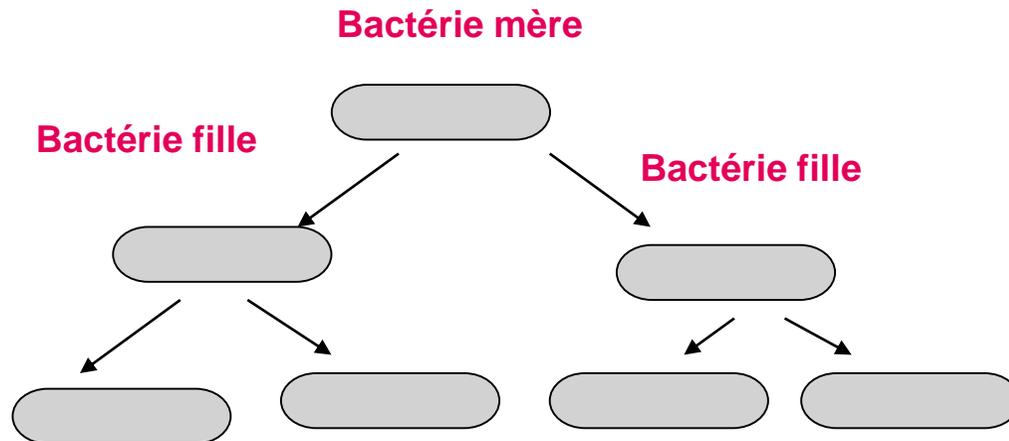
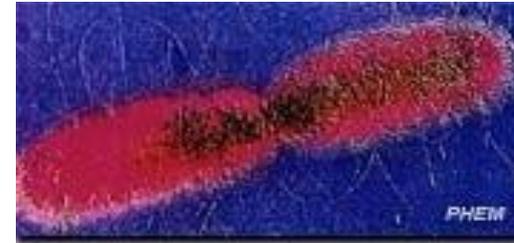
- **pH 7-7,7**
- pH 6: bactéries acidophiles (lactobacilles)
- pH 9: bactéries basophiles (*Vibrio*)

▪ Pression osmotique

▪ Humidité relative

Croissance Bactérienne

- La croissance correspond à la réplication des bactéries par division binaire (scissiparité)



Doublment de la population à chaque génération



Multiplication bactérienne

- Temps de génération T = temps de doublement de la population, variable en fonction des bactéries

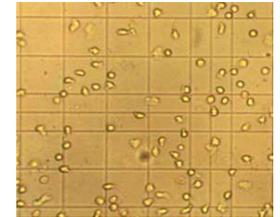
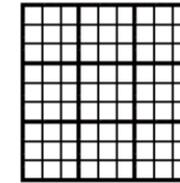
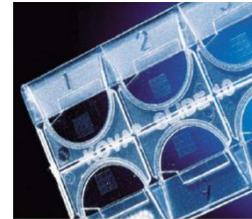
- *Escherichia coli*, $T = 20$ min
- *Mycobacterium tuberculosis*, $T = 20$ h - *Mycobacterium leprae* $T = 20$ j

Croissance Bactérienne

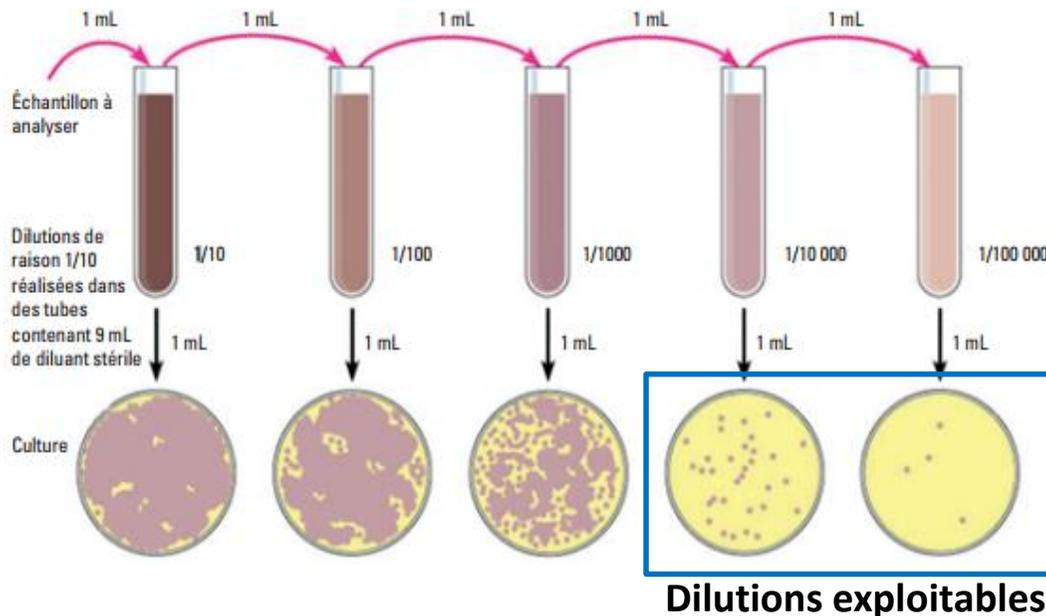
□ Comment dénombrer une population bactérienne en milieu liquide ?

■ Méthodes directes

- Dénombrement total au microscope optique



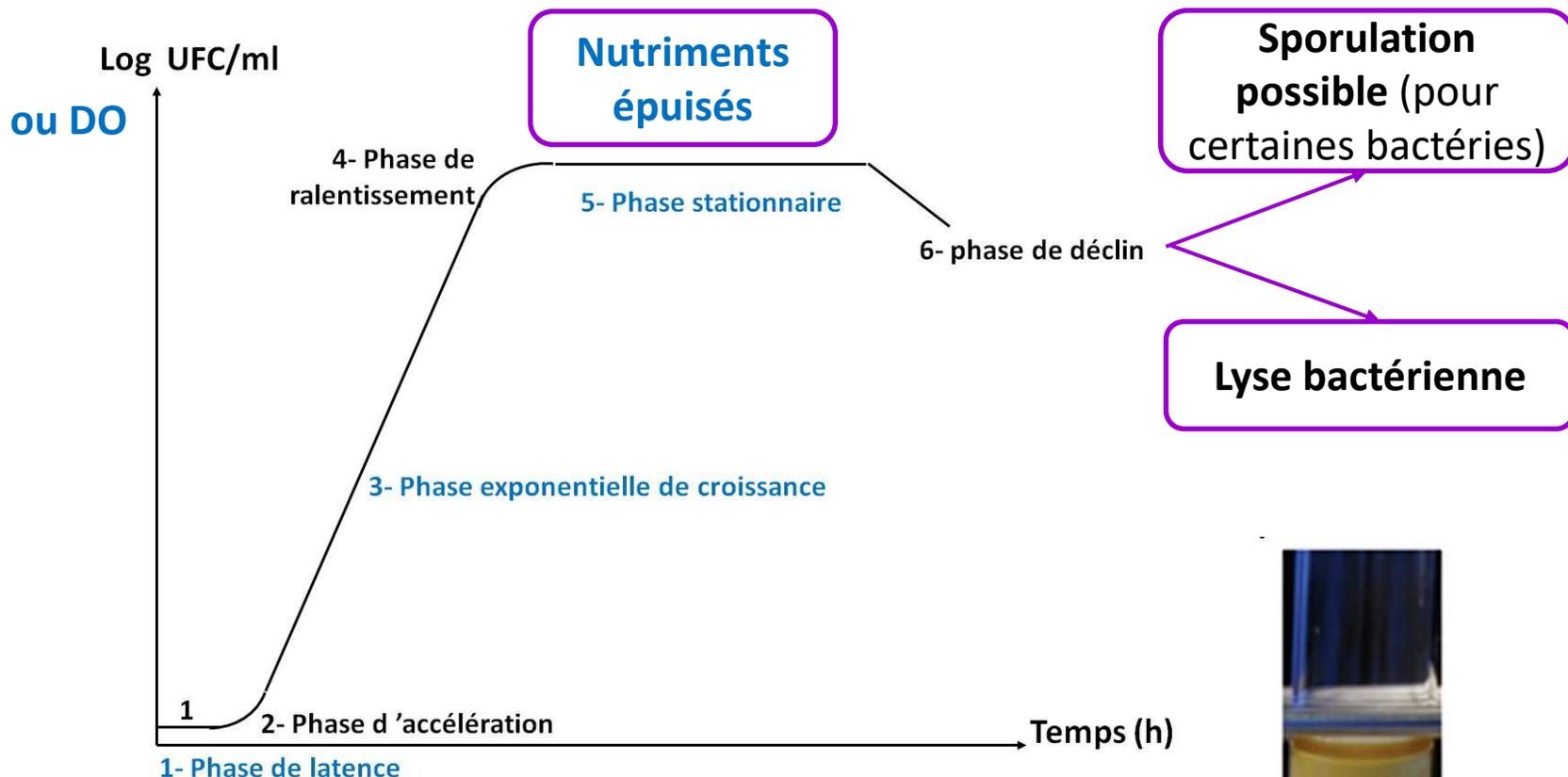
- Dénombrement des **bactéries viables** ou **UFC** (nité formant colonie) /ml par la méthode des dilutions ; ensemencement sur milieu gélosé



Comptage des colonies, rapportées à la dilution

Courbe de croissance en milieu liquide

□ Milieu non renouvelé



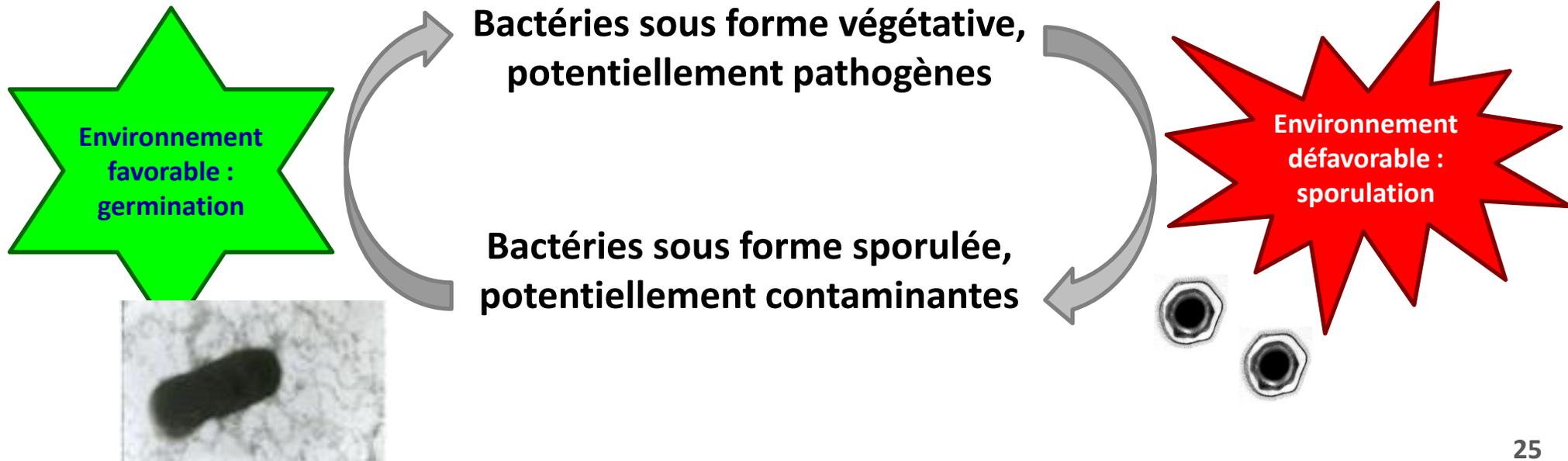
- Méthode fastidieuse et longue
- **Méthode indirecte : mesure de la biomasse par opacimétrie (600-620 nm)**



Trouble

Autres modes de croissance bactérienne

- ❑ *In vivo* : apport renouvelé de nutriments mais croissance plus lente (environnement hostile)
- ❑ En biofilm (*cf.* cours 4)
- ❑ Il existe une possibilité de différenciation cellulaire : phénomène de sporulation/germination (*cf.* polycopié)



Quelle démarche à la réception d'un prélèvement bactérien ?

1- Observation microscopique

2 - Mise en culture

3- Identification phénotypique

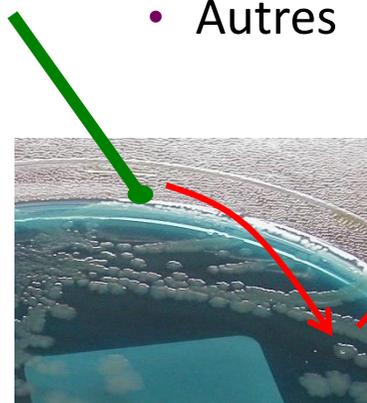
Identification phénotypique sur des caractères métaboliques

□ Caractères métaboliques

- Recherche d'enzymes respiratoires : catalase, oxydase
- Attaque des sucres : glucose, lactose, mannitol, hydrolyse de l'esculine,...
- Recherche de métabolite particulier (ex. recherche d'indole pour *E. coli*)
- Recherche d'enzymes métaboliques : uréase, bêta-galactosidase,...
- Recherche d'enzyme spécifique (ex. : coagulase de *Staphylococcus aureus*)

□ Microméthodes (systèmes de tests multiples)

- Système API (Biomérieux, Vitek)
- Autres



1 colonie



eau stérile



Galerie API 20^E : identification des Enterobactéries



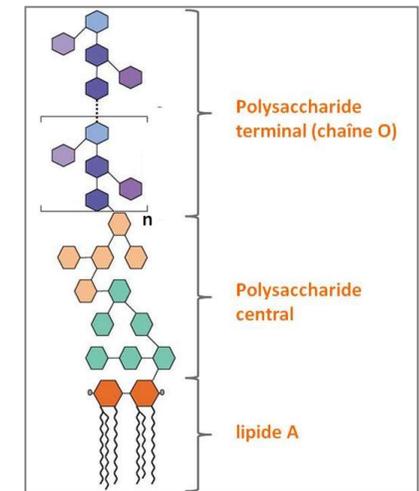
Incubation 24h à 37°C

Identification phénotypique sur des caractères antigéniques

□ Caractères antigéniques de surface

■ Antigènes des bactéries à Gram négatif

- Antigène commun somatique O (LPS)
- Antigène des bactéries mobiles : antigène flagellaire H
- Antigène capsulaire K



- **Antigènes spécifiques de certaines espèces : groupage des Streptocoques grâce à des polyoside de surface : classification de Lancefield**

□ Identification antigénique

- Obligatoire pour identifier les salmonelles et les shigelles (bacilles à Gram négatif)
- Permet le typage des *E. coli* entéropathogènes
Ex. : *E. coli* O157:H7 (pathotype particulier)

Identification phénotypique par spectrométrie de masse

❑ MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Time-of-Flight

- Technique de protéomique

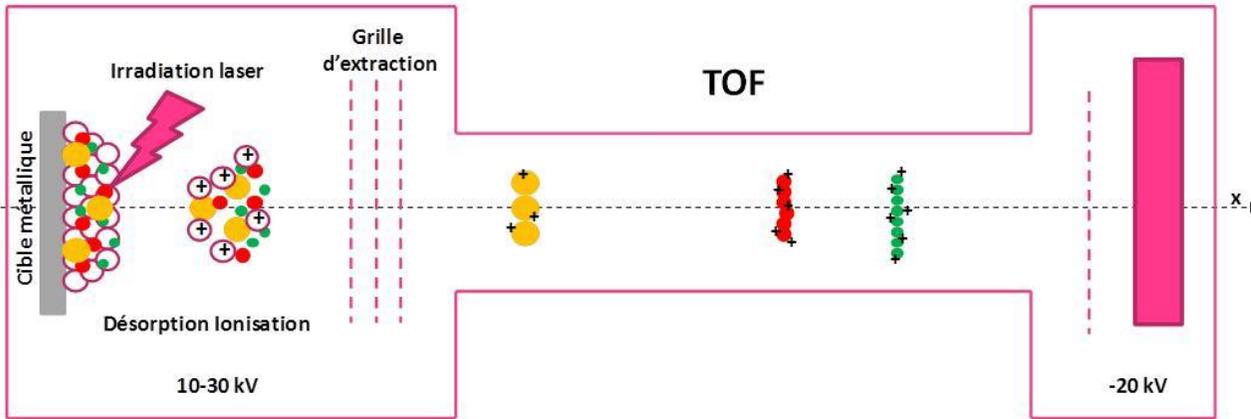
❑ Principe

Obtention d'une « empreinte spectrale » : profil des masses moléculaires des composés bactériens, généralement caractéristique d'une espèce

- Ionisation des molécules
- Séparation en fonction de leur masse moléculaire (migration dans un champs électrique)
- Détection : chaque molécule est caractérisée par :
 - Sa masse moléculaire (m)
 - Sa charge (z)
 - Le rapport m/z
 - L'intensité relative du signal
- Comparaison avec une banque de données



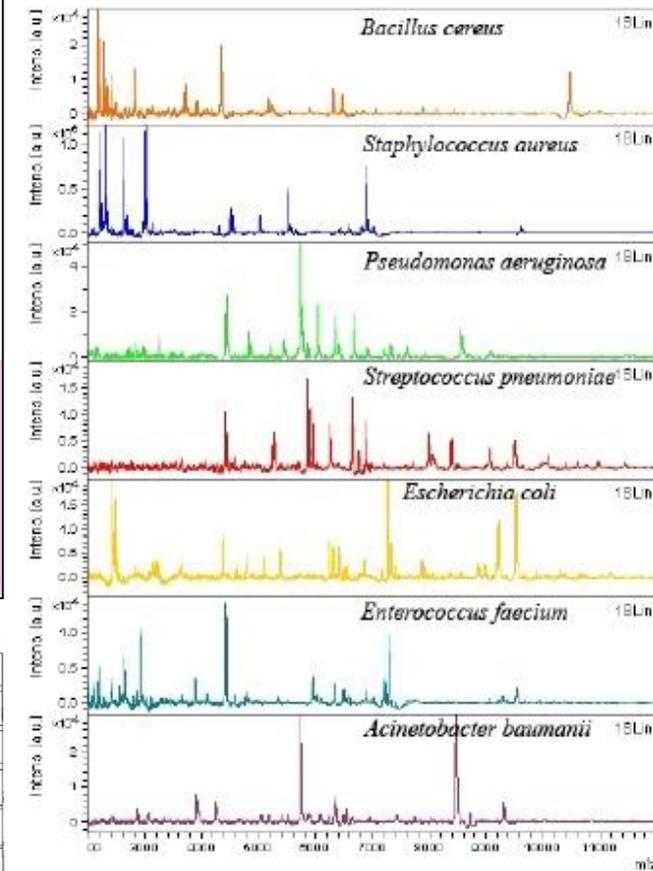
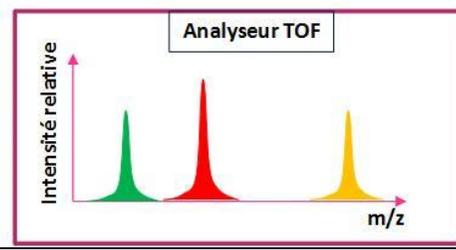
Source MALDI



Détection

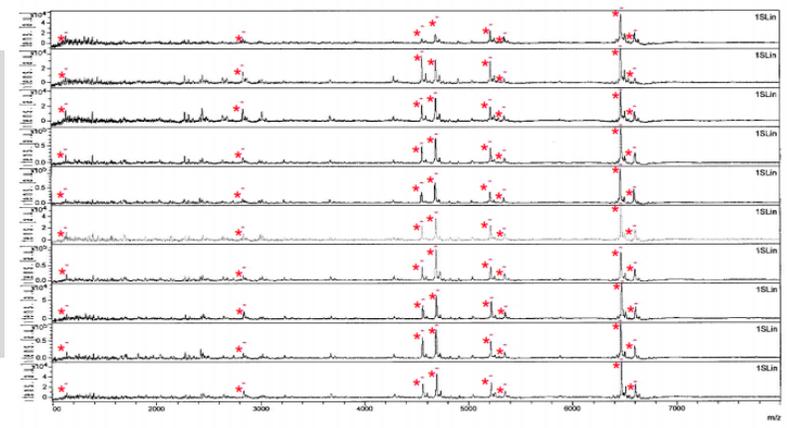
7 espèces différentes
7 spectres différents

○ matrice
● analytes
TOF : Time Of Flight



Exemple de *Staphylococcus hominis*

Seuls les pics spécifiques servent à l'identification



Identification phénotypique par spectrométrie de masse

❑ Utilisation au laboratoire

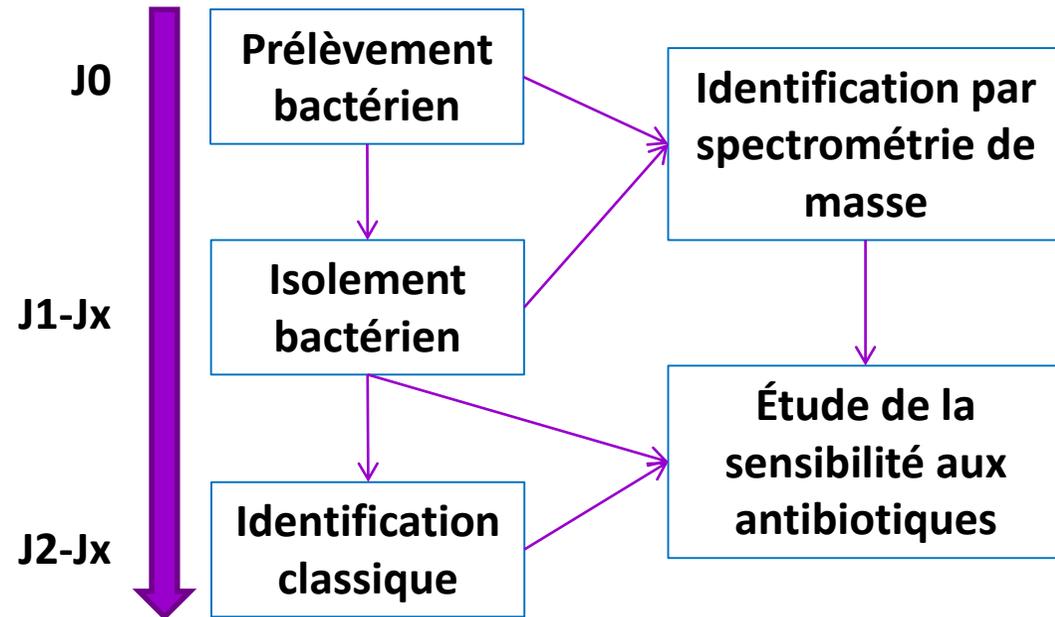
- À partir de colonies bactériennes
- Directement à partir d'échantillons

❑ Avantages

- **Gain de temps pour l'identification**
- Recherche de mécanismes de résistance aux antibiotiques

❑ Inconvénients

- Mise au point, coût à l'achat
- Identification encore délicate pour certaines espèces



Quelle démarche à la réception d'un prélèvement bactérien ?

- 1- Observation microscopique
- 2 - Mise en culture
- 3- Identification phénotypique
- 4- Étude de la sensibilité aux antibiotiques

Effet des antibiotiques sur la croissance bactérienne

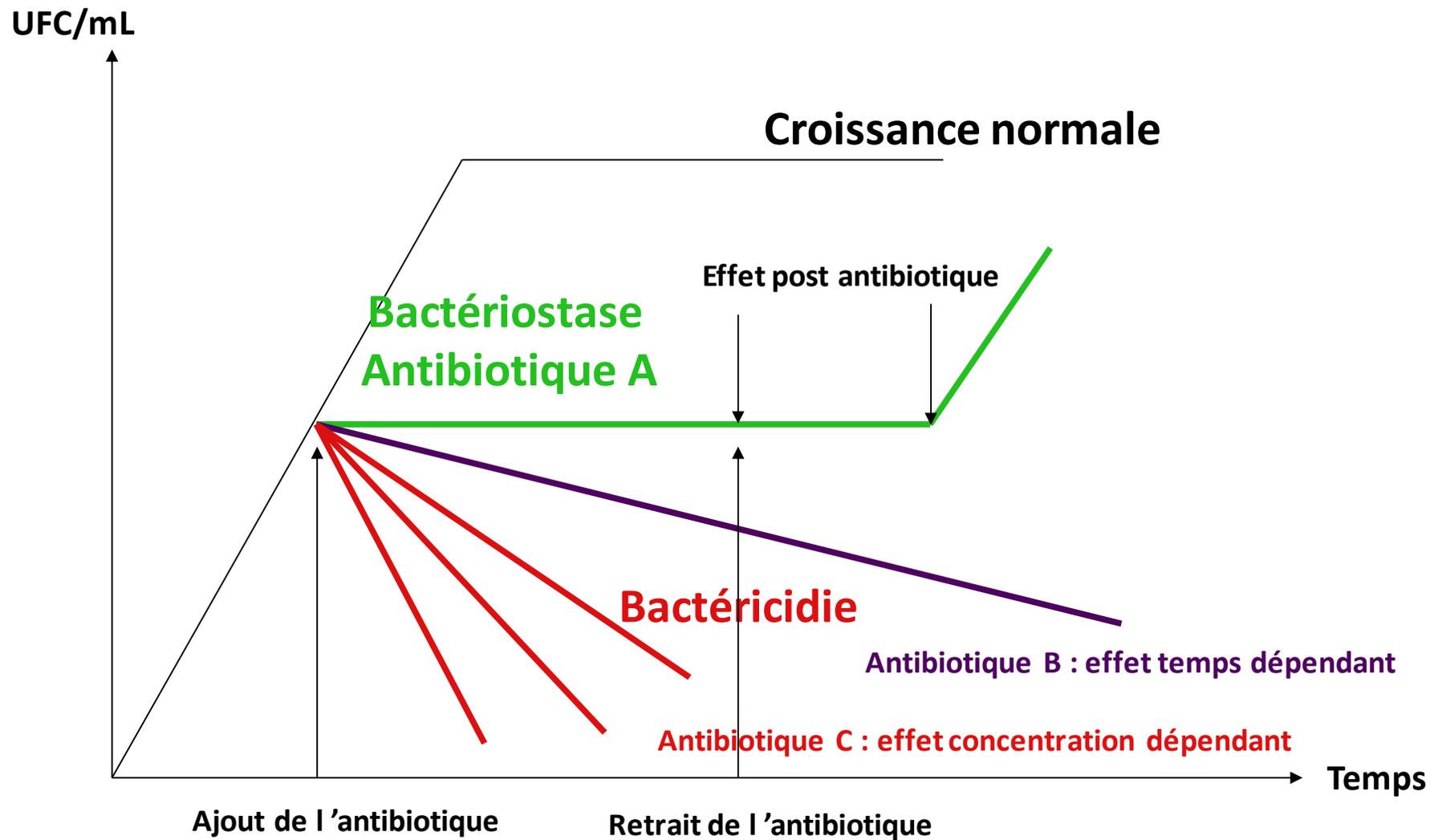
□ Un antibiotique peut avoir une activité **bactériostatique** ou **bactéricide**

- **Bactériostase** : arrêt de la croissance bactérienne = stagnation du nombre de bactérie viable ; mesurée par la **Concentration minimale inhibitrice (CMI)**

La CMI d'un antibiotique vis-à-vis d'une souche bactérienne est la plus petite concentration de cet antibiotique inhibant la croissance visible de cette souche.

- **Bactéricidie** : mort bactérienne = diminution du nombre de bactéries viables ; mesurée par la **Concentration minimale bactéricide (CMB)**

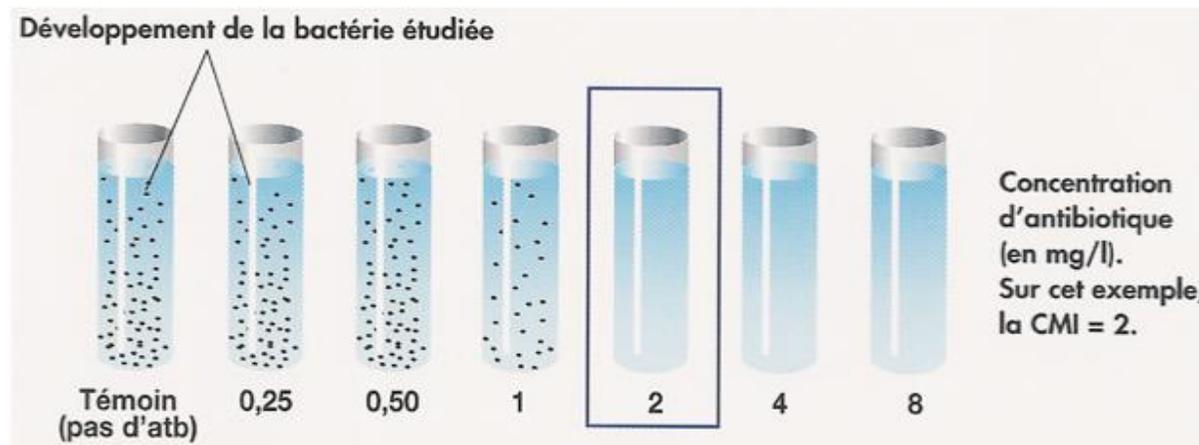
La CMB d'un antibiotique vis-à-vis d'une souche bactérienne est la plus petite concentration de cet antibiotique ne laissant subsister que 0,01% de survivants de cette souche bactérienne.



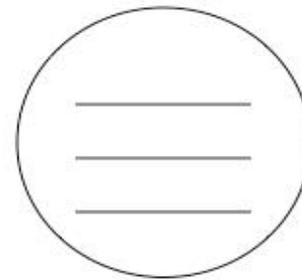
Méthodes d'étude de la CMB

❑ Pas en routine

- Ensemencement par inoculum standardisé
- Incubation 18h, 37 °C
- Dénombrement des survivants

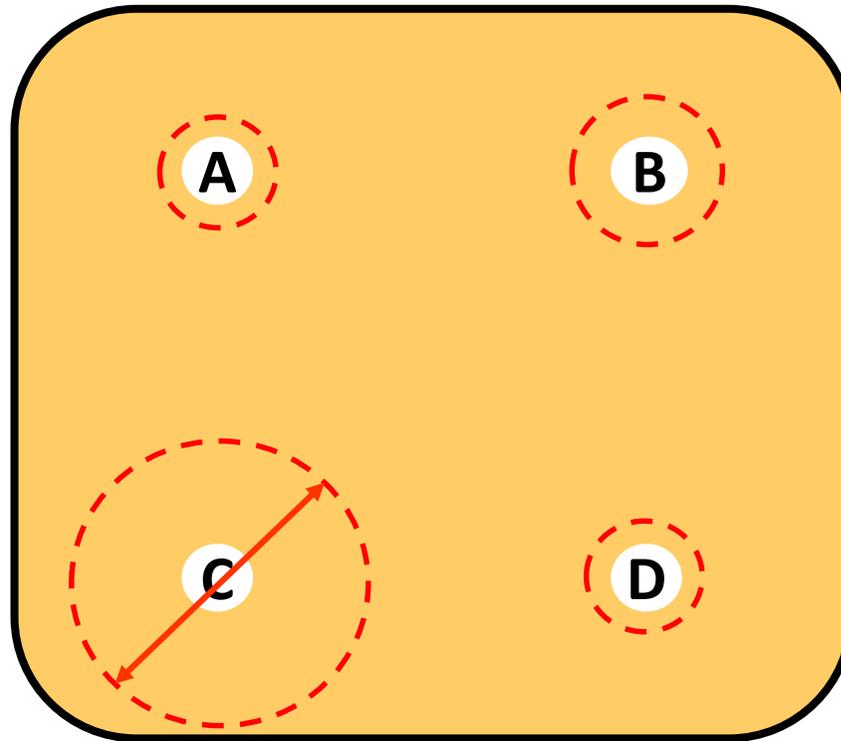


Dénombrement du nombre de survivants par rapport à l'inoculum de départ : CMB définie pour 0,01% survivants



En routine : réalisation de l'antibiogramme

- Technique standardisée (règles EUCAST)



Mesure du diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne autour des disques antibiotiques et détermination du caractère S, I ou R de la bactérie

Quelle démarche à la réception d'un prélèvement bactérien ?

1- Observation microscopique  **Identification génotypique**

2 - Mise en culture

3- Identification phénotypique

4- Étude de la sensibilité aux antibiotiques

Identification génotypique

□ Quand et pourquoi ?

▪ En routine

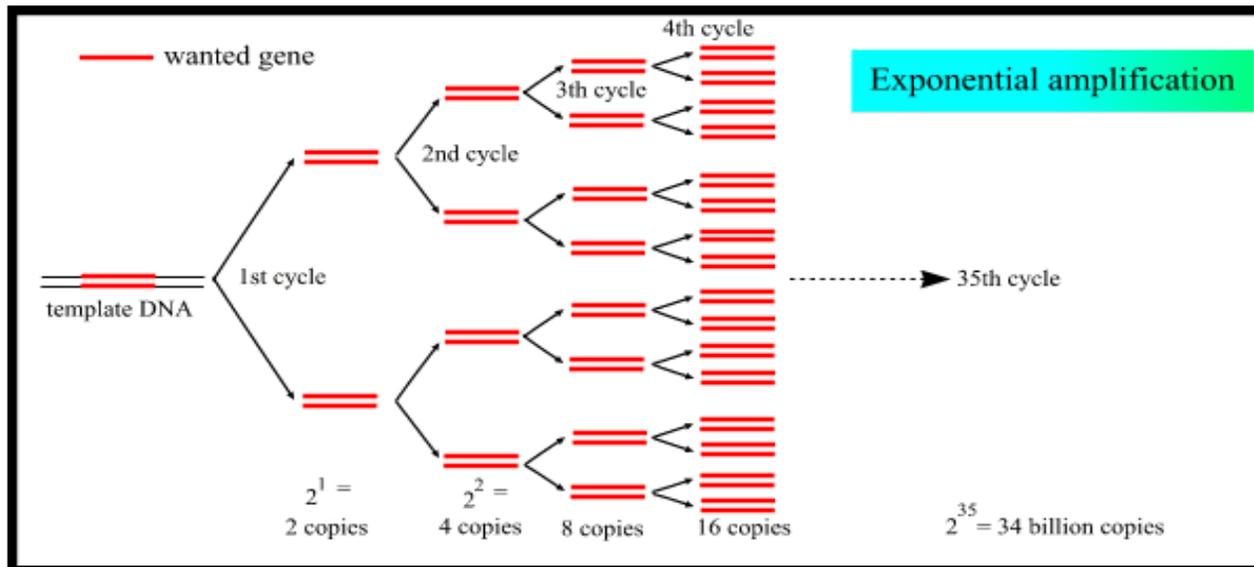
- Isolement de la bactérie impossible
- Gain de temps : identification directe sur le prélèvement

▪ Pour des études d'épidémiologie

□ Identification en routine : techniques basées sur l'amplification (+/ séquençage) d'ADN

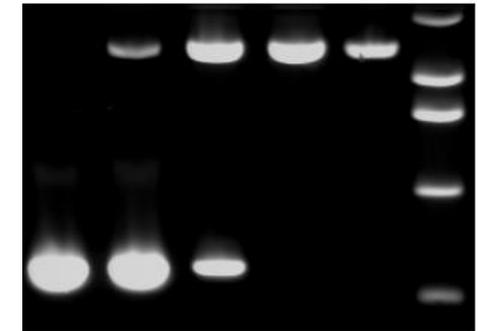
- PCR
- PCR temps réel (qPCR)

Principe de la « Polymerase Chain Reaction »



Plusieurs cycles successifs, 3 étapes :
 Dénaturation (>90°C) ; Hybridation des amorces ; Elongation (≈70°C)

Détection sur gel
 d'agarose...



...ou détection directe

□ Deux stratégies possibles

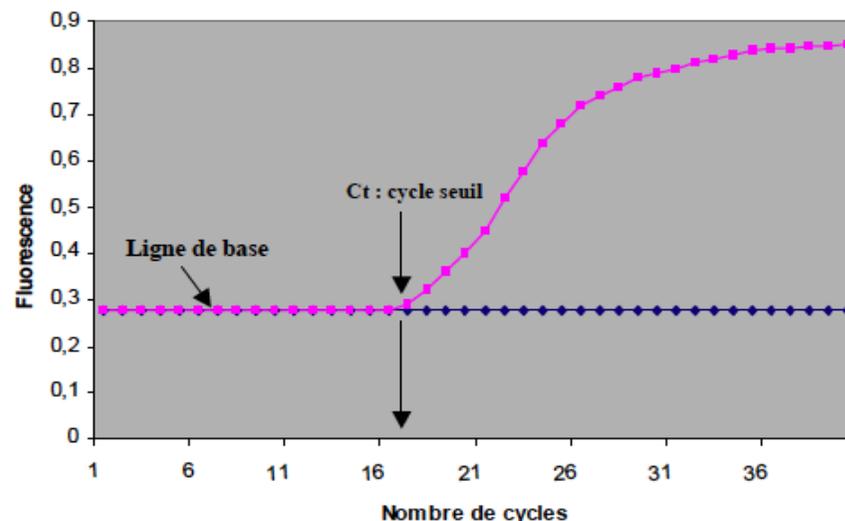
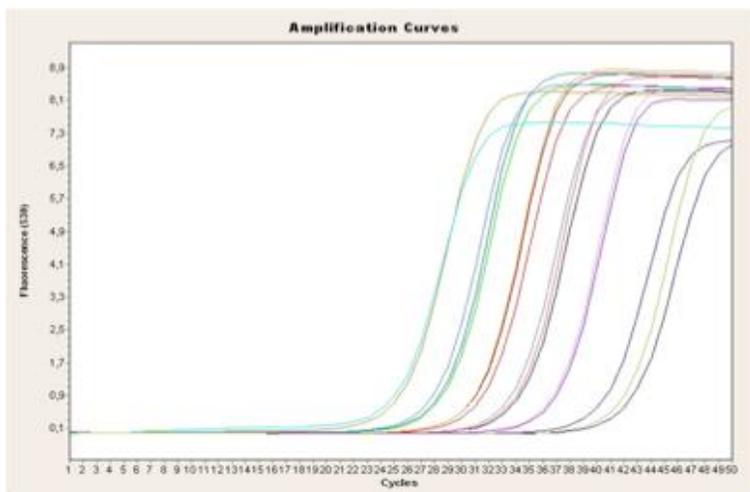
- Identification directe : utilisation d'oligonucléotides spécifiques
- Amplification par des amorces universelles de l'ARN16S et séquençage

Choix des amorces dans les régions très conservées



Identification génotypique par PCR temps réel

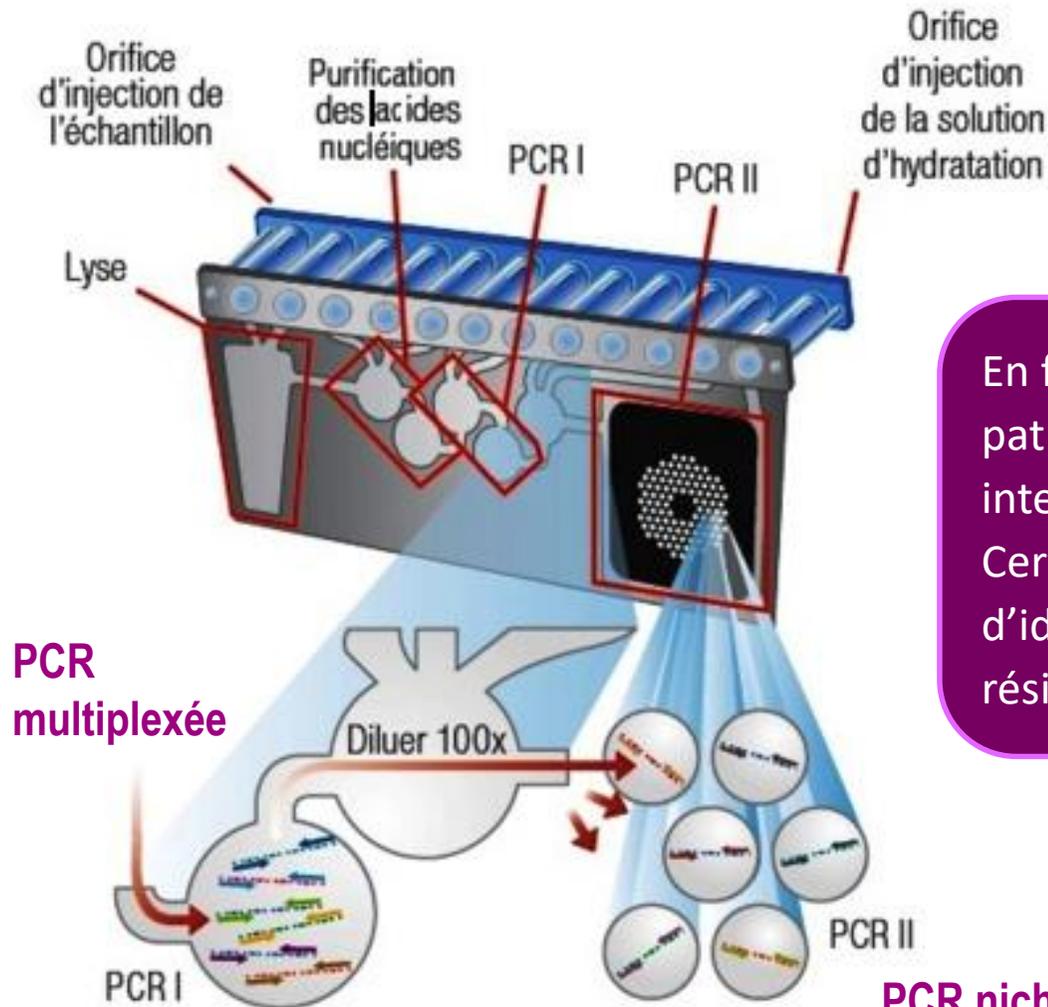
- ❑ Détection directe (oligonucléotides spécifiques)
- ❑ Technique associant amplification de la cible et chimie de fluorescence
- ❑ Plusieurs techniques
 - La plus classique : agent se liant à l'ADN double brin (SYBR Green, agent intercalant)
- ❑ Avantages
 - Rapidité
 - Spécificité et sensibilité augmentées



L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration de l'amplicon, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycle requis ou le signal d'émission est considéré supérieur à la ligne de base.

Les kits qPCR par syndromes

□ Principe de ces kits (exemple du FilmArray®)



En fonction du kit : détection de nombreux pathogènes respiratoires, gastro-intestinaux ou responsables de méningites. Certains kits permettent, en complément, d'identifier directement des gènes de résistance

PCR nichée, une seule par puits

Quelle démarche à la réception d'un prélèvement bactérien ?

- 1- Observation microscopique → Identification génotypique
- 2 - Mise en culture
- 3- Identification phénotypique
- 4- Étude de la sensibilité aux antibiotiques

Diagnostic direct
(identification de la bactérie
ou d'un composant bactérien)

MAIS, dans de rares cas en bactériologie, le **diagnostic est indirect** par **analyse sérologique**