



République algérienne démocratique et populaire Ministère
de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université des Sciences et Technologie, Mohamed Boudiaf, Oran
Faculté des Sciences de la nature et de la vie
Département de Biotechnologie

Polycopie Pédagogique : Cours

Module : Systématique Moléculaire Bactérienne

Enseignante : Gharbi Samia
Maitre des Conférences A

Année Universitaire 2021 -2022

Table des matières

1.	Introduction	1
2.	Brève histoire de la microbiologie	3
3.	La cellule bactérienne	5
3.1.	La paroi :	8
3.1.1.	La coloration différentielle :	10
3.1.2.	La préparation et la coloration des échantillons	10
3.1.3.	La fixation	10
3.2.	Une membrane plasmique.....	12
3.3.	Un cytoplasme.	13
3.4.	Un appareil nucléaire.....	14
3.4.1.	ADN	14
3.4.2.	Le plasmide.....	14
3.5.	La capsule.....	15
3.6.	Les flagelles.....	15
3.7.	Les pilis.....	16
3.8.	Spore	16
4.	Croissance bactérienne	17
4.1.	Culture des bactéries	17
4.2.	Cinétique de la croissance bactérienne	18
4.3.	Besoins nutritifs	19
4.4.	Pénétration des éléments nutritifs.....	20
4.5.	Conditions physico-chimiques de la culture	20
4.5.1.	Température	20
4.5.2.	pH	21
4.5.3.	Pression osmotique.....	22
4.5.4.	Oxygène.....	22
4.6.	Métabolisme énergétique	23
4.7.	Milieux de culture en bactériologie	23
5.	Variations génétiques chez les bactéries.....	26
5.1.	Mutations.....	26
5.2.	Transposition.....	26
5.3.	Transfert de matériel génétique	27
5.3.1.	Transformation	27
5.3.2.	Transduction.....	27
5.3.3.	Conjugaison.....	28
6.	Facteurs de pathogénicité	30
6.1.	Adhésines	30
6.2.	Invasion des cellules non phagocytaires.....	31
6.3.	Résistance à la phagocytose	31
6.4.	Persistance dans les phagocytes	31
6.5.	Toxines protéiques.....	32
6.6.	Lipopolysaccharide ou endotoxine	32
7.	Classifications des bactéries	33
7.1.	Historique	33
7.2.	Taxonomie des micro-organismes	34
7.2.1.	Classification phénétique	34
7.2.2.	Taxonomie numérique.....	35

7.2.3.	Classification phylogénétique (ou classification phylogénique)	35
8.	Classification de Bergey	36
8.1.	Bacteria	36
8.2.	Domaine Bacteria ou Eubacteria.....	37
9.	Les principaux groupes de Bactéries	42
9.1.	Les protéobactéries	42
9.2.	Sous-groupe : les protéobactéries alpha (α)	42
9.3.	Sous-groupe : les protéobactéries bêta (β)	42
9.4.	Sous-groupe : les protéobactéries gamma (γ).....	43
9.5.	Sous-groupe : les protéobactéries delta (δ)	43
9.6.	Sous-groupe : les protéobactéries epsilon (ϵ)	44
9.7.	Les chlamydiae	44
9.8.	Les Spirochètes	44
9.9.	Les cyanobactéries	45
9.10.	Les Bactéries à gram positif	45
10.	Identification.....	47
10.1.	Tests biochimiques utilisés dans l'identification des bactéries	48
11.	Principaux tests d'orientation.....	50
11.1.	Isolement et purification des bactéries.....	50
11.2.	Identification des bactéries	51
11.2.1.	Etude macroscopique	51
11.2.2.	Etude microscopique	51
11.2.3.	Étude du type respiratoire	53
11.2.4.	Recherche de la catalase	56
11.2.5.	Recherche d'une cytochrome oxydase	58
11.2.6.	Étude des accepteurs minéraux, recherche d'une nitrate réductase	61
11.2.7.	Étude du métabolisme glucidique.....	64
11.2.8.	Milieu mannitol-mobilité.....	64
11.2.9.	Étude de la fermentation de plusieurs sucres pour l'identification des entérobactéries	65
12.	Identification moléculaire des bactéries.....	66
12.1.	Acides nucléiques bactériens	66
12.2.	Méthodes d'analyse des acides nucléiques au laboratoire	68
12.2.1.	Extraction de l'ADN.....	68
12.2.2.	Amplification de l'ADN.....	68
12.2.3.	Analyse du produit d'amplification.....	70
12.2.4.	Organisation du laboratoire de biologie moléculaire	71
12.2.5.	Détection moléculaire des bactéries	72
12.2.6.	Typage moléculaire des bactéries	73
12.2.7.	Typage moléculaire par analyse de profils.....	73
12.2.8.	Typage moléculaire par séquençage nucléotidique	73
12.2.9.	Détection moléculaire de la résistance aux antibiotiques	73
13.	Cocci à Gram positif	75
13.1.	Les Staphylocoques	75

13.2.	Streptocoques	79
13.3.	Genre <i>Aerococcus</i>	83
13.4.	Genre <i>Gemella</i>	83
13.5.	Genres <i>Leuconostoc</i> - <i>Pediococcus</i>	84
13.6.	Genre <i>Stomatococcus</i>	84
14.	<i>Neisseria</i>	85
15.	<i>Acinetobacter</i>	88
16.	Bacille à Gram positif aérobies	91
16.1.	<i>Corynebacterium</i>	91
16.2.	<i>Listeria</i>	93
16.3.	<i>Bacillus</i>	95
17.	<i>Enterobacteriaceae</i>	99
18.	Bacilles à Gram négatif à croissance difficile	102
18.1.	<i>Cardiobacterium hominis</i>	102
19.	Bacilles à Gram négatif aérobies stricts	105
19.1.	<i>Pseudomonas</i>	105
20.	Autres bacilles non fermentant	111
20.1.	<i>Flavobacterium</i>	111
20.2.	<i>Agrobacterium</i>	113
20.3.	<i>Xanthomonas</i>	113

Liste des Tableaux

TABLEAU 1: COMPOSITION CHIMIQUE DE LA PAROI BACTERIENNE.....	9
TABLEAU 2: LES GAMMES DE TEMPERATURE POUR LA CROISSANCE MICROBIENNE.....	21
TABLEAU 3: LES DEUX CLASSIFICATIONS DES ETRES VIVANTS.....	34
TABLEAU 4: PHYLUM X CYANOBACTERIA.....	39
TABLEAU 5: PHYLUM XII PROTOBACTERIA.....	40
TABLEAU 6: PHYLUM XII FIRMICUTES.....	39
TABLEAU 7: AUTRES PHYLUMS.....	41

Liste des figures

FIGURE 1: DIAGRAMME DE CONCEPT MONTRANT LES DIVERS TYPES D'ENTITES BIOLOGIQUES :.....	3
FIGURE 3: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA CELLULE BACTERIENNE (FAUCHER & LACHAINE, 2012).....	7
FIGURE 4: DIFFERENTES FORMES BACTERIENNE.....	7
FIGURE 5: DIFFERENCE ENTRE LA PAROI GRAM POSITIF ET GRAM NEGATIF (FAUCHER & LACHAINE, 2012).....	9
FIGURE 6: ETAPES DE LA COLORATION DE GRAM.....	12
FIGURE 7: MEMBRANE CYTOPLASMIQUE.....	13
FIGURE 8: STRUCTURE BACTERIENNE (EN PRESENCE D'UNE CAPSULE).....	15
FIGURE 9 : CAPSULE BACTERIENNE.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
FIGURE 10: DIFFERENTES FORMES DES FLAGELLES BACTERIENS.....	15
FIGURE 11: DIFFERENTES TYPES DE SPORES BACTERIENNES.....	16
FIGURE 12: LA CROISSANCE BACTERIENNE SE DERoule CLASSIQUEMENT EN 4 PHASES :.....	18
FIGURE 13: LES GAMMES DE TEMPERATURE POUR LA CROISSANCE MICROBIENNE.....	21
FIGURE 14: CROISSANCE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN OXYGENE.....	23
FIGURE 15: LA CONJUGAISON ET LA RECOMBINAISON CHEZ E. COLI.....	29

1. Introduction

Les micro-organismes sont différents et leur classification a toujours été un défi pour les taxinomistes. Leur description initiale soit comme plantes soit comme animaux était trop simple. Par exemple, certains sont mobiles comme les animaux, mais ont également des parois ou sont photosynthétiques comme les végétaux. Ces microorganismes ne peuvent être aisément placés dans l'un ou l'autre règne.

Un autre facteur important dans le classement des micro-organismes est que certains sont composés de cellules procaryotes et d'autres de cellules eucaryotes. Les cellules procaryotes (du grec pro, avant, et karyon, amande) ont une morphologie plus simple que les cellules eucaryotes et n'ont pas de noyau limité par une enveloppe.

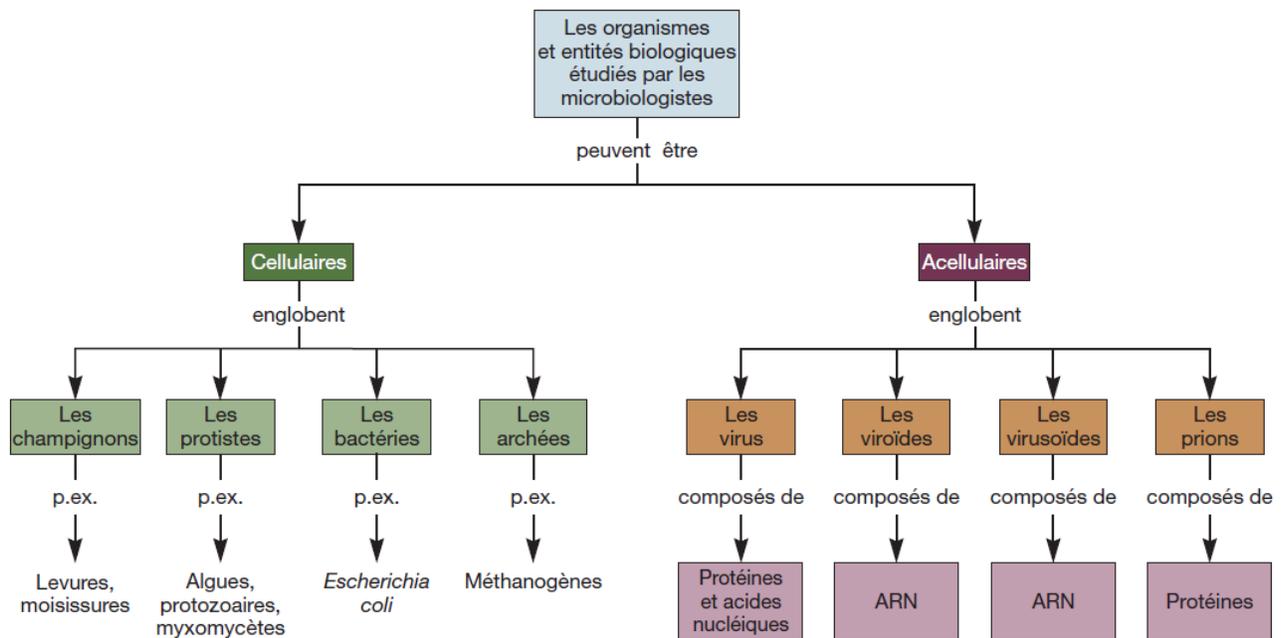
Par contre, les cellules eucaryotes (du grec eu, vrai, et karyon, amande) ont un noyau entouré d'une enveloppe, leur morphologie est plus complexe et elles sont habituellement plus grandes que les cellules procaryotes.

Ces observations ont alors conduit au développement d'un schéma de classification répartissant les organismes en 5 règnes : *Monera*, *Protista*, *Fungi*, *Animalia* et *Plantae* (Figure 1).

Les microorganismes (exception faite des virus qui sont acellulaires et qui ont leur propre système de classification) furent placés dans les trois premiers règnes. Dans ce schéma, tous les organismes pourvus d'une structure cellulaire procaryotique furent placés dans les *Monera*. (Coyette & Mergeay, 2013).

Les bactéries sont généralement des organismes unicellulaires dont la plupart ont des parois contenant le peptidoglycane, une molécule structurante.

Les bactéries sont abondantes dans le sol, l'eau et l'air et sont également les principaux habitants de notre peau, de notre bouche et de nos intestins. Certaines bactéries vivent dans des environnements aux températures, pH ou salinité extrêmes. Bien que certaines provoquent des maladies, de nombreuses bactéries ont des rôles bénéfiques tels que le recyclage des éléments dans la biosphère, la dégradation des matières végétales et animales et la production de vitamines. Les cyanobactéries (autrefois appelées algues bleu-vert) produisent des quantités importantes d'oxygène par la photosynthèse (Coyette & Mergeay, 2013).



d'entités biologiques :

(Coyette & Mergeay, 2013)

2. Brève histoire de la microbiologie

Des maladies bactériennes telles que (La peste; La lèpre; Le choléra), ces maladies sont connues depuis l'Antiquité ainsi que (Le tétanos; L'érysipèle; La dysenterie) découverte par le médecin grec Hippocrate au Ve siècle avant J-C. D'autres maladies (syphilis, typhus) ont été décrites depuis le XVIe siècle,

- ✓ L'histoire de la microbiologie est une combinaison réunissant une technologie permettant de mettre en évidence l'invisible (microscopie) et sur la recherche sur la nature des maladies infectieuses.
- ✓ Bien qu'il n'ait pas inventé le microscope, le savant hollandais Antonie Van Leeuwenhoek fut le premier

à observer et décrire correctement la vie microbienne, qu'il appela toutes ces formes vivantes « animalcules ».

- ✓ À propos de la génération spontanée, la controverse s'est poursuivie pendant le 19^{ème} siècle, pour finalement réfutée par le microbiologiste français Louis Pasteur, entre autres.
- ✓ Le médecin allemand Robert Koch a étudié avec précision la maladie du charbon et il a pu cultiver l'agent qui en est responsable.
- ✓ Ce n'est que dans la deuxième moitié du XIX^e siècle que les microorganismes furent découverts à nouveau et étudiés avec tout d'abord la découverte en 1850 par Rayer et Davaine du bacille du charbon (*Bacillus anthracis*).
- ✓ Le bacille de la lèpre par Hansen (*Mycobacterium leprae*) en 1873 :
- ✓ Le bacille de la typhoïde par Eberth (*Salmonella Typhi*) en 1880 :
- ✓ Le bacille diphtérique par Loefner (*Corynebacterium diphtheriae*) en 1884 :
- ✓ Le staphylocoque (*Staphylococcus*) et le streptocoque de l'érysipèle (*Streptococcus*) par Rosenbach
- ✓ Le méningocoque par Weichselbaum en 1887 :
- ✓ L'agent de la fièvre méditerranéenne en 1887:

- ✓ Le bacille tétanique (*Clostridium tetani*) par Kitasato en 1889 :
- ✓ *Clostridium perfringens* par Welch et Nuttall en 1892 ;
- ✓ Le coccobacille de la peste par Yersin et Kitasato (*Yersinia pestis*) en 1894 :
- ✓ Le bacille dysentérique par Shiga (*Shigella dysenteriae*) en 1898.
- ✓ De nouvelles bactéries pathogènes pour l'homme ont été découvertes parmi lesquelles :
- ✓ Le bacille de la coqueluche par Bordet-Gengou (*Bordetella pertussis*) en 1901 :
- ✓ Le tréponème de la syphilis par Schaudinn (*Treponema pallidum*) en 1905 :
- ✓ Le streptocoque du rhumatisme articulaire aigu (RAA) (*Streptococcus pyogenes*) par Dick en 1924.

3. La cellule bactérienne

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires). On distingue aussi les bactéries proprement dites (Bacterio) des bactéries primitives (Archaeo).

Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1 µm. On peut les voir au microscope optique, à l'état frais

ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (bacilles), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes) (Figure 3). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscopie électronique.

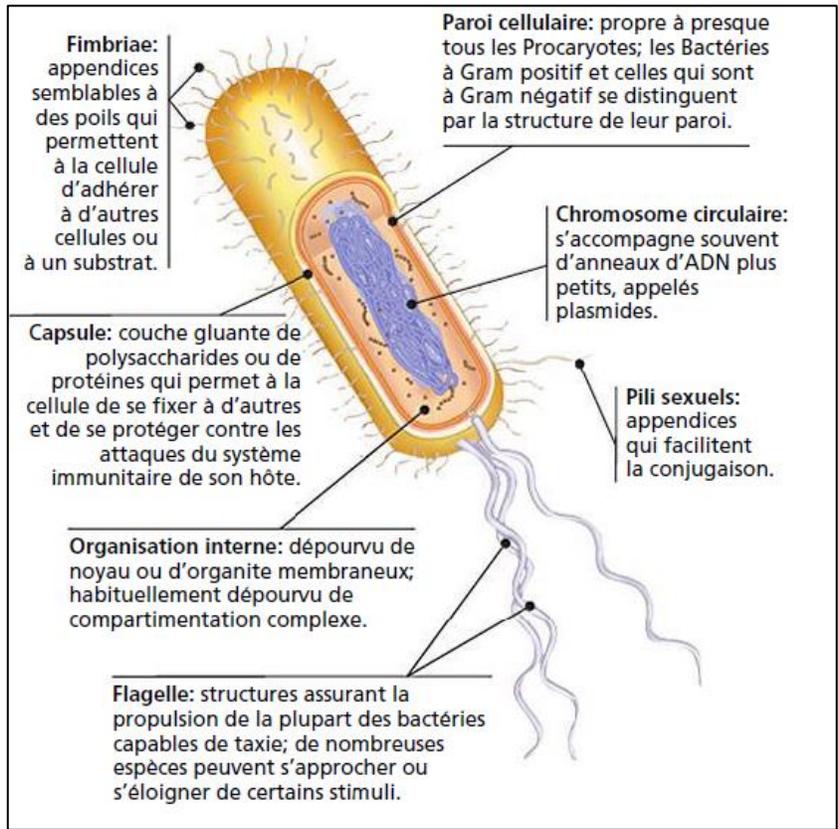


Figure 2: Représentation schématique de la cellule bactérienne (Faucher & Lachaine, 2012)

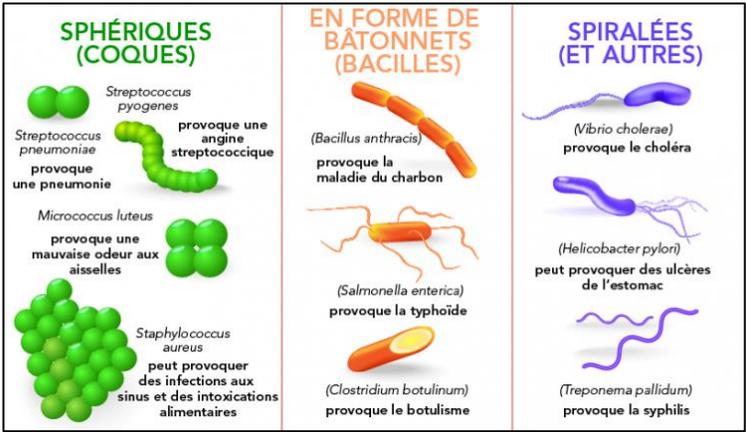


Figure 3: Différentes formes bactérienne

Le cytoplasme des bactéries contient de nombreux ribosomes et un chromosome fait d'ADN à double brin, en général unique, circulaire. Le chromosome est le siège de nombreux replis lui permettant d'occuper une place très réduite par rapport à sa longueur. Le séquençage complet de l'ADN chromosomique a été réalisé dans plusieurs espèces bactériennes. À côté du chromosome, on peut trouver chez certaines bactéries un ou plusieurs plasmides. Ce sont des molécules d'ADN circulaires beaucoup plus petites que le chromosome. Les bactéries sont des procaryotes, la cellule bactérienne est constituée des éléments constitutifs complexes, on distingue des structures obligatoires, présentes chez toutes les bactéries et des structures dont la présence est facultative.

3.1. La paroi:

Son épaisseur est variable, elle représente 20 % du poids sec de la cellule. Sa composition différente selon les bactéries permet de les classer en deux groupes. Elle consiste au minimum en peptidoglycane, polymère propre aux bactéries. Ce polymère forme un réseau de filaments polysaccharidiques reliés par des liaisons croisées entre chaînes latérales peptidiques (Figure 4).

C'est une structure importante, parce qu'elle conserve la forme de la cellule et l'empêche de gonfler et d'éclater dans les solutions hypotoniques les plus répandues dans l'environnement. (Bouharmont, et al., 2017).

Tableau 1:Composition chimique de la paroi bactérienne.
Les % sont exprimés par rapport à la matière sèche (simplifié.)(Laberche, 2010)

	Bactéries Gram +	Bactéries Gram -
Hexosamine	16 à 20 %	2 à 4 %
Acides aminés	24 à 34 %	40 %
Nombre d'acides aminés	4-10	16-17
Acides téichoïques	Présence	Absence
Lipides	1 à 2 %	10 à 20 %
Oses simples	20	60 %

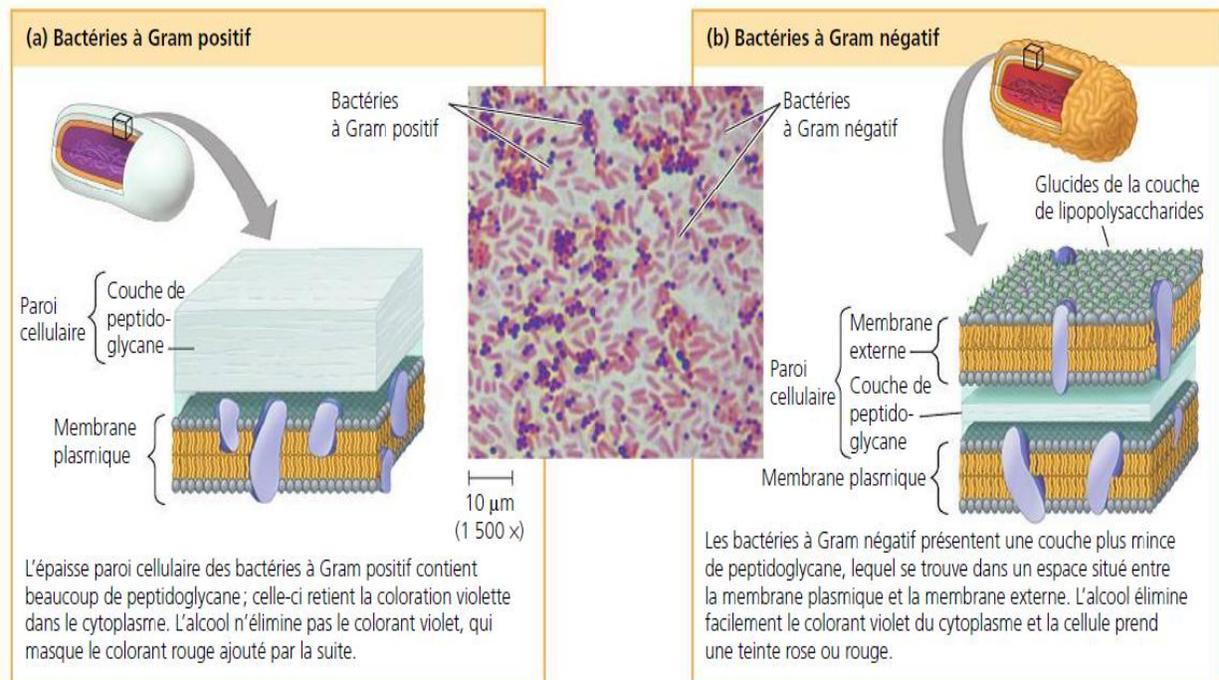


Figure 4: Différence entre la paroi Gram positif et Gram négatif(Faucher & Lachaine, 2012)

3.1.1. La coloration différentielle:

La coloration de Gram, développée en 1884 par le médecin danois Christian Gram, est la méthode de coloration la plus largement utilisée en bactériologie.

La coloration de Gram permet de diviser les bactéries en deux classes : (Gram-négatives et Gram positives).

3.1.2. La préparation et la coloration des échantillons

Bien que les micro-organismes vivants puissent être directement examinés au microscope optique, ils doivent souvent être fixés et colorés pour augmenter la visibilité, pour accentuer les particularités morphologiques spécifiques et pour les conserver en vue d'études ultérieures.

3.1.3. La fixation

Les cellules colorées, observées au microscope, devraient ressembler le plus possible aux cellules vivantes. La fixation est le procédé par lequel les structures internes et externes des cellules et des organismes sont conservées et fixées en place. Elle inactive les enzymes qui peuvent détruire la morphologie cellulaire et durcit les structures pour qu'elles ne se modifient pas durant la coloration et l'observation. Le micro-organisme est habituellement tué et fermement fixé à la lame porte-objet durant la fixation. Il y a deux types fondamentalement différents de fixation:

Les bactériologistes utilisent régulièrement une fixation à la chaleur pour observer les procaryotes. Ils chauffent doucement un film bactérien (un frottis) sèche à l'air en le passant dans une flamme. Cela conserve correctement la morphologie générale mais pas les structures intracellulaires.

La fixation chimique doit être utilisée pour protéger les structures cellulaires fines et la morphologie de microorganismes plus grands et plus délicats. Les fixateurs chimiques pénètrent dans les cellules et réagissent avec les composants cellulaires, généralement les protéines et les lipides, afin de les rendre inactifs, insolubles et immobiles. Les mélanges de fixateurs les plus courants contiennent des composés tels que l'éthanol, l'acide acétique, le chlorure mercurique, le formaldéhyde et le glutaraldéhyde (Coyette & Mergeay, 2013).

Dans la première étape de la coloration de Gram, frottis est coloré avec le cristal violet, un colorant basique, pour obtenir une coloration primaire. Ensuite la préparation est traitée avec une solution d'iode qui agit comme un mordant, c'est-à-dire qu'elle augmente les interactions entre la cellule et le colorant pour que la cellule soit plus fortement contrastée. Le frottis est alors décoloré par lavage avec de l'éthanol ou de l'acétone. Cette étape engendre l'aspect différentiel de la coloration de Gram ; les bactéries:

- Gram-positives gardent le cristal violet, tandis que les bactéries
- Gram-négatives le perdent et se décolorent.

Enfin, le frottis est contre-coloré à l'aide d'un colorant basique de couleur différente (Figure 5). La safranine, le contre colorant le plus commun, colore les bactéries Gram-négatives en rose ou rouge et laisse les bactéries Gram-positives colorées en violet foncé (Coyette & Mergeay, 2013).

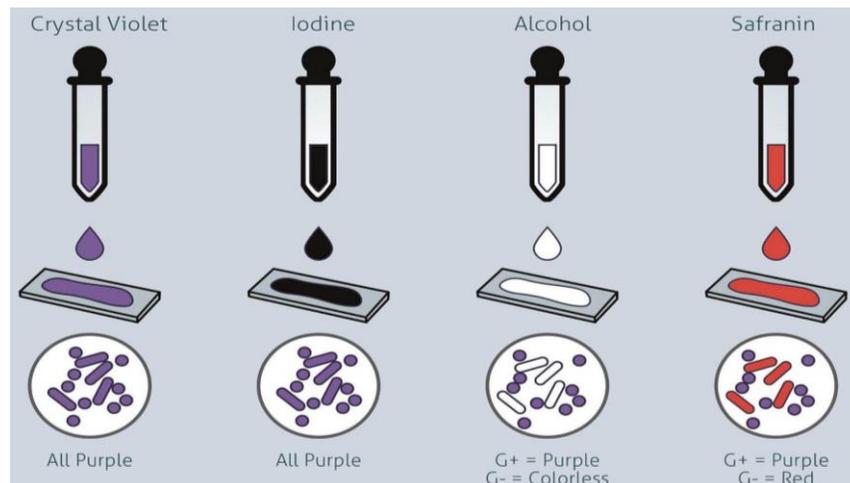


Figure 5: Etapes de la coloration de Gram

3.2. Une membrane plasmique.

Appelée aussi plasmalemmme, elle a une structure classique (membrane tripartite en microscopie électronique) et assure la perméabilité sélective des ions pénétrant à l'intérieur de la bactérie. Elle est aussi le siège de nombreuses activités enzymatiques. Cette membrane

peut présenter des invaginations complexes, plus ou moins feuilletées (Figure6). Ce sont les mésosomes qui auraient un rôle dans la réplication de l'ADN et dans la synthèse de la paroi lors de la division(Laberche, 2010).

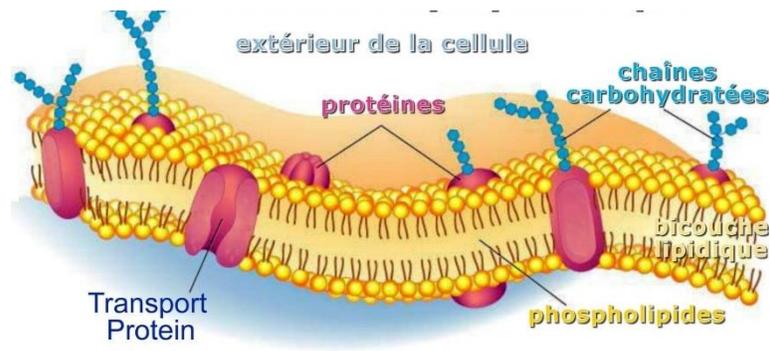


Figure 6:Membrane cytoplasmique

3.3. Un cytoplasme.

Le cytoplasme fondamental ou hyaloplasme, possède-lui aussi les mêmes caractéristiques que celui de toute cellule vivante. Cependant, les inclusions peuvent être différentes de celles des Eucaryotes. En microscopie électronique on peut y voir :

- des ribosomes (de 10 000 à 20 000 par cellule) ;
- des grains de polysaccharide proches du glycogène ;
- des grains d'amylose (amidon bactérien) ;
- des corpuscules de polyphosphates inorganiques ;
- des lipides ;

- des pigments (qui bien souvent donnent leur nom à la bactérie : le Staphylocoque doré par exemple).(Laberche, 2010)

3.4. Un appareil nucléaire.

Il n'existe pas de « vrai noyau » chez les bactéries. De nature fibrillaire dense, il ne comporte ni membrane limitante, ni nucléole.(Laberche, 2010)

3.4.1. ADN

Cet appareil nucléaire se limite en un filament unique d'ADN fermé sur lui-même, le chromosome, attaché au plasmalemme. Chez le colibacille, la molécule d'ADN, circulaire et d'une longueur de 1,2 mm environ, comprendrait près de 340 000 paires de nucléotides(Laberche, 2010).

3.4.2. Le plasmide.

C'est une molécule d'ADN circulaire, extrachromosomique de petite taille (1/100e environ de celle du chromosome) capable de s'autoreproduire en liaison avec des sites membranaires et indépendamment de la réplication du chromosome.(Laberche, 2010)

À ces cinq éléments constants, il convient d'ajouter des éléments facultatifs.

3.5. La capsule.

Certaines bactéries, possèdent une capsule mucogélatineuse entourant la paroi cellulaire (Figure8). Elle est de nature chimique variée, le plus souvent polysaccharidique, mais aussi parfois polypeptidique.(Laberche, 2010)

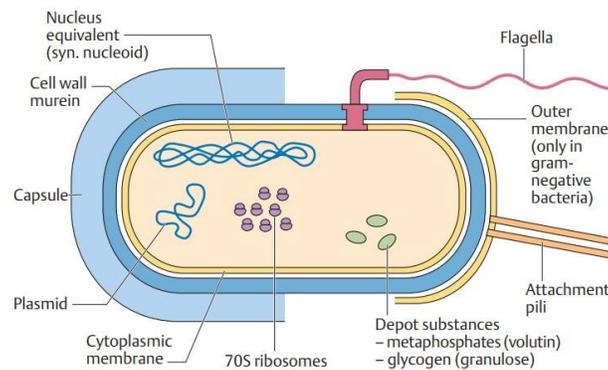


Figure 7: Structure bactérienne (en présence d'une capsule)

3.6. Les flagelles.

Ce sont des filaments plus ou moins sinueux parfois plus longs que la cellule elle-même (Figure 8). Composés de protéines, ils assurent le déplacement des bactéries.(Laberche, 2010)

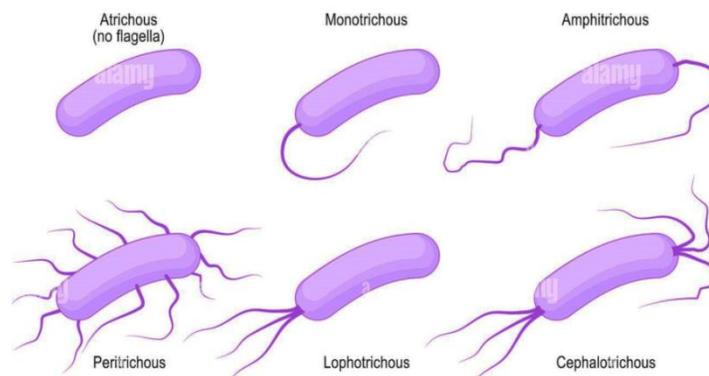


Figure 8: différentes formes des flagelles bactériens

3.7. Les pilis.

Ils sont composés de pilines, protéines de structure hélicoïdale. Ils ont un rôle dans l'agglutination des cellules. Les pilis sexuels, plus longs et plus épais ont un rôle dans la fixation des cellules en début de conjugaison. Les bactéries se multiplient par voie végétative : chaque cellule se divise par(Laberche, 2010)

3.8. Spore

Certaines bactéries à Gram positif, en particulier des bactéries du sol, sont capables de se différencier en spores (Figure 9), lorsqu'elles se trouvent dans des conditions défavorables. Les spores résistent à la dessiccation et à la chaleur. Elles peuvent persister très longtemps dans l'environnement. Leur résistance à la chaleur explique les températures qu'il faut atteindre au cours des procédures de stérilisation (120°C en chaleur humide). Dans des conditions favorables les spores redonnent naissance à des formes végétatives.

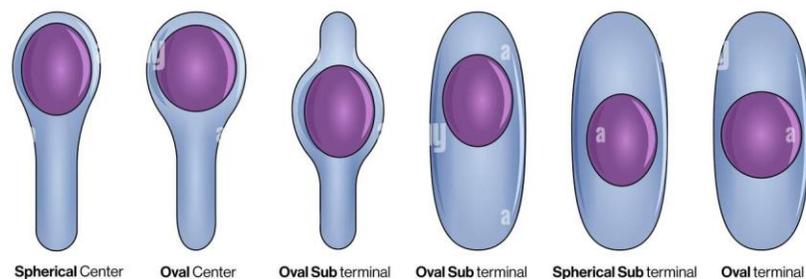


Figure 9: Différentes types de spores bactériennes

4. Croissance bactérienne

4.1. Culture des bactéries

On utilise habituellement pour cultiver les bactéries des milieux complexes à base d'extraits ou d'hydrolysats enzymatiques de viandes. Ces milieux peuvent être liquides (bouillons) ou solides. La solidification des milieux est obtenue par l'addition de gélose, un extrait d'algues qui a la propriété de fondre à l'ébullition et de se solidifier à des températures inférieures à 40°C.

En milieu liquide, les bactéries se dispersent librement et leur multiplication se traduit par un trouble, le plus souvent homogène. Sur un milieu solide, les bactéries se déposent à la surface. Lorsque la quantité de bactéries est faible, chaque bactérie va pouvoir se multiplier sur place jusqu'à former un amas de bactéries visible à l'œil nu, que l'on appelle colonie. (Si la densité bactérienne est trop élevée dans l'échantillon ensemencé, les colonies sont confluentes et forment une nappe.) L'emploi de milieux solides permet ainsi le dénombrement des bactéries viables dans un échantillon. Il suffit en effet pour cela d'étaler sur des milieux solides (gélés) un volume connu de différentes dilutions de l'échantillon et de compter les colonies obtenues avec la dilution adéquate. Un autre intérêt des milieux solides est qu'ils permettent d'apprécier la morphologie des colonies qui peut varier selon les espèces bactériennes.

4.2. Cinétique de la croissance bactérienne

Elle s'étudie en milieu liquide, soit par turbidimétrie, soit par dénombrement des unités formant colonie (comme décrit précédemment). Après une phase de latence, les bactéries se multiplient de manière exponentielle. Dans des conditions favorables, le temps de doublement de la plupart des bactéries rencontrées en pathologie est de l'ordre de 30 minutes et leur concentration peut atteindre IOE à 10^9 par ml. Puis la croissance s'arrête, c'est la phase stationnaire, suivie d'une baisse progressive du nombre de bactéries viables (Figure 10).

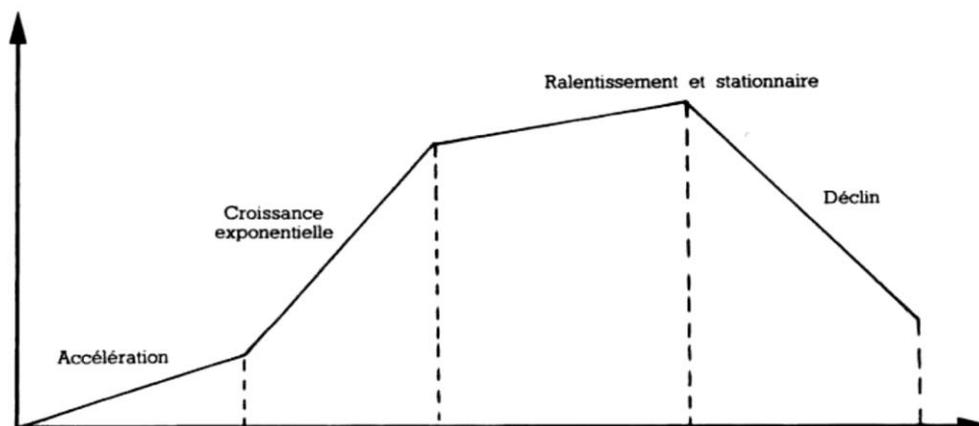


Figure 10: La croissance bactérienne se déroule classiquement en 4 phases :

- Phase de latence (les bactéries s'adaptent au milieu de culture).
- Phase exponentielle (les bactéries se divisent).
- Phase stationnaire (les nutriments ne sont plus aussi abondants).
- Phase de décroissance (les bactéries meurent par manque de nutriments)

4.3. Besoins nutritifs

Ils sont très variables suivant les bactéries, mais certains besoins de base sont communs:

- Eau,
- Ions : principalement K^+ , Mg^{++} et phosphates,
- L'azote et le soufre sont apportés, selon les cas, sous forme minérale ou organique ;
- Source de C : certaines bactéries de l'environnement peuvent utiliser le CO_2 atmosphérique et, à partir de ce dernier et d'éléments minéraux, synthétiser tous leurs composants. Ces bactéries sont dites autotrophes. Les bactéries que l'on rencontre en pathologie sont des bactéries hétérotrophes, c'est-à-dire des bactéries ayant besoin d'un apport de C sous forme organique, en général sous forme de sucre. Toutefois l'addition de CO_2 dans l'atmosphère améliore souvent la croissance de ces bactéries ;
- Oligoéléments : fer en particulier, mais aussi Co^{2+} , Mn, Zn
- Facteurs de croissance : certaines bactéries sont capables de réaliser toutes leurs synthèses avec les éléments énumérés ci-dessus. D'autres bactéries, dites auxotrophes, sont incapables de synthétiser certains constituants, comme par exemple un acide aminé ou un coenzyme. Ces

constituants doivent alors être présents dans le milieu de culture pour permettre la croissance bactérienne et sont appelés facteurs de croissance.

4.4. Pénétration des éléments nutritifs

Les petites molécules peuvent traverser la membrane cytoplasmique (et la membrane externe des bactéries à Gram négatif). La traversée peut se faire passivement ou à l'aide de systèmes de transport actif, comme les perméases.

L'absorption du fer est facilitée par sa combinaison préalable à des molécules sécrétées par la bactérie, les sidérophores.

Les grosses molécules peuvent être dégradées par des exoenzymes produites par certaines bactéries

4.5. Conditions physico-chimiques de la culture

4.5.1. Température

La plupart des bactéries rencontrées en pathologie ont une température optimale de croissance voisine de 37°C, mais pour certaines cette température est de l'ordre de 30°C. La plupart des bactéries ne se multiplient pas à basse température, mais certaines (comme *Listeria*) peuvent continuer à se multiplier à des températures proches de 0°C. Les bactéries non sporulées que l'on rencontre en pathologie sont tuées à des températures dépassant 60°C.

Par Contre, certaines bactéries de l'environnement, dites thermophiles, peuvent se multiplier à des températures élevées (Figure 11).

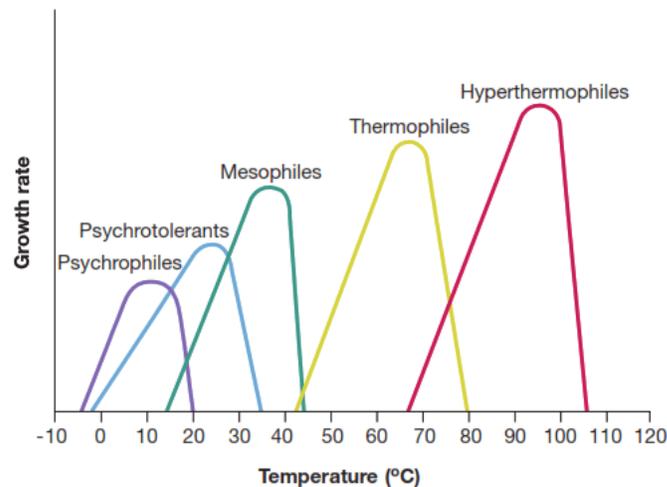


Figure 11: Les gammes de température pour la croissance microbienne

4.5.2. pH

Les pH optima sont proches de la neutralité. La tolérance aux variations de pH est très variable suivant les bactéries (tableau 02).

Tableau 2: Les gammes de température pour la croissance microbienne

Les microorganismes	Optimum de croissance	Exemples
Acidophiles	pH = 0 - 5,5	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> <i>Ferroplasma acidarmanus</i> <i>Picrophilus oshimae</i>
Neutrophiles	pH = 6 - 8	La majorité des bactéries
Alcalophiles	pH ≥ 8	<i>Microcystis aeruginosa</i>
Alcalophiles extrêmes	pH ≥ 10	<i>Bacillus alcalophilus</i>

4.5.3. Pression osmotique

Grâce à leur paroi, les bactéries sont relativement tolérantes aux variations de pression osmotique. Toutefois des concentrations élevées de NaCl ou de sucre inhibent la croissance bactérienne- Ces procédés sont utilisés pour la conservation de certains aliments. Certaines bactéries, dites halophiles, adaptées au milieu marin, ne cultivent pas en l'absence d'une concentration minimale de

4.5.4. Oxygène

Les bactéries se divisent en plusieurs catégories selon leur relation avec l'oxygène atmosphérique:

Les bactéries aérobies ne cultivent qu'en présence d'oxygène ;

Les anaérobies ne cultivent qu'en l'absence d'oxygène (ce qui nécessite des conditions de culture spécifiques) ;

Les aérobies-anaérobies facultatives cultivent en présence ou en l'absence l'oxygène. Ce sont les plus fréquentes en pathologie ;Une dernière catégorie est constituée par les bactéries micro-aérophiles qui ne cultivent que sous une faible pression d'oxygène (Figure 12).

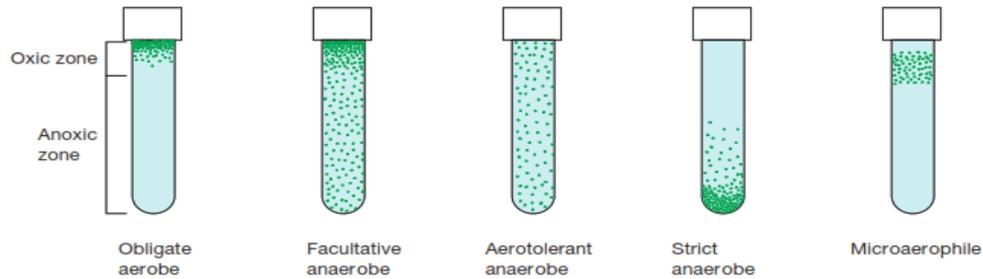


Figure 12: Croissance en fonction de la concentration en oxygène

4.6. Métabolisme énergétique

Très schématiquement on peut opposer les bactéries ayant un métabolisme fermentatif et celles ayant un métabolisme de type respiratoire.

Chez les premières la dégradation du glucose est incomplète et aboutit à la formation de divers composés organiques (en particulier d'acides Organiques). Chez les secondes le processus respiratoire permet la dégradation du glucose dans le cycle de Krebs L'accepteur final d'électrons est alors l'oxygène. Chez les bactéries le système de transport d'électrons est situé dans la membrane cytoplasmique.

4.7. Milieux de culture en bactériologie

On utilise des milieux liquides et des milieux solides. Les milieux liquides ont l'avantage de pouvoir êtreensemencés avec un échantillon plus important et de faciliter la croissance des bactéries fragiles. Ils ne sont utilisés que pour

des prélèvements provenant de sites normalement stériles (sang, liquide de ponction). Le résultat de la culture est généralement ininterprétable en cas de contamination. Pour les hémocultures il existe des automates permettant de déceler une croissance bactérienne par la production de CO₂ (méthode plus sensible que l'appréciation de la turbidité).

Sur les milieux solides l'échantillon est déposé en un point et étalé par une série de stries successives à l'aide de la pointe d'une pipette Pasteur (manœuvre dite d'isolement).

Après incubation, la culture sur milieu solide permet d'apprécier :

Le nombre de colonies (donc la richesse bactérienne de l'échantillon);

L'aspect des colonies (qui peut Orienter le diagnostic),

Le caractère uniforme ou non des diverses colonies (ce qui permet de savoir si l'échantillon contient une ou plusieurs espèces bactériennes). Les milieux utilisés en routine sont des milieux complexes dont certains sont additionnés de sang et incubés entre 35 et 37°C, sous diverses atmosphères (air, air + CO₂, anaérobiose). Ces milieux permettent la croissance en 24 heures de la plupart des bactéries rencontrées en pathologie.

Toutefois il n'existe pas de conditions de culture convenant à toutes bactéries. Certaines nécessitent une culture prolongée (plusieurs jours, voire plusieurs semaines), une atmosphère à faible pression d'oxygène (bactéries micro-aérophiles), une température d'incubation de 30°C.

Certaines bactéries ne peuvent être cultivées que sur des milieux spécifiques (mycobactéries, Legionella, Mycoplasma). D'autres ne peuvent être cultivées que sur des cellules (Chlamydia, Rickettsia).

Enfin il est impossible de cultiver les agents de la syphilis et de la lèpre.

Lorsqu'un prélèvement provient d'une région où la flore commensale est abondante (selles, voies respiratoires) on peut avoir intérêt à utiliser des milieux dits sélectifs. Ces milieux contiennent des additifs (colorants, antibiotiques, NaCl) destinés à inhiber des bactéries autres que celles recherchées.

5. Variations génétiques chez les bactéries

Les bactéries sont des organismes haploïdes. La génétique bactérienne a pu se développer lorsque l'on a disposé de techniques permettant de détecter les mutants auxotrophes (mutants incapables de synthétiser un métabolite essentiel). Les modifications du patrimoine génétique des bactéries ont une grande importance en bactériologie médicale, car elles peuvent entraîner des modifications de leur pouvoir pathogène ou de leur sensibilité aux antibiotiques. Ces modifications du génome peuvent relever de plusieurs mécanismes.

5.1. Mutations

Le mécanisme le plus souvent en cause est la substitution d'un nucléotide par un autre, au moment de la réplication de l'ADN. Des mutations peuvent aussi être liées à des délétions ou bien à réinsertion dans un gène d'un ou plusieurs nucléotides supplémentaires.

Les modifications du patrimoine génétique engendrées par les mutations sont transmises à la descendance (transmission verticale). Certaines mutations sont réversibles (à faible fréquence).

5.2. Transposition

La présence d'éléments génétiques transposables est très fréquente chez les bactéries. Les éléments transposables sont des séquences d'ADN de longueur

variable, flanquées par des séquences répétées inversées. L'appariement de ces séquences inversées leur permet d'être excisés. Une fois excisé l'élément transposable peut être réinséré en un site variable du chromosome bactérien (ou d'un plasmide) sans qu'une homologie de séquence soit nécessaire. Les éléments transposables les plus simples ne contiennent que le gène codant une transposase assurant le phénomène de transposition. On les désigne sous le nom d'éléments IS (Insertion séquences). D'autres éléments, appelés transposons, contiennent des gènes supplémentaires.

5.3. Transfert de matériel génétique

Du matériel génétique peut parfois être transféré d'une bactérie à une autre (transmission horizontale). Ce transfert peut s'opérer par trois mécanismes différents.

5.3.1. Transformation

Des fragments d'ADN bactérien (pouvant être libérés lors de la lyse bactérienne) peuvent pénétrer dans d'autres bactéries et s'intégrer par recombinaison dans leur ADN. Ce processus ne s'observe que dans certaines espèces bactériennes, appartenant notamment aux genres *Streptococcus*, *Neisseria*, *Haemophilus*.

5.3.2. Transduction

Le transfert de matériel génétique fait intervenir ici des virus de bactéries, les bactériophages (ou phages).

Comme les autres virus, les phages ne possèdent qu'un seul type d'acide nucléique entouré d'une coque protéique. Un phage ne peut se fixer sur une bactérie que si elle possède, à sa surface, un récepteur spécifique, d'où l'étroite spécificité d'action des bactériophages. Après s'être fixé, le phage injecte son acide nucléique (le plus souvent de l'ADN) dans la bactérie.

5.3.3. Conjugaison

C'est probablement le mécanisme le plus fréquent dans la nature. C'est un transfert d'ADN entre deux bactéries accolées. Le transfert se fait d'une bactérie donatrice vers une bactérie réceptrice. La bactérie donatrice exprime à sa surface des structures permettant l'accolement (pili sexuels chez les bacilles à Gram négatif, adhésines chez les Gram positif). Le transfert concerne essentiellement des plasmides (Figure 14).

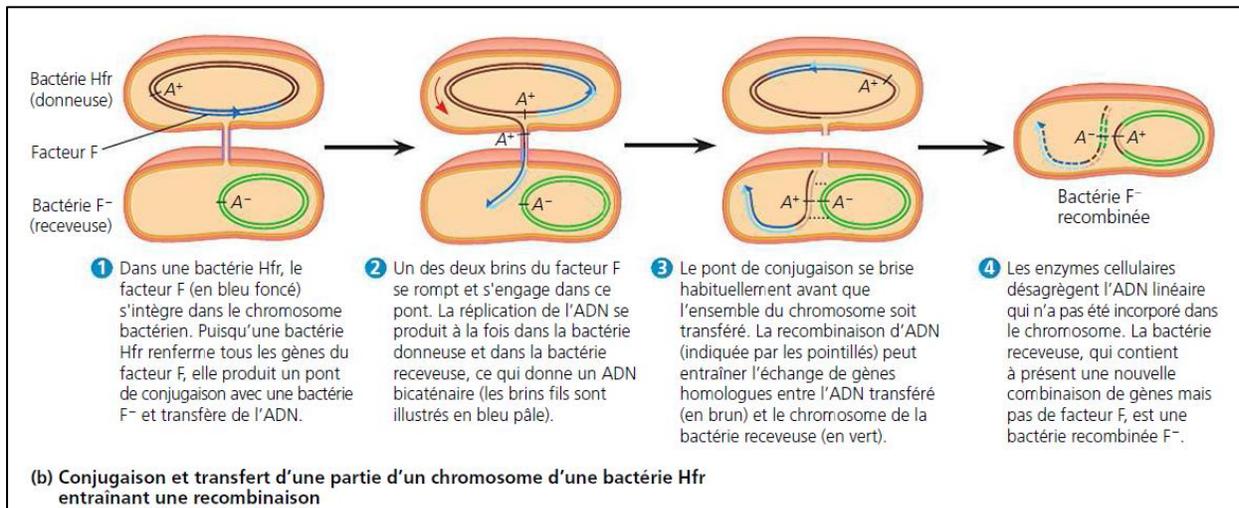
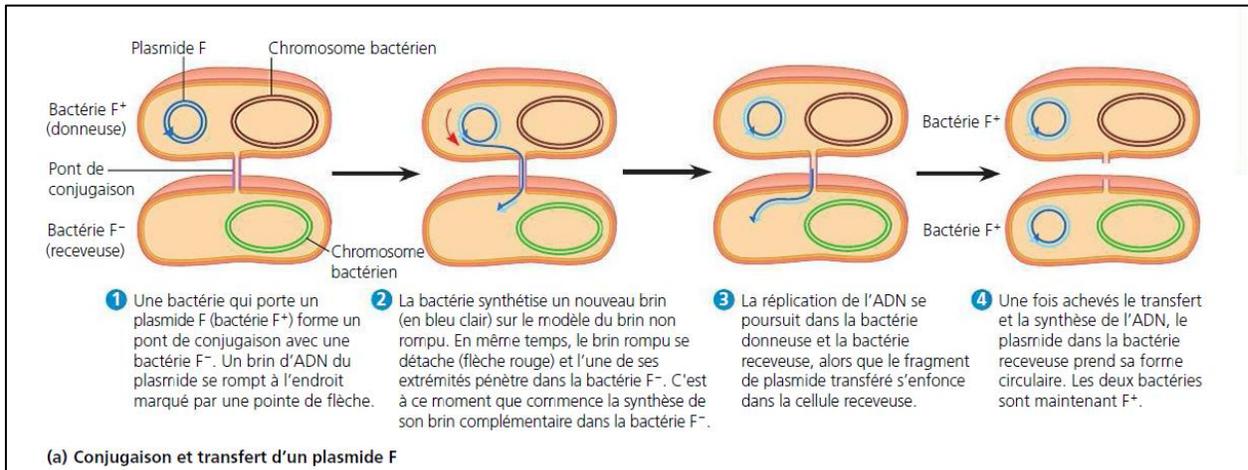


Figure 13: La conjugaison et la recombinaison chez *E. coli*.

La réplication de l'ADN qui accompagne le transfert d'un plasmide F ou d'une partie d'un chromosome bactérien Hfr est appelée réplication en cercle roulant. En fait, le brin d'ADN parent, circulaire et intact, « se déroule » lorsque son autre brin se détache et qu'un nouveau brin complémentaire est synthétisé (Faucher & Lachaine, 2012).

6. Facteurs de pathogénicité

On désigne comme pathogènes les bactéries capables de provoquer une maladie chez des sujets dont les mécanismes de défense sont normaux. Toutefois des bactéries classées comme pathogènes peuvent être hébergées sans produire de maladie. Les sujets qui les hébergent sont appelés porteurs Sains. D'autres bactéries sont présentes sur le revêtement cutanéomuqueux sans provoquer habituellement de dommage pour l'hôte. Il peut s'agir de bactéries dont la présence est habituelle (bactéries commensales) ou de bactéries de l'environnement dont la présence n'est que transitoire (bactéries saprophytes). Certaines de ces bactéries peuvent cependant devenir pathogènes lorsque les défenses de l'hôte sont affaiblies, ce sont des bactéries opportunistes.

L'expression de certains facteurs de pathogénicité peut être régulée par des signaux provenant de l'environnement de la bactérie tels que la température, la concentration en fer, en calcium ou en oxygène. Le contact avec une cellule eucaryote.

6.1. Adhésines

La plupart des bactéries pathogènes pénètrent dans l'organisme au niveau des muqueuses. Pour qu'elles puissent coloniser et éventuellement envahir les muqueuses, les bactéries doivent d'abord y adhérer grâce à des

protéines de surface, appelées adhésines. Chez certaines bactéries, ces adhésines sont exprimées sur des pili.

6.2. Invasion des cellules non phagocytaires

Bon nombre de bactéries pathogènes ont la capacité d'envahir des cellules non phagocytaires (comme des cellules épithéliales). Il s'agit d'un processus complexe au cours duquel l'interaction de la bactérie avec la cellule déclenche des remaniements du cytosquelette qui aboutissent à l'ingestion de la bactérie, comme cela se passerait avec une cellule phagocytaire classique.

6.3. Résistance à la phagocytose

Certaines bactéries possèdent à leur surface des structures qui empêchent les cellules phagocytaires d'adhérer à la bactérie, ce qui les protège de la phagocytose. Ces structures peuvent être constituées par la capsule ou par des constituants de la paroi. Elles sont de nature polysaccharidique ou protéique. Les bactéries pathogènes qui échappent ainsi à la phagocytose sont appelées extracellulaires.

6.4. Persistance dans les phagocytes

D'autres bactéries pathogènes n'échappent pas à la phagocytose, mais ont la propriété de pouvoir persister et se multiplier à l'intérieur des phagocytes mononucléés (principalement les macrophages). Ce sont les pathogènes intracellulaires. Parmi ces bactéries, les unes peuvent se

multiplier indifféremment dans les cellules ou hors des cellules, ce sont les pathogènes intracellulaires facultatifs, les autres ne peuvent se multiplier qu'à l'intérieur de cellules (macrophages ou cellules épithéliales), ce sont les pathogènes intracellulaires obligatoires.

6.5. Toxines protéiques

La majorité des bactéries pathogènes produisent des toxines protéiques. Dans la plupart des cas (surtout chez les bactéries à Gram positif), les toxines sont excrétées et qualifiées alors d'exotoxines. Dans d'autres cas, les toxines ne sont libérées que lors de la lyse bactérienne.

6.6. Lipopolysaccharide ou endotoxine

La membrane externe de toutes les bactéries à Gram négatif contient un lipopolysaccharide dont la partie lipidique (le lipide A) est impliquée dans ses nombreux effets biologiques. À la différence des toxines protéiques, le lipopolysaccharide résiste à des températures élevées, n'est pas neutralisable par des anticorps et possède des effets biologiques comparables quelle que soit l'espèce bactérienne dont il provient.

7. Classifications des bactéries

7.1. Historique

Ces micro-organismes furent tout d'abord classés dans le règne végétal. Mais des 1866., un Allemand, Haeckel (zoologiste) va proposer la création du règne des Protistes, à côté du règne végétal et du règne animal. Ce règne des protistes regroupe des organismes unicellulaires ou pluricellulaires qui sont dépourvus de différenciation cellulaire : algues, champignons, protozoaires et bactéries. Le terme de microbes, synonyme de protistes, ne sera prononcé en public pour la première fois qu'en 1878 par Sédillot lors d'une séance de travail à l'Académie des sciences.

Cc n'est qu'en 1937 que Chatton (Protozoologiste) subdivisera ce règne en protistes supérieurs à cellules eucaryotes (algues sauf algues bleu-vert, protozoaires et champignons) et en protistes inférieurs à cellules procaryotes (bactéries et algues bleu-vert). Au XXe siècle. La classification des êtres vivants évoluera :

- classification en 5 règnes selon Whittaker et Margulis (1978) :

- classification en 3 « domaines » de Woese (1990) fondée sur la biologie moléculaire (tableau 3).

Tableau 3: Les deux classifications des êtres vivants

Règnes d'après Whittaker et Margulis (1978)	Organismes	« Domaines » d'après Woese R (1990)
<i>Prokaryotae</i>	Archaeobactéries ou archéobactéries	<i>Archaea</i> ou archées ¹
	Eubactéries Cyanobactéries ²	<i>Bacteria</i> ² ou bactéries (à cellule procaryote)
<i>Protoctista</i>	Protozoaires, Protophytes (euglènes, péridiniens, diatomées) Algues (vertes, rouges et brunes)	<i>Eucarya</i> ou eucaryotes (à cellule eucaryote)
<i>Fungi</i>	Champignons, lichens	
<i>Plantae</i>	Plantes	
<i>Animalia</i>	Animaux	

7.2. Taxonomie des micro-organismes

La taxonomie ou taxinomie, c'est l'étude de la diversité des microorganismes et des relations susceptibles d'exister entre eux recouvrant trois domaines : la classification, la nomenclature et l'identification.

L'histoire de la classification des bactéries est longue et complexe ; elle a beaucoup évolué depuis les classifications de Cohn en 1872, de Lehmann et Neumann en 1896 et de Migula en 1902, fondées sur les seuls caractères morphologiques.

7.2.1. Classification phénétique

Outre les critères morphologiques, les critères physiologiques, de pathogénicité de lysotypie, etc., des souches bactériennes seront ensuite pris en considération pour classer les bactéries : c'est jusqu'au début des années 1960, la classification phénétique (ou phénotypique).

7.2.2. Taxonomie numérique

Une autre approche de la taxonomie, dite numérique s'est développée grâce aux travaux de Sneath en 1957. L'idée même de cette méthode de classification avait été proposée par le botaniste français Adanson en 1763. Elle utilise un très grand nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques, tous d'égale importance, pour chaque souche bactérienne alors que dans la classification phénotypique, seuls certains caractères bien choisis sont utilisés.

Tous ces caractères sont traduits automatiquement pour calculer des valeurs de similitude entre les souches et pour former des groupes de similitude. Ces méthodes ont progressé grâce aux travaux de Sokal et Sneath en 1963 et 1973 et elles ont été appliquées aux bactéries par de nombreux microbiologistes dans les années 1970 (Delarras, 1981).

7.2.3. Classification phylogénétique (ou classification phylogénique)

Au début de ce XXI^e siècle, une nouvelle classification bactérienne se développe : la classification phylogénétique ou phylogénique. Elle est fondée sur les phylums qui sont construits par comparaison du matériel génétique et des produits des gènes et en particulier par séquençage de l'ARN ribosomique 16S ou de l'ARNr 5S.

Historiquement, Kluyver et Van Niel avaient proposé l'utilisation d'une taxonomie phylogénétique dès 1936. Mais, il a fallu attendre le début du développement de la biologie moléculaire dans les années 1950 à 1980 pour que celle-ci prenne de l'essor : détermination de la composition de l'ADN des bactéries par la recherche de leur GC %, hybridation d'acides nucléiques A-RN·ADN grâce aux travaux préliminaires de Marmur et al, en 196, étude des ARNr (ARN ribosomiaux) dans les années 1980...

La nouvelle classification présentée dans la 2^e édition du Bergey's manual of systematic bacteriology (2001-2003) est une classification phylogénétique.

8. Classification de Bergey

La classification adoptée par la majorité des microbiologistes a été celle de Bergey, dont la première édition, intitulée Bergey's manual of systematic bacteriology date de 1923. Elle a, elle-même, beaucoup évolué au cours de ses éditions successives.

8.1. Bacteria

Dans la 2^e édition du Bergey's manual 2001-2003, le domaine (règne) Bacteria ou Eubacteria (eubactéries) comportait 23 divisions ou phylums.

Consulter le site officiel du Bergey's manual ([http://www : Bergys.org/](http://www.Bergys.org/)), à partir duquel on sélectionne « Taxonomie outlines » qui permet d'accéder au site :

[http://www : Bergys.org.outlines.html](http://www.Bergys.org.outlines.html). Ce site présente des compléments ou des mises à jour du Bergey's manual of systematic bacteriology, seconde édition pour la période 2008-2010 :

- ✓ Revised raad map to the phylum Firmicutes (Volume 3, mars 2008);
- ✓ Draft taxonomie outline of the Bacteroidales, Planctomycetes, Chlamydiae, Spirochaetes, Fibrobacteres, Fusobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia, Dictyoglomi, and Gemmatimonadetes (volume 4. Avril 2008):
- ✓ Phylogenetic trees of the phylum Actinobacteria (volume 5 août 2009):
- ✓ Taxonomie outline of the Phylum Firmicutes (volume 3 septembre 2009):
- ✓ Draft taxonomie outline of the Bacteroidetes, Planctomycetes, Chlamydiae, Spirochaetes, Fibrobacteres, Fusobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia, Dictoglomi, and Gemmatimonadetes (volume 4 janvier 2010)

8.2. Domaine Bacteria ou Eubacteria

Dans le cadre de cette classification du Bergey's manual of systematic bacteriology, seconde édition dont les ouvrages représentent plusieurs milliers de pages, seules des bactéries du domaine Bacteria ou Eubacteria,

couramment rencontrées en laboratoires d'analyses ou de contrôle sanitaire, sont présentées dans les tableaux 4 à 8.

Tableau 4: Phylum X Cyanobacteria

Classe	Sous-section	Famille	Genre
Cyanobacteria ¹	I	I	14 dont <i>Chroococcus</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Synechococcus</i> ...
	II	I	4 dont <i>Chroococcus</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Synechococcus</i> ...
		II	3
	III	I	18 dont <i>Limnothrix</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Spirulina</i> ...
	IV	I	9 dont <i>Limnothrix</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Spirulina</i> ...
		II	3
V	I	6 dont <i>Limnothrix</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Spirulina</i> ...	

Tableau 5: Phylum XII Firmicutes

Classe	Ordre	Famille	Genres et espèces
Bacilli	Bacillales	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i> : <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. megaterium</i> ... ¹ <i>Amphibacillus</i> , <i>Virgibacillus</i> ¹ ...
		<i>Alicyclobacillaceae</i>	<i>Alicyclobacillus</i> ¹ ...
		<i>Listeriaceae</i>	<i>Listeria</i> ... ²
		<i>Pheanibacillaceae</i>	<i>Phaenibacillus</i> , <i>Aneurinibacillus</i> , <i>Brevibacillus</i> ¹ ...
		<i>Planococcaceae</i>	<i>Sporosarcina</i> ...
	Lactobacillales	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i> ³ ...
		<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i> ...
		<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i> ...
Bacilli	Lactobacillales	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i> ⁴ ...
		<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i> ...
		<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i> ⁴ <i>Lactococcus</i>
Clostridia	Clostridiales	<i>Clostridiaceae</i> Autres familles	<i>Clostridium</i> ⁵ avec de très nombreuses espèces <i>Peptostreptococcus</i> ⁶ ...
		<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium</i>
Negativicutes	Selenomonadales	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Veillonella</i> ⁶

Tableau 6: Phylum XII Protobacteria

Classe	Ordre	Famille	Genres et espèces
Alpha-proteobacteria	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonas</i> ... <i>S. paucimobilis</i> ¹
	<i>Caulobacterales</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Brevundimonas</i> <i>B. vesicularis</i> , <i>B. diminuta</i> ... ¹
	<i>Rhizobiales</i>	<i>Brucellaceae</i>	<i>Brucella melitensis</i> ²
		<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Bradyrhizobium</i> ³ (<i>B. japonicum</i> ...)
		<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobium</i> ³ (<i>R. leguminosarum</i> ...) <i>Sinorhizobium</i> ³ (<i>S. meliloti</i>)
Beta-proteobacteria	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i> <i>B. cepacia</i> , <i>B. mallei</i> , <i>B. pseudomallei</i> ... ¹
		<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Alcaligenes</i> (<i>A. faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i> ...), <i>Bordetella</i> (<i>B. pertussis</i> ...)
		<i>Comamonadaceae</i>	<i>Comamonas</i> ¹
	<i>Hydrogenophilales</i>	<i>Hydrogenophilaceae</i>	<i>Thiobacillus</i> ... <i>T. thiooxidans</i> ...
	<i>Neisseriales</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Neisseria</i> ... <i>N. meningitidis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> ...
	<i>Nitrosomonadales</i>	<i>Spirillaceae</i>	<i>Spirillum</i> ...
Gamma-proteobacteria	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Xanthomonas</i> <i>X. maltophilia</i> ² ...
	<i>Legionellales</i>	<i>Legionellaceae</i>	<i>Legionella</i> ¹
	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i> ... ²
		<i>Moraxellaceae</i>	<i>Moraxella</i> , <i>Acinetobacter</i> ...
Gamma-proteobacteria	<i>Alteromonadales</i>	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Alteromonas</i> , <i>Shewanella</i> (<i>S. putrefaciens</i>)...
	<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio</i> ³ ...
	<i>Aeromonadales</i>	<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Aeromonas</i> ...
	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i> ⁴ , <i>Plesiomonas</i> ...
	<i>Pasteurellales</i>	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Haemophilus</i> ...
Delta-proteobacteria ⁵			
Epsilon-proteobacteria	<i>Campylobacterales</i>	<i>Campylobacteraceae</i>	<i>Campylobacter</i> ⁶ <i>Arcobacter</i> ...
		<i>Helicobacteraceae</i>	<i>Helicobacter</i> ...

Tableau 7: autres phylums

Classe	Ordre	Famille	Genres et espèces
Phylum XVI Chlamydiae phy. nov. (extrait)			
<i>Chlamydiae</i>	Chlamydiales	<i>Chlamydiaceae</i>	<i>Chlamydia</i> ¹ ...
Phylum XVII Spirochaetes phy. nov. (extrait)			
<i>Spirochaetes</i>	Spirochaetales	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Spirochaeta</i> , <i>Borrelia</i> ... <i>B. burgdorferi</i> ¹ , <i>B. recurrentis</i> <i>Treponema</i> ... <i>T. pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i>
		<i>Leptospiraceae</i> ²	<i>Leptospira</i> ... <i>L. interrogans</i> ...
Phylum XX Bacteroidetes phy. Nov (extrait)			
<i>Bacteroidetes</i>	Bacteroidales	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i> ³ ...
		<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Porphyromons</i> ³
		<i>Prevotellaceae</i> ...	<i>Prevotella</i> ³
<i>Flavobacteria</i>	Flavobacteriales	<i>Flavobacteriaceae</i> ...	<i>Flavobacterium</i> ...
<i>Sphingobacteria</i>	Sphingobacteriales	<i>Flexibacteraceae</i> ...	<i>Cytophaga</i> ...
Phylum XXI Fusobacteria phy. nov. (extrait)			
<i>Fusobacteria</i>	Fusobactériales	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Fusobacterium</i> ³ ...

9. Les principaux groupes de Bactéries

9.1. Les protéobactéries

Ce clade vaste et diversifié de Bactéries à Gram négatif comprend des photoautotrophes, des chimio-autotrophes et des hétérotrophes. Certaines Protéobactéries sont anaérobies et d'autres, aérobies. Les spécialistes de la systématique moléculaire distinguent cinq sous-groupes de Protéobactéries ; l'arbre phylogénétique ci-contre montre leurs liens de parenté, selon ce qu'en révèlent les données moléculaires (Faucher & Lachaine, 2012).

9.2. Sous-groupe : les protéobactéries alpha (α)

De nombreuses espèces de Protéobactéries α sont étroitement associées à des hôtes eucaryotes. Ainsi, les espèces du genre *Rhizobium* vivent dans des nodosités, à l'intérieur des racines des Légumineuses (famille du haricot, du trèfle, de la luzerne, etc.). Elles y convertissent le N_2 atmosphérique en composés que la plante hôte peut utiliser pour synthétiser des protéines. Les espèces du genre *Agrobacterium* sont des agents pathogènes qui provoquent la formation de tumeurs chez les Végétaux (Faucher & Lachaine, 2012).

9.3. Sous-groupe : les protéobactéries bêta (β)

Diversifié sur le plan nutritionnel, le groupe des Protéobactéries β comprend *Nitrosomonas*, une bactérie qui vit dans le sol et joue un rôle important dans le recyclage de l'azote dans les écosystèmes. En effet, *Nitrosomonas* oxyde l'ammonium (NH_4^+) ou l'ammoniac (NH_3) et libère du nitrite (NO_2^-) comme sous-produit (Faucher & Lachaine, 2012).

9.4. Sous-groupe : les protéobactéries gamma (γ)

C'est le groupe de Protéobactéries le plus vaste et le plus diversifié. Parmi les membres autotrophes, on trouve des bactéries sulfureuses comme *Thiomargarita namibiensis*. Cette bactérie obtient de l'énergie en oxydant la molécule de H_2S , ce qui produit des résidus de soufre (les petits globules apparaissant dans la micrographie ci-contre).

Les Protéobactéries hétérotrophes γ comptent quelques agents pathogènes, notamment *Legionella*, ainsi baptisée parce qu'elle cause la maladie du légionnaire, de même que *Salmonella*, parfois à l'origine d'intoxications alimentaires, et *Vibrio cholerae*, qui cause le choléra. *Escherichia coli*, un résident de l'intestin des humains et d'autres Mammifères, n'est généralement pas pathogène (Faucher & Lachaine, 2012).

9.5. Sous-groupe : les protéobactéries delta (δ)

Parmi les Protéobactéries δ se trouve le groupe des Myxobactéries, qui secrètent un substrat gluant. Quand le sol s'assèche ou que la nourriture se fait rare, les cellules s'agglutinent et forment une « fructification » bulbeuse qui libère des « myxospores » résistantes. Ces bactéries fondent de nouvelles colonies dans des milieux favorables.

Les Protéobactéries δ incluent également le groupe des Bdellovibrionaceae, qui sont des prédateurs d'autres bactéries (Faucher & Lachaine, 2012).

9.6. Sous-groupe : les protéobactéries epsilon (ϵ)

La plupart des espèces de ce sous-groupe sont pathogènes pour les humains et d'autres Animaux. Les Protéobactéries ϵ comprennent notamment *Campylobacter jejuni*, qui cause la septicémie et des troubles inflammatoires de la paroi intestinale, et *Helicobacter pylori*, qui provoque des ulcères gastriques et duodénaux (dont la cause principale était, il n'y a pas si longtemps, attribuée au stress) (Faucher & Lachaine, 2012).

9.7. Les chlamydiae

Les Chlamydiae sont des parasites incapables de survivre à l'extérieur des cellules animales ; elles soutirent à leur hôte des ressources aussi fondamentales que l'ATP.

La paroi à Gram négatif des Chlamydiae se distingue par le fait qu'elle ne contient pas de peptidoglycane. L'espèce *Chlamydia trachomatis* est la cause la plus répandue de cécité dans le monde. Elle cause aussi l'urétrite non gonococcique, l'infection transmissible sexuellement (ITS) la plus fréquente en Amérique du Nord (Faucher & Lachaine, 2012).

9.8. Les Spirochètes

Les Spirochètes sont des hétérotrophes de forme hélicoïdale qui se déplacent en décrivant une spirale au moyen de filaments internes pivotants, semblables à des flagelles. De nombreux Spirochètes sont autonomes, mais certains sont des parasites pathogènes notoires. Ainsi, *Treponema pallidum* cause la syphilis et

Borrelia burgdorferi, la maladie de Lyme, ou borréliose (Faucher & Lachaine, 2012).

9.9. Les cyanobactéries

Photoautotrophes, les Cyanobactéries sont les seuls Procaryotes capables de photosynthèse productrice de dioxygène.

Les Cyanobactéries solitaires et filamenteuses sont présentes en abondance dans le phytoplancton dulcicole et marin, ces colonies d'organismes photosynthétiques qui dérivent près de la surface de l'eau. Certains filaments comprennent des cellules spécialisées dans la fixation du diazote, processus métabolique qui convertit le N₂ atmosphérique en composés inorganiques pouvant servir à synthétiser les acides aminés et d'autres molécules organiques (Faucher & Lachaine, 2012).

9.10. Les Bactéries à gram positif

Les Bactéries à Gram positif rivalisent avec les Protéobactéries pour ce qui est de la diversité. Un sous-groupe des Bactéries à Gram positif, les Actinobactéries (autrefois Actinomycètes), forment des colonies ramifiées (le suffixe mycète vient rappeler que ces bactéries étaient autrefois confondues avec les Eumycètes).

Deux espèces faisant partie du groupe des Actinobactéries causent la tuberculose et la lèpre. Cependant, la plupart des Actinobactéries sont autonomes et participent à la décomposition des débris organiques dans le sol. Leurs sécrétions sont en partie à l'origine de l'odeur « terreuse » caractéristique des sols riches.

Les sociétés pharmaceutiques cultivent les espèces vivant dans le sol du genre *Streptomyces* pour produire de nombreux antibiotiques, notamment la streptomycine.

Les Bactéries à Gram positif comprennent diverses espèces solitaires, telles que *Bacillus anthracis* qui cause la maladie du charbon.

Font également partie de ce groupe *Clostridium botulinum*, qui cause le botulisme, et *C. difficile*, à l'origine du décès de plusieurs centaines de patients dans les hôpitaux depuis 2003.

Les diverses espèces de *Staphylococcus* et de *Streptococcus* font aussi partie des Bactéries à Gram positif (la bactérie «mangeuse de chair» appartient à l'espèce *Streptococcus pyogenes*).

Les Mycoplasmes sont les seules bactéries dépourvues de paroi cellulaire. Ce sont aussi, après les Nanobactéries, les plus petites cellules connues. Avec un diamètre de 0,1µm, elles sont seulement cinq fois plus grosses qu'un ribosome.

Les Mycoplasmes ont un petit génome : ainsi, *Mycoplasma genitalium* ne possède que 517 gènes. Bon nombre de Mycoplasmes sont des bactéries autonomes qui vivent dans le sol, mais certains sont pathogènes (Faucher & Lachaine, 2012).

10. Identification

L'étude des caractères phénotypiques est la méthode la plus utilisée en routine. Mais dans certains cas des méthodes génotypiques peuvent être utilisées dans un but diagnostique pour identifier des bactéries provenant de patients. En général on utilise ces techniques pour confirmer ou infirmer une infection due à une bactérie donnée (par exemple *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*). Elles sont surtout utiles pour des bactéries de croissance lente ou difficile. Deux approches sont couramment utilisées : l'hybridation avec une sonde spécifique ou l'amplification génique.

Pour l'hybridation on utilise une sonde marquée reconnaissant, au niveau d'un acide nucléique, une séquence nucléotidique spécifique de l'espèce bactérienne recherchée, la cible.

La sonde peut être marquée par un radioélément (sonde chaude) ou par d'autres méthodes (sondes froides). La méthode est d'une sensibilité limitée lorsque la cible est située sur le chromosome. La sensibilité est cependant meilleure lorsque la cible existe en de nombreux exemplaires, ce qui est le cas lorsque la cible est située sur l'ARN ribosomal. La technique d'hybridation se prête bien à l'identification de cultures bactériennes, car la séquence cible est alors présente en abondance. Lorsqu'il s'agit de prélèvements provenant d'un patient, la densité bactérienne est habituellement trop faible pour que l'on puisse utiliser cette méthode. Toutefois cela reste possible dans quelques cas particuliers.

Pour rechercher une bactérie directement dans un produit pathologique, l'approche la plus employée consiste à amplifier, généralement par PCR (*Polymerase chain reaction*), un segment limité du génome caractéristique de l'espèce. La spécificité du produit d'amplification peut ensuite être contrôlée en déterminant sa taille (par migration électrophorétique) et sa capacité à hybrider avec une sonde spécifique. La méthode d'amplification génique est très sensible.

Les techniques d'hybridation et d'amplification sont pratiquées tantôt avec des réactifs commercialisés (ce qui assure une certaine standardisation des méthodes), tantôt avec des réactifs préparés par le laboratoire.

Dans des cas très particuliers, on peut se trouver en présence d'une bactérie que l'on ne sait pas cultiver ou que l'on n'arrive pas à identifier par des méthodes phénotypiques. Dans ce cas l'amplification du gène de l'ARN ribosomal 16S, suivie de son séquençage, permet de déterminer la position taxonomique de la bactérie.

10.1. Tests biochimiques utilisés dans l'identification des bactéries

En fonction de l'aspect morphologique des colonies bactériennes, de la morphologie des bactéries après coloration, de leurs caractéristiques de croissance (vitesse, type respiratoire, exigences culturales, etc.), de leur pigmentation, de leur odeur, de leur caractère hémolytique sur gélose au sang, le bactériologiste s'oriente sur une famille bactérienne ou un genre bactérien en

particulier. Il peut le cas échéant compléter sa présomption de genre bactérien par des tests d'orientation (type respiratoire, catalase et oxydase). Néanmoins, les identifications précises des espèces bactériennes font appel pour les bactéries d'intérêt médical les plus communes à des galeries d'identification biochimique manuelles ou pouvant être lues sur des systèmes automatisés – Vitek® (bioMérieux), Phoenix® (BD), Walk-Away® (Siemens) sont parmi les plus courants. Un certain nombre d'épreuves biochimiques de base sont utilisées dans l'élaboration des galeries d'identification des souches bactériennes.

Après avoir rappelé les tests d'orientation (type respiratoire, catalase et oxydase), un certain nombre d'épreuves métaboliques sont détaillées. Celles-ci concernent principalement le métabolisme glucidique, le métabolisme protéique et le métabolisme lipidique. Des tests d'agglutination viennent compléter l'identification bactérienne dans certains cas.

11. Principaux tests d'orientation

11.1. Isolement et purification des bactéries

La diminution de la charge microbienne par dilution de l'échantillon à analyser est réalisée dans le but d'une purification ultérieure plus aisée et l'obtention de colonies bien séparées à partir des cultures mixtes.

La dilution décimale consiste à diminuer la densité de sol en micro-organismes, d'abord à 1/10 puis à 1/100 et ainsi de suite jusqu'à réduire la concentration microbienne de la suspension mère au facteur de 10^{-4} . Ainsi, le sol est prêt à l'analyse microbiologique, bien que la probabilité d'éliminer un nombre considérable d'espèces microbiennes est n'est pas nulle.

Avant d'entamer le travail, il est important de créer une zone stérile, par la flamme du bec Bunsen, sur une paillasse soigneusement nettoyée. Ensuite, la suspension mère est préparée en mélangeant 1g de chaque échantillon avec 9 ml d'eau distillée stérile, bien homogénéisé, 1ml d'échantillon de la solution mère est additionné à 9ml d'eau physiologique stérile, permettant ainsi d'obtenir une suspension microbienne diluée à 10^{-1} , ensuite des dilutions successives sont réalisées afin d'arriver à des dilutions 10^{-4} et 10^{-5} .

De chaque dilution, une goutte bien étalée dans des boîtes de Pétri contenant le milieu Gélose Nutritive (GN) à l'aide d'un étaloir, les boîtes sont incubées à 28°C , jusqu'à l'apparition des colonies.

Après un bon développement des colonies, des repiquages ont été effectués de chaque colonie pour purifier les bactéries, jusqu'à

arriver à isoler sur chaque boîte de Pétri une seule colonie (Guiraud, 1998).

11.2. Identification des bactéries

L'identification d'une souche représentative est effectuée par deux techniques classiques : une observation macroscopique et une étude microscopique des souches, largement

Suffisantes pour déterminer le genre des bactéries isolées et cela en réalisant des ensemencements par touches sur des milieux d'études solides favorisant la croissance et la sporulation des moisissures.

11.2.1. Etude macroscopique

Les caractères morphologiques et culturels sont déterminés après ensemencement des souches pures sur les milieux de cultures spécifiques. L'identification se fait à l'œil nu.

11.2.2. Etude microscopique

Dans le but d'effectuer une étude microscopique de ces micro-organismes, ces derniers ont été d'abord ensemencés par étalement sur des lames stériles. Après séchage près de la flamme, la coloration de Gram est effectuée selon les étapes suivantes :

Le frottis est coloré pendant 1 min avec une solution Crystal violet, il est ensuite rincé avec l'eau distillée, une solution iodo-iodurée de lugol est ajoutée et le frottis est maintenu dans ce milieu pendant 1 min, après lavage à l'eau, l'alcool est versé goutte à goutte sur la lame inclinée jusqu'à la dernière goutte apparaît claire, sans tarder la

lame est rincée avec de l'eau et alors soumise à une coloration de contraste en la traitant avec une solution de fuschine pendant 30s, la lame est rincée une deuxième-fois ensuite séchée à l'air libre ou délicatement entre deux feuilles de papier buvard, la lame est observée au microscope (40x puis 100x): les bactéries non décolorées par l'alcool sont dites Gram positif, elles apparaissent en violet tandis que les bactéries à Gram négatif, apparaissent rose

11.2.3. Étude du type respiratoire

L'ensemencement est effectué sur une gélose viande-foie (VF) préalablement régénérée au bain-marie bouillant pendant 20 minutes et lorsque la température est redescendue à 40 à 45°C. Cet ensemencement est effectué soit à l'aide d'une pipette Pasteur de bas en haut en spirale, soit en déposant à la surface du tube maintenu à 45°C la suspension de la bactérie à étudier puis à mélanger, le tube étant maintenu verticalement, en faisant des 8 de chiffre. Les tubes sont ensuite refroidis sous l'eau du robinet. Après 24 heures à 37°C, la lecture consiste à étudier le niveau du tube où une croissance bactérienne est visible (Fig.3.16). Une façon quotidienne d'apprécier le type respiratoire bactérien est de comparer les cultures bactériennes incubées en aérobiose et en anaérobiose pour savoir si la bactérie est anaérobie stricte, aérobie stricte ou aéro-anaérobie facultative. Dans ce cas, le caractère microaérophile n'est pas appréciable.

Milieu de culture utilisé: On utilise le milieu viande foie coulé en longs tubes fins (des tubes de Prévot de 9 x 180 mm). Ce milieu, après régénération, est maintenu liquide et en surfusion pour expulser les gaz dissous dans la gélose.

Technique:

- Régénérer le milieu en le plaçant au bain-marie pendant 30 min à 100 °C puis maintenir en surfusion 10 min à 47 °C.
- Ensemencer en vrille du bas vers le haut à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée.

- Solidifier à l'eau froide et incuber à 37 °C.
- Solide, le milieu possède un gradient de concentration en O₂ où il est plus abondant en surface. L'endroit où se trouvent les colonies dans le tube détermine le type énergétique:

Résultats après incubation 24 h à 37 °C

- ✓ Colonies dans tout le tube: bactéries aéro-anaérobies
- ✓ Colonies en haut du tube: bactéries aérobies strictes
- ✓ Colonies en haut du tube, légèrement sous la surface: bactéries micro-aérophiles
- ✓ Colonies en bas du tube: bactéries anaérobies strictes

Les différents types énergétiques

Il existe 7 types énergétiques. Mais certains étant plutôt rares, nous n'en citerons que 4.

Le type I dit anaérobie strict

Les bactéries anaérobies strictes ne se cultivent qu'à l'abri de l'air. La plupart des bactéries de ce type sont capables de supporter l'atmosphère un certain temps. D'autres sont extrêmement oxygénosensibles.

Le type II dit microaérophile

Les bactéries microaérophiles sont beaucoup plus rares. Il s'agit de bactéries dont les enzymes (en particulier la catalase) ne fonctionnent correctement que sous une pression réduite

dedioxygène. Leur énergie est produite par fermentation. En présence de dioxygène, elles peuvent utiliser la voie oxydative directe mais, dépourvues de système la détruisant (catalase ou peroxydase), l'eau oxygénée s'accumulant devient bactéricide. Exemples: *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Bacteroides*.

Le type VI regroupant 2 sous-types: aérobie facultatif et anaérobie facultatif

Les bactéries aérobies facultatives peuvent utiliser toutes les voies énergétiques ou se limiter aux principales. Exemples: *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*.

Les bactéries anaérobies facultatives ne peuvent utiliser que les fermentations. Ce sont des bactéries anoxybotiques. Exemple: *Streptococcus*. En pratique, il est difficile de distinguer les deux types énergétiques. On rassemble ces bactéries sous le type aéro-anaérobie.

Le type VII dit aérobie strict

Les bactéries aérobies strictes ne se cultivent qu'en présence d'air et respirent en aérobiose par phosphorylation oxydative. Exemples: *Pseudomonas*, *Micrococcus*.

11.2.4. Recherche de la catalase

Certaines bactéries ont la faculté de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). En présence d'une bactérie productrice de catalase, on observe à partir d'H₂O₂ une libération d'oxygène gazeux selon la réaction:



La plupart des microorganismes aérobies possèdent une catalase, en particulier les bacilles Gram négatifs aérobies. Son absence est donc un critère d'identification intéressant. Par exemple, parmi les coques Gram + aérobies, seuls les Streptococcaceae sont catalase négative. *Lactobacillus* et *Erysipelothrix* sont les seuls groupes de bacilles Gram + aérobies non sporulés dépourvus de catalase.

Le rôle des peroxydases ou des catalases contenues dans les peptones ou dans certains additifs (sang) des milieux est déterminant pour permettre le développement aérobie des bactéries catalase négative comme les Streptococcaceae.

Technique

- ✓ Sur une lame propre et sèche déposer une goutte eau oxygénée à 10 volumes,
- ✓ À l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, ajouter l'inoculum bactérien, observer immédiatement.

Lecture

- ✓ Apparition de bulles, dégagement gazeux de dioxygène : catalase +
- ✓ Pas de bulles :catalase –

Cause d'erreurs : réalisation du test sur un bouillon contenant la catalase, à partir d'une gélose au sang qui possède une activité catalasique, suspension bactérienneinsuffisante, eau oxygénée périmée.

11.2.5. Recherche d'une cytochrome oxydase

Les bactéries possédant une chaîne respiratoire complète sont dotées d'une cytochrome oxydase. La mise en évidence de cette oxydase est effectuée en présence d'une solution aqueuse à 1% de chlorhydrate de diméthylparaphénylène diamine qui forme un complexe violet au contact de cette enzyme. Les colonies sont prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur.

Rappels

Les cytochromes sont des protéines qui appartiennent à la chaîne respiratoire, composée d'une succession de transporteurs d'électrons, en particulier les cytochromes porteurs de coenzymes héminiques.

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à Gram négatif. Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semi-quinonique rose violacé.

L'activité oxydasique ainsi déterminée est difficile à attribuer à tel ou tel élément de la chaîne respiratoire bien qu'une correspondance avec un cytochrome C soit avancée par plusieurs auteurs. Pour un certain nombre de bactéries oxydase négative, possédant donc une chaîne respiratoire complète et fonctionnelle comme les micro-organismes aérobies stricts (*Micrococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter*), mais aussi des bactéries aéro-

anaérobies comme les entérobactéries, le cytochrome c est remplacé par un autre cytochrome ne possédant pas la capacité de réagir avec le réactif utilisé.

Le terme de cytochrome oxydase pose problème : la cytochrome oxydase est la dernière enzyme de la chaîne respiratoire qui assure le transfert des électrons sur l'oxygène (ou un autre oxydant minéral).

Le terme d'oxydase est, d'autre part, réservé aux enzymes utilisant l'oxygène comme substrat... En bactériologie, il faut donc comprendre le terme d'oxydase comme la présence d'une enzyme réagissant avec un dérivé méthylé du paraphénylène diamine.

Principe

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé.

Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl paraphénylène diamine.

Ce réactif est incolore et en présence de l'enzyme, il libère un composé rose-rouge, noircissant à l'air. phénylène diamine oxydase réactif incolore composé rosé.

Technique

Le réactif peut se trouver sous deux formes :

- soit en solution : sur une lame de verre, déposer un carré de papier filtre et l'imbiber d'une solution fraîchement préparée de réactif,

- soit sous la forme d'un disque préimprégné par le réactif.

Dans les deux cas, écraser avec une effilure de pipette Pasteur une colonie de germes à étudier sur ce papier (instrument n'oxydant pas le réactif).

Lecture

Si le milieu réactionnel devient rose : test est positif : Oxydase +

Si le milieu réactionnel reste incolore : test est négatif. Oxydase -

11.2.6. Étude des accepteurs minéraux, recherche d'une nitrate réductase

Les bactéries, lorsqu'elles possèdent une nitrate réductase, sont capables de transformer les nitrates (NO_3^-) en nitrites (NO_2^-) et éventuellement en azote (N_2).

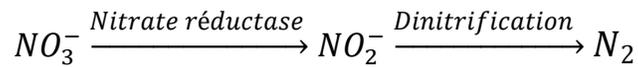
Un bouillon nitraté (bouillon nutritif supplémenté de 1,5% de nitrates de potassium) estensemencé avec la bactérie à étudier et incubé 18heures à 37°C.

Après incubation, 3gouttes d'une solution d'acide sulfanilique (GriessA) et 3gouttes d'une solution de naphtylamine (GriessB) sont ajoutées au bouillon.

Si une coloration rose fugace apparaît, les nitrates ont été réduits au stade nitrites. En l'absence de coloration, soit les nitrates ont été réduits au stade azote, soit la bactérie ne possède pas de nitrate réductase. L'addition de poudre de Zinc (réactif de Zobell, qui va réduire les nitrates en nitrites) permet de trancher. Si une coloration rose apparaît, alors la bactérie ne possède pas de nitrate réductase. Si aucune modification de coloration n'est visible après ajout de zinc, alors les nitrates avaient été réduits au stade azote.

Au cours de ce test, on recherche la production d'une enzyme :la nitrate-réductase par la bactérie. Cette étude va donc consister à mettre en évidence le métabolite nitrite ou la disparition des nitrates initiaux.

La réduction des nitrates par la nitrate réductase se traduit par la production de nitrites. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction, jusqu'à une dénitrification.



Ce test va consister à mettre en évidence la présence ou non des nitrites dans le milieu de culture. S'ils sont présents, ils donnent une réaction colorée rose en présence d'acide sulfanilique et de naphthylamine. Ces réactifs portent le nom de réactifs de GRIESS.

En l'absence de nitrites, on va rechercher la disparition des nitrates par addition de zinc : en effet le zinc réduit les nitrates en nitrites.

Les réactifs des nitrites sont toujours présents. Deux cas sont possibles :

Coloration rouge : les nitrates encore présents dans le milieu ont été réduits en nitrites par le zinc et ont réagi avec les réactifs, la nitrate réductase est donc négative.

Pas de coloration rouge : au contraire les nitrates du milieu ont été réduits par les bactéries et l'addition de zinc ne peut produire de nitrites. La nitrate réductase est donc positive jusqu'au stade azote.

Technique

La recherche va s'effectuer :

- ✓ Soit à partir de milieu gélosé nitraté,

- ✓ Soit à partir de bouillon nitraté à 10 g.dm⁻³
- ✓ Soit à partir du milieu mannitol mobilité,
- ✓ Cupule GLU galerie API 20E.

Après lecture des milieux, ajouter à la surface du milieu 3 gouttes d'acide sulfanilique puis 3 gouttes d'alpha naphtylamine. Mélanger, observer.

Lecture

Le milieu devient rouge : présence de nitrites. Donc la bactérie possède une nitrate réductase. Résultat NR+

Le milieu reste inchangé : on ajoute alors de la poudre de zinc qui joue le même rôle que la nitrate réductase vis-à-vis des nitrates.

Coloration rouge : on a donc eu transformation des nitrates en nitrites par le zinc. La bactérie ne possédait pas cette enzyme. Résultat NR-

11.2.7. Étude du métabolisme glucidique

Étude de la voie d'attaque des glucides MEVAG (milieu de Hugh et Leifson) Les bactéries peuvent utiliser les glucides selon deux voies. La voie fermentative se déroule en l'absence d'oxygène de l'air et les catabolites formés, acides, entraînent une diminution du pH du milieu. Par voie oxydative, l'oxygène de l'air est utilisé et peu de catabolites acides sont formés. Deux milieux semi-solides contenant un indicateur de pH (par exemple du bleu de bromothymol) sont régénérés au bain-marie bouillant 20minutes. Ensuite, lorsqu'ils sont refroidis autour de 45° C, 6gouttes d'une solution de glucose à 30% (concentration finale en glucose de 1%) sont ajoutées. Les milieux sont ensuite refroidis complètement etensemencés par piqûre centrale. L'un des deux tubes est recouvert de 0,5cm d'huile de paraffine stérile. Ce tube constitue le tube dit « fermé », c'est-à-dire dans lequel les réactions s'effectueront en l'absence d'oxygène. L'autre tube est dit « ouvert ».

11.2.8. Milieu mannitol-mobilité

Il s'agit d'un milieu semi-solide contenant entre autres du mannitol et du rouge de phénol comme indicateur de pH. Après régénération au bain-marie bouillant pendant 20minutes, le milieu est refroidi totalement puisensemencé par piqûre centrale. Lorsque l'indicateur coloré passe du rouge au jaune, ce qui correspond à l'acidification du milieu, le mannitol a été utilisé. Le caractère mobile est défini dans ce milieu par un trouble envahissant toute la largeur de la gélose de part et d'autre de la piqûre centrale, alors qu'une

bactérie immobile ne se développe que le long de la piqûre centrale.

11.2.9. Étude de la fermentation de plusieurs sucres pour l'identification des entérobactéries

Le milieu de Kligler-Hajna ou milieu lactose-glucose-H₂S est le plus couramment utilisé. Ce milieu solide en pente contient du glucose (0,1 %), du lactose (1 %), des acides aminés, de thiosulfate de sodium, du citrate ferrique et du rouge de phénol.

Ce milieu estensemencé avec la souche à étudier en effectuant des stries à la surface de la pente de la gélose, puis le culot estensemencé par piqure centrale.

Les bactéries acidifient le glucose en anaérobiose relative (culot) ; le culot vire au jaune (par exemple entérobactéries).

Si le germe n'utilise pas le lactose, la pente devient rouge par réalcalinisations du milieu due à la formation de produits alcalins provenant de la dégradation des acides aminés (par exemple *Proteus*) (Fig. 3.21). Si les bactéries utilisent le lactose en aérobose relative (pente), il y a virage de la pente au jaune (par exemple *E. coli*). Le milieu peut être coloré en noir de façon plus ou moins intense par production d'H₂S. Une pointe fine d'H₂S est observée pour *Salmonella typhi*. Le milieu peut être entièrement noir.

La présence de gaz est détectée par la mise en évidence de bulles ou le soulèvement de la gélose. Un milieu contenant en plus du saccharose à 1 % peut être utilisé ; il s'agit du milieu TSI (*Triple-Sugar-Iron.*).

12. Identification moléculaire des bactéries

L'identification moléculaire des bactéries est utile dans plusieurs cas de figure 7 elle est utile pour

- ✓ Les bactéries fastidieuses de croissance lente,
- ✓ Les bactéries intracellulaires, qui sont souvent des bactéries d'identification difficile exprimant peu de caractères phénotypiques,
- ✓ Certains genres bactériens cultivant en milieu axénique comme les mycobactéries.
- ✓ Elle est également utile lorsque l'identification phénotypique n'est pas performante
- ✓ La discordance entre cette identification phénotypique et la sensibilité aux antibiotiques par exemple.
- ✓ Toutes les souches bactériennes qui sont isolées dans une croissance inhabituelle pour laquelle il convient absolument de confirmer l'identification
- ✓ La dernière application concerne le contrôle et l'identification des souches qui sont reçues des laboratoires extérieurs, y compris des collections de référence.

12.1. Acides nucléiques bactériens

Les bactéries comportent deux types d'acides nucléiques, l'acide désoxyribonucléique (ADN) et les acides ribonucléiques (ARN), ces derniers comportant des acides ribonucléiques ribosomiaux (ARNr) des acides ribonucléiques de transfert (ARNt), et des acides messagers (ARNm).

L'ADN est compacté dans le cytoplasme de la bactérie sous forme ramassée éventuellement rattaché à la membrane interne, tandis que les ARN sont répartis dans le cytoplasme. Les ARNm et les ARNr localisés au sein des polysomes formés d'une association de ribosomes où est assurée la synthèse des protéines et les AR2qt étant chargés dans le cytoplasme du transfert des acides aminés libres vers les ribosomes pour la synthèse des protéines.

En pratique actuelle, seul l'ADN constitue une cible pour la détection, l'identification et le génotypage des bactéries. L'ADN bactérien est individualisé sous forme d'un chromosome qui est la plupart du temps circulaire mais qui peut être linéaire dans certaines espèces bactériennes comme les spirochètes.

La mesure du contenu en guanosine et cytosine (G + C %) est une autre caractéristique globale du chromosome de la bactérie.

Dans tous les cas, le premier temps consiste à isoler l'ADN bactérien par des méthodes d'extraction. L'ADN extrait constituera la cible de réactions d'amplification enzymatique la plus utilisée actuellement étant la *polymerase chain reaction* (PCR) qui repose sur l'amplification exponentielle d'une région du chromosome, encadrée par deux amorces oligonucléotidiques, utilisant une ADN polymérase thermostable

L'amplification d'une région chromosomique ne constitue pas une analyse en soi, mais simplement une étape expérimentale permettant d'obtenir suffisamment d'ADN bactérien pour son

analyse. L'analyse de l'ADN bactérien fait schématiquement appel à trois types de méthodes:

- ✓ Analyse de profils de restriction ou de profils d'amplification après migration sur Uni gel d'agarose ;
- ✓ Hybridation de sonde fluorescente en temps réel ;
- ✓ Méthodes de séquençage qui permettent de décrypter entièrement la séquence du fragment amplifié et de la comparer avec les séquences déposées dans des banques informatiques de données.

12.2. Méthodes d'analyse des acides nucléiques au laboratoire

12.2.1. Extraction de l'ADN

Après la lyse de la bactérie, l'ADN libéré peut éventuellement être purifié des autres constituants de la bactérie. Cette purification repose sur l'utilisation du phénol et du chloroforme puis de l'éthanol enfin de précipiter à froid l'ADN.

L'ADN purifié peut être stocké à -20°C pour une période de quelques mois avant son utilisation pour la détection moléculaire.

12.2.2. Amplification de l'ADN

L'amplification de l'ADN a pour objectif d'obtenir une quantité suffisamment importante de l'ADN cible afin de permettre son analyse par différentes techniques. En pratique actuelle, l'amplification de l'ADN se fait essentiellement par l'utilisation de la technique PCR. Celle-ci repose sur l'hybridation de deux amorces

oligonucléotidiques situées aux deux extrémités du fragment de l'ADN chromosomique, parfaitement complémentaires des régions cibles.

La séquence de ces amorces est déterminée à partir de la séquence ADN cible déposée dans les banques informatiques de données, *il convient également* d'obtenir un CC voisin pour les deux amorces afin d'optimiser la température d'hybridation de ces amorces au cours des réactions de PCR.

La PCR repose également sur l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable qui va résister aux variations de températures qu'on va introduire dans le système. Les étapes de la PCR sont bien connues, et comportent systématiquement;

- Un chauffage à 95°C de l'ADN de la bactérie afin de séparer les deux brins constituant le chromosome,
- Hybridation des amorces dont la température dépend de la composition G et C des amorces,
- Extension généralement pratiquée à 70°C au cours de laquelle l'ADN polymérase thermostable va recopier le fragment d'ADN bactérien borné par les deux amorces oligonucléotidiques.

Cette opération va être répétée 30 à 40 fois des cycles de la PCR afin d'obtenir une amplification exponentielle de l'ordre d'un million de copies du fragment d'ADN bactérien cible.

12.2.3. Analyse du produit d'amplification

La présence d'un produit d'amplification peut être facilement détectée après migration en gel d'agarose et coloration par une base intercalent fluorescente, le bromure d'éthidium.

Il s'agit d'une technique relativement ancienne, qui consiste à digérer les produits par une ou plusieurs endonucléases de restriction et obtenir ainsi un profil caractéristique de la séquence amplifiée, la révélation est assurée là encore par migration en gel d'agarose ou de polyacrylamide.

Une deuxième modalité d'analyse du produit d'amplification consiste en Southern hybridation, sur les bandelettes de nitrocellulose comportant des sondes spécifiques de chaque produit d'amplification.

La dernière modalité consiste à séquencer le produit d'amplification et constitue actuellement la technique la plus performante pour l'identification moléculaire des bactéries.

La banque principale est une banque publique libre gratuite.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

La comparaison entre la séquence obtenue au laboratoire et ces bases de données se fait à l'aide de logiciels qui vont aligner la séquence expérimentale avec les séquences comprises dans la base de données et déterminer un pourcentage de similarité entre la séquence expérimentale et les séquences des bases de données.

Lorsqu'on utilise le gène 16S ARNr comme cible de l'identification moléculaire, il est généralement admis qu'un pourcentage de similarité compris entre:

- 99 et 100% permet d'identifier une espèce bactérienne,
- 97 et 99 % permet d'identifier un isolat dans un genre bactérien
- Inférieure à 97 % avec les bases de données est une indication qu'il s'agit d'une nouvelle espèce bactérienne non encore décrite.

12.2.4. Organisation du laboratoire de biologie moléculaire

Il est absolument indispensable d'organiser le laboratoire de biologie moléculaire avant de débiter cette activité. L'objectif principal des aménagements étant de limiter le plus possible les risques de contamination des échantillons à étudier et de Les rendre faussement négatifs ou faussement positifs.

Le laboratoire de biologie moléculaire doit au moins comporter quatre secteurs géographiquement isolés les uns des autres :

- Un secteur où l'on réalise l'extraction de l'ADN des échantillons, dans lequel il convient de distinguer un secteur pour traiter les prélèvements cliniques présumés à faible inoculum, et un secteur d'extraction des souches bactériennes qui constituent bien être un très fort inoculum.
- Le deuxième secteur est celui de la préparation des mixes de PCR ;

- Le troisième secteur est celui dans lequel on additionne Le mixes de PCR et l'ADN extrait des échantillons ou des souches bactériennes ;
- Le quatrième secteur est celui où sont réalisées les amplifications sur un thermocycleur ainsi que l'analyse des produits d'amplification par séquençage ou toute autre méthode.

Ces secteurs doivent comporter un sas d'entrée permettant le port d'une tenue particulière avec une coiffe couvrant les cheveux, une surblouse et des gants.

12.2.5. Détection moléculaire des bactéries

La détection moléculaire des bactéries, directement dans les prélèvements cliniques, a gagné en importance au cours des dernières années pour le diagnostic positif des maladies infectieuses.

Il existe d'une part des détections bactériennes sur prélèvement qui sont maintenant bien standardisées et qui donnent lieu à des kits diagnostiques commercialisés ou en cours de commercialisation ;

Et d'autre part des détections bactériennes reposant sur des tests non standardisés réalisés dans chacun des laboratoires et dont la qualité du résultat est variable et dépend entièrement du laboratoire dans lequel le test est pratiqué.

12.2.6. Typage moléculaire des bactéries

Le typage moléculaire des bactéries vient en complément des investigations épidémiologiques réalisées en cas de suspicion de cas groupés ou d'épidémie. L'idée générale est de démontrer que différentes souches appartenant à la même espèce bactérienne forment un clone c'est-à-dire qu'elles sont toutes issues d'une bactérie source commune. L'identification précise des isolats au niveau de l'espèce est donc un prérequis indispensable. Plusieurs méthodes ont été développées qui peuvent être schématiquement réparties en deux groupes.

12.2.7. Typage moléculaire par analyse de profils

Le premier groupe de méthodes, le plus souvent utilisé actuellement, repose sur l'analyse de profils de l'ADN chromosomique ou de fragments d'ADN chromosomique colorés par des bases intercalantes fluorescentes comme le bromure d'éthidium ou bien par des sondes marquées avec un fluorochrome.

12.2.8. Typage moléculaire par séquençage nucléotidique

Un deuxième groupe de techniques a été très récemment développé, qui repose sur le séquençage ou la quasi séquençage de fragments génomiques.

12.2.9. Détection moléculaire de la résistance aux antibiotiques

Il est possible de détecter la présence de gènes codant pour une résistance aux antibiotiques, comme le gène *mecA* codant fa résistance à l'oxacilline chez *Staphylococcus aureus*. Plusieurs troupes

de détection moléculaire de ce gène sont maintenant commercialisées.

13. Cocci à Gram positif

13.1. Les Staphylocoques

Les Staphylocoques ont été découverts dans un pus par Pasteur en 1880. En 1883, Ogston a créé le nom de « Staphylocoque » pour décrire ces grains (kokkos) groupés en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisin (staphylos). En 1884, Rosenbach a obtenu des cultures pures de ces bactéries. Il a scindé le genre *Staphylococcus* en deux groupes selon que les colonies étaient blanches ou dorées.

Position taxonomique et classification

La famille des *Micrococcaceae* est composée de trois genres de cocci à Gram positif en amas qui diffèrent par leur G + C % :

- *Staphylococcus* (30 -39 %),
- *Micrococcus* (65 - 75 %) et
- *Planococcus* (48 - 52 %).

Ce dernier genre n'est rencontré qu'en bactériologie marine. Les espèces appartenant à ces trois genres possèdent une catalase et se développent en aérobiose. Les cocci à Gram positif en amas qui se développent uniquement en anaérobiose sont dénommés *Peptococcus* et seront traités avec les bactéries anaérobies.

Le genre *Staphylococcus* occupe une place très importante en pathologie humaine et animale. Le genre *Micrococcus* a un pouvoir pathogène pratiquement nul.

Néanmoins des souches de microcoques sont fréquemment isolées en bactériologie médicale. Il s'agit alors de contaminants qu'il

faut distinguer des staphylocoques. Les caractères qui permettent de distinguer les genres *Staphylococcus* et *Micrococcus* sont indiqués dans le tableau I.

Tableau 8:Caractères permettant la différentiation entre Staphylocoques et Microcoques

Caractères	Staphylocoques	Microcoques
Composition en bases l'ADN G+C (mol %)	30-39	66-75
Présence de résidus glycine dans le pont interpeptidique du peptidoglycane	+	
Acide téichoïque de paroi	+	
Cytochromes c et d	-	+
Arrangement cellulaire	Amas, paires	Amas, tétrades
Type respiratoire	Aéro-anaérobie	Aérobie strict
Fermentation du glucose	+(-)	-(+)
Croissance en anaérobiose(thioglycolate)	+(-)	-(+)
Acidification du glycérol	+(-)	-(+)
Lysostaphine (disque 100µg)	S(R)	R(S)
Lysozyme (disque 50 µg)	R	S
Oxydase (cytochrome c)	-(+)d	+
Nitrofurantoïne (disque 300µg)	S(>15mm)	R(<15mm)
Bacitracine (disque 0,02 U)	R	S(10-25mm)
Composé 0/129 (disque 0,5 mg)	R (6-10mm)	S(20-36mm)

Diagnostic bactériologique d'une infection à *S. aureus*

Les prélèvements

Ils doivent être effectués avant toute antibiothérapie et pratiqués avec une asepsie rigoureuse : non seulement pour les hémocultures, les LCR, les urines, mais aussi éviter la contamination du produit pathologique par des souches de *Staphylococcus aureus* et de *S. epidermidis* souvent présentes sur la peau. La répétition des hémocultures permet de trancher en faveur d'une septicémie ou de souillures.

Les bactériologistes peuvent aussi être amenés à rechercher et à dénombrer les staphylocoques dans les aliments, les eaux, ou dans l'air en milieu hospitalier.

Examen direct

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif, de 0,8 à 1 μm de diamètre, disposés en amas, en diplocoques, en courtes chaînettes, voire en grappes typiques. Ils sont immobiles, asporulés, parfois capsulés.

L'observation de cocci à Gram positif en courtes chaînettes ou en amas dans un pus permet souvent d'évoquer un staphylocoque.

Caractères cultureux

S. aureus croît abondamment sur milieu gélose (colonies de 1 à 2 mm de diamètre) ; certaines souches produisent un pigment jaune-orange, mais cette production est irrégulière.

La culture est obtenue en 18 à 24 heures à 37°C (culture possible de 10 à 45°C) sur milieux ordinaires. *S. aureus* pousse en présence de fortes concentrations salines (milieu sélectif de Chapman à 7,5 % de NaCl). Le pH optimal est de 7,0 à 7,5.

Il existe, des variants exigeants en facteurs de croissance : thiamine, acide panthoténique.

Pour les produits monomicrobiens, l'isolement est facile en bouillon, ou en milieu solide non sélectif (trypticase-soja, Mueller-Hinton, gélose au sang).

Pour les produits pathologiques polymicrobiens ou les aliments, on doit recourir à des milieux sélectifs comme le milieu de Chapman (milieu hypersalé + mannitol) ou milieu de Baird-Parker au tellurite (utilisé surtout en microbiologie alimentaire).

Type respiratoire

S. aureus est un germe aérobie-anaérobie facultatif. Quelques souches exigent du pour croître. Toutes les souches produisent une catalase.

Identification

En 18 à 24 heures sur milieu gélose riche, on observe des colonies de 1 à 2 mm de diamètre produisant parfois un pigment jaune et constituées de cocci à Gram (+) en amas, catalase (+).

Sur milieu de Chapman, *S. aureus* provoque une acidification (virage au jaune) du mannitol ; sur milieu de Baird-Parker, *S. aureus* forme des colonies noires (réduction du tellurite) avec un halo clair (protéolyse) et, plus tardivement, une opacification dans le halo (lipase).

Sur les colonies suspectes, on recherchera la classique coagulase ou une inhibition de la nucléase thermostable à l'aide

d'anticorps. Des tests de dépistage rapide existent également (recherche du facteur d'affinité pour le fibrinogène et recherche de protéine A). Mais il existe quelques faux positifs et faux négatifs avec ces tests.

S'il s'agit de l'espèce *S. aureus*, l'identification est parfois complétée dans une perspective épidémiologique par des galeries plus poussées, par la sérotypie ou par la lysotypie.

13.2. Streptocoques

Le genre *Streptococcus* rassemble des espèces bactériennes qui ont en commun un certain nombre de caractères.

Leur morphologie

Ce sont des cocci à Gram positif, sphériques ou ovoïdes, disposés en paire pour former des diplocoques et pouvant se présenter sous forme de chaînettes parfois longues, ils ne sporulent pas.

Leurs propriétés métaboliques

Ils ne possèdent ni catalase (à la différence des staphylocoques), ni oxydase (à la différence des *Neisseria*).

Ils peuvent se développer en aérobiose, ont un métabolisme fermentatif et sont à considérer comme des anaérobies tolérant l'oxygène.

Des bactéries anaérobies strictes ont la même morphologie et appartiennent au genre *Peptostreptococcus*.

Le genre *Streptococcus* regroupe de nombreuses espèces. L'une d'elles *Streptococcus pneumoniae*, en raison de son importance clinique et de ses particularités sera envisagée séparément.

Parmi les autres, il en est qui partagent des points communs particuliers qui leur ont valu d'être rassemblées dans un nouveau genre : *Enterococcus*.

Enfin, il a été récemment proposé de regrouper les streptocoques lactiques dans le genre *Lactococcus*.

Caractères bactériologiques

Morphologie

Les streptocoques et les entérocoques se présentent sous forme de cocci à Gram positif. La taille de chaque élément est inférieure à 2 μ m ; elle varie avec les espèces.

Les cocci sont ronds ou ovalaires, le grand axe étant alors dans le sens de la chaînette.

En cas de souffrance (antibiotiques, mutants déficients) des formes pseudobacillaires ou monstrueuses peuvent être observées, elles prennent parfois mal le Gram. Les éléments sont groupés en chaînettes plus ou moins longues (de 2 à plus de 50 cocci) ; la division se faisant perpendiculairement à l'axe de la chaîne. Les éléments sont souvent rapprochés en diplocoques au sein de la chaîne.

Ils sont immobiles (à l'exception de quelques entérocoques : *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*).

Une capsule peut être observée avec certaines espèces.

Caractères cultureux

Conditions de culture

- ✓ Une atmosphère enrichie en CO₂ favorise les primocultures.
- ✓ La température optimale est de 37°C, mais les entérocoques poussent aussi à 45°C.
- ✓ Le pH optimal est de 7,3. Les entérocoques peuvent croître en bouillon à un pH atteignant 9,6. Un pH acide est néfaste à la croissance de la plupart des streptocoques en effet, il se produit une acidification secondaire d'où l'intérêt du milieu tamponné de Todd - Hewitt.

Aspect des colonies

La quasi-totalité des espèces se développent bien sur milieux riches type gélose Columbia.

Après 24-48 heures de culture, les colonies des streptocoques de groupe A, C et G ont un diamètre de 0,5 mm ; elles sont transparentes, translucides, en dôme (S).

Celles du groupe B sont plus larges (S), parfois pigmentées en jaune-orange en anaérobiose.

Celles du groupe D (entérocoques) sont souvent larges 0,5-1 mm, plus opaques, et souvent blanchâtres et peuvent ressembler à des colonies de staphylocoques. Celles des espèces non groupables ont des tailles variables allant de 0,1 à 0,5 mm, ont des aspects mucoïdes et brillants, elles sont parfois translucides.

A noter que les streptocoques des groupes A, C et G peuvent donner des petites colonies « minutes », tout comme les streptocoques du groupe F.

13.3. Genre *Aerococcus*

Aerococcus viridans Il s'agit de cocci à Gram positif, disposés en tétrades ou en amas. Sur gélose au sang, les colonies sont entourées d'une hémolyse verdâtre. *A. viridans* se distingue des streptocoques et des staphylocoques par le type respiratoire microaérophile. La catalase est variable.

Longtemps considéré comme un simple aérocontaminant, *A. viridans* se comporte parfois comme un opportuniste responsable d'infections hospitalières chez des malades fragilisés. Les causes favorisantes sont : diabète, immunodépresseurs, éthylisme et stase vésicale.

Peu sensible à la pénicilline G, *A. viridans* est très sensible à l'ampicilline, aux céphalosporines et au triméthoprim. La sensibilité à la gentamicine est faible.

13.4. Genre *Gemella*

Deux espèces sont décrites : *G. haemolysans* et *G. morbillorum*.

L'espèce type *Gemella haemolysans* a été isolée dans des cas d'endocardite infectieuse. On la trouve également dans le tractus respiratoire supérieur, les yeux et l'intestin. Il s'agit de bactéries anaérobies, immobiles, pouvant apparaître Gram (-), isolées ou groupées en paires ou courtes chaînettes. Elles sont catalase (-) et oxydase (-). *G. haemolysans* crée une hémolyse des érythrocytes de lapin ou de cheval.

Cette bactérie est bien sensible aux antibiotiques usuels sauf aux aminosides et aux sulfamides. «

13.5. Genres *Leuconostoc* - *Pediococcus*

Les genres *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont caractérisés par une résistance de haut niveau à la vancomycine (> 512 µg/ml). *Leuconostoc* peut se comporter comme un pathogène opportuniste et *Pediococcus* peut être sélectionné et isolé notamment dans les selles chez des sujets subissant une antibiothérapie lourde. Quelques caractères d'orientation permettent de distinguer ces genres (tableau I).

13.6. Genre *Stomatococcus*

Stomatococcus mucilaginosus est isolé dans près de 10 % des prélèvements bucco-pharyngésensemencés sur gélose au sang. Ce germe, souvent méconnu, hôte saprophyte de la gorge et de la bouche, est parfois responsable d'infections opportunistes ou de bactériennes transitoires. C'est pourquoi les principaux caractères d'identification de ce germe ne doivent pas être ignorés : il s'agit de cocci à Gram positif en amas, produisant un abondant matériel capsulaire, ayant une activité catalasique faible ou nulle, réduisant les nitrates en nitrites, hydrolysant l'esculine et la gélatine et produisant de l'acétoïne. Ces bactéries croissent sur gélose au sang ou sur milieu columbia, mais pas en présence de 5 % de NaCl. Elles forment des colonies blanches, non hémolytiques et adhérant à la gélose.

14. Neisseria

CARACTÈRES GÉNÉRAUX

Les *Neisseria* sont des cocci à Gram négatif, associés en diplocoques, parfois en tétrades, et immobiles. Bactéries aérobies strictes, à métabolisme uniquement respiratoire (une respiration des nitrates et/ou des nitrites est possible). Ils sont toujours catalase (+) et possèdent une cytochrome C oxydase. Leurs potentialités métaboliques sont limitées. Ce sont des hôtes habituels des muqueuses de l'homme et de l'animal. Ils peuvent être cultivés sur les milieux usuels (gélose au sang). A l'isolement, *N. meningitidis* nécessite du CO₂, mais cette exigence se perd au repiquage. *N. gonorrhoeae* est l'espèce la plus exigeante et nécessite des milieux riches et du CO₂ pour sa culture. La température de culture optimale est de 35 à 37°C. Le gonocoque et le méningocoque poussent de 30 à 38°C. Les autres *Neisseria* peuvent se développer à température ambiante (20°C).

Caractères bactériologiques

Morphologie

Dans un pus urétral *N. gonorrhoeae* se présente sous l'aspect de diplocoques à Gram (-), 0,7 x 1 µm de diamètre avec une face plane, une face arrondie réniforme et accolés par leur face plane en « grains de café ». Ils sont intracellulaires, dans le cytoplasme des polynucléaires ou extracellulaires. En culture ils sont polymorphes avec des formes géantes (autolyse), isolés, en diplocoques ou en tétrades.

Caractères culturels

La culture est difficile en raison des multiples exigences métaboliques. Le CO₂ est nécessaire à la croissance du gonocoque. La température optimale de croissance est de 35 à 37°C. Il est sensible aux acides gras contenus dans la gélose (addition d'hémine, de sang, ou d'amidon pour prévenir cette toxicité). Il est sensible aux métaux lourds.

L'exigence en cystéine est caractéristique de l'espèce. Certaines souches sont exigeantes en glutamine, thiamine ou thiamine pyrophosphate. Ces composés devront être ajoutés au milieu après stérilisation (PolyVite X, Supplément G...). Le fer est indispensable.

La croissance de *N. gonorrhoeae* est inhibée par certaines espèces (streptocoque hémolytique de groupe B, levures). Aussi ajoute-t-on les antibiotiques dans le milieu de culture sélectif (milieu VCF ou VCN) :

- ✓ vancomycine qui inhibe les bacilles à Gram (+) et cocci à Gram (+),
- ✓ colistine qui inhibe les bacilles à Gram (-),
- ✓ fungizone ou nystatine qui inhibe les levures,
- ✓ parfois du cotrimoxazole qui inhibe le *Proteus* (prélèvements anaux).

Ces produits inhibent 2 à 5 % des souches de gonocoques mais permettent son isolement dans les prélèvements plurimicrobiens (prélèvements vaginaux).

Kellogg a décrit 4 types de colonies selon leur aspect en transillumination oblique sur un milieu translucide.

A l'isolement les types I et n (colonies de petite taille) correspondent aux souches virulentes porteuses de pili.

Après repiquage les type III et IV (colonies plus larges) correspondant aux bactéries ayant perdu leurs pili deviennent prédominantes et finissent par être seules présentes.

15. *Acinetobacter*

Classification -Nomenclature

Il s'agit de coccobacilles, courts, souvent en diplocobacilles, immobiles, à Gram négatif. Ce sont des aérobies stricts, souvent encapsulés, ne réduisant pas les nitrates, catalase (+), oxydase (-). Prototrophes, ils peuvent croître sur un milieu minéral avec une source de carbone simple. GC 39 à 47 moles %.

Toutefois il n'est pas rare de trouver dans certains manuels une distinction entre diverses variétés ou biotypes : *A. calcoacticus* var. *anitratatus*, var. *haemolyticus*, var. *alcaligenes*, var. *Iwoffii*.

En 1986, Bouvet et Grimont se basant sur des études d'hybridation ADN-ADN ont décrit 12 géospecies. Ce nombre est aujourd'hui d'une vingtaine. Les caractères phénotypiques des six plus fréquents d'entre eux sont montrés dans le tableau I. *A. baumannii* est l'espèce la plus souvent isolée en milieu hospitalier.

Caractères généraux, physiologiques et métaboliques

Les colonies ont 1 à 2 mm de diamètre en 24 heures, elles sont lisses souvent muqueuses, blanc-jaunâtre et d'aspect butyreux.

Les nitrates ne sont pas réduits en nitrites ou alors très rarement et très lentement.

Certaines souches acidifient sans production de gaz le glucose, galactose, mannose, xylose, arabinose, lactose. Le glucose est oxydé en acide gluconique, les glucides sont oxydés en acides hexoniques et pentoniques par une aldose déshydrogénase non spécifique.

Les *Acinetobacter* capables d'utiliser le glucose comme source de carbone et d'énergie dégradent ce composé uniquement selon la voie d'Entner-Doudoroff.

La possibilité pour certains *Acinetobacter* (*glucidolytica*) de former de l'acide en aérobiose à partir du glucose est liée à la présence chez ces souches d'une glucose-déshydrogénase qui oxyde le D.glucose en D.gluconolactone et la possibilité pour certaines souches de croître aux dépens du glucose, est fonction de leur possibilité de dégrader l'acide gluconique. L'oxygène est l'accepteur terminal d'électrons pour la forme particulière de cette enzyme qui est absente chez les souches non saccharolytiques.

Acinetobacter ressemble aux *Pseudomonas* par le fait qu'il peut utiliser une large variété de composés organiques comme source de carbone et d'énergie. Il n'exige pas de facteurs de croissance particuliers et peut croître dans un milieu minéral simple avec une seule source de carbone et d'énergie. Les voies métaboliques utilisées par ce germe pour la biosynthèse ou la dégradation des composés aromatiques, des hydrocarbures, du 2-3 butanediol sont semblables à celles des *Pseudomonas* (Joni 1978).

Beaucoup d'*Acinetobacter* sont capables de dégrader des hydrocarbures de C8 à C20, en les utilisant comme sources de carbone et d'énergie : par exemple, le n-hexadécane est transformé en acide hexadécanoïque.

Toutes les enzymes du cycle de Krebs et du cycle du glyoxalate sont présents. Certaines souches utilisent le citrate d'autres pas.

Acinetobacter contient une chaîne respiratoire fonctionnelle de transporteurs d'électrons (cytochromes a₁ ; a₂ ; O ; d et b, le cytochrome c est absent).

Dans les conditions habituelles de l'identification bactériologique, *Acinetobacter* ne réduit pas les nitrates en nitrites, mais les sels d'ammonium, les nitrates et les nitrites peuvent servir de sources d'azote. Cultivé en présence de sels d'ammonium *Acinetobacter* produit une glutamate déshydrogénase liée au NADP. Cultivé en présence de nitrate ou de nitrite *Acinetobacter* synthétise une nitrate réductase assimilatrice à molybdène de 96 kDa.

Certaines souches *S'Acinetobacter* produisent des exoenzymes : lipase, gélatinase, hémolysine (phospholipase C).

16. Bacille à Gram positif aérobies

16.1. *Corynebacterium*

Généralités sur les Corynébactéries

La diphtérie est devenue exceptionnelle dans les pays riches, mais elle persiste dans les pays pauvres. Malgré sa rareté en France et en raison de la gravité, il est indispensable que les laboratoires de bactériologie soient capables d'identifier *Corynebacterium diphtheriae*. Avec les progrès de la bactériologie, on reconnaît d'autres corynébactéries qui peuvent être pathogènes-opportunistes lors des hospitalisations au long cours, notamment chez des sujets immunodéprimés.

Classification et nomenclature

La plupart des taxonomistes s'accordent pour restreindre le genre *Corynebacterium* aux seuls organismes :

- dont la paroi contient
 - ✓ de l'acide méso-diaminopimélique
 - ✓ de l'arabinose, du galactose
 - ✓ des chaînes d'acides mycoliques relativement courtes (22 à 38 atomes de carbone)
 - ✓ un GC% de 51 à 59 ;
- qui sont pour la plupart anaérobies facultatifs.

Il existe des relations entre les corynébactéries (humaines et animales), les mycobactéries et les *Nocardia* (ac. méso-diaminopimélique, arabinose, galactose, ac. mycoliques).

Les limites du genre *Corynebacterium* sont assez floues, avec certains représentants du groupe des « corynéformes », notamment *Brevibacterium* (ac.

mésodiaminopimélique (+), GC % 60-64), *Arthrobacter*, *Microbacterium*...).

Il a été proposé récemment de sortir du genre *Corynebacterium* les espèces *C. haemolyticum*, *C. equi*, *C. pyogenes* ; *C. haemolyticum* devenant *Arcanobacterium haemolyticum*, *C. equi* : *Rhodococcus equi* et *C. pyogenes* : *Actinomyces pyogenes*.

De même, on a proposé de classer un certain nombre de corynéformes dans le genre *Oerskovia*.

16.2. Listeria

Listeria monocytogenes, espèce-type du genre *Listeria* (du nom du chirurgien anglais Lord Lister) a été décrite en 1926 par Murray ; la bactérie a été isolée lors d'une épizootie atteignant des lapins et des cobayes qui présentaient une forte augmentation des monocytes circulants et des lésions de nécrose hépatique. Cette bactérie a été isolée ensuite chez différentes espèces animales domestiques et sauvages.

Chez l'homme, elle a été initialement isolée lors d'une méningite chez un adulte ainsi que dans différentes circonstances pathologiques jusqu'à ce que en 1933 Burn montre son rôle dans l'infection en période néo-natale. Les travaux de Seeliger ont par la suite souligné la place importante de *L. monocytogenes* en pathologie humaine.

Caractères généraux du genre

Le genre *Listeria* regroupe de petits bacilles à Gram positif de forme régulière, courts, à bouts arrondis parfois incurvés (0,4-0,5 x 0,5-2 μm) isolés ou en courtes chaînes présentant un arrangement en palissade et en lettres comme les corynébactéries, avec parfois des formes filamenteuses (6 - 20 μm) dans les vieilles cultures. Ils sont non sporulés, non capsulés et mobiles à 20-25°C par des flagelles péritriches.

Ce sont des bactéries aéro- anaérobies facultatives. La température optimale de culture est comprise entre 30 et 37°C, mais la culture est possible de 1 à 45°C. Sur gélose au sang elles donnent

des colonies hémolytiques lisses, translucides, gris-bleu, (espèces pathogènes).

Elles ont les caractères suivants : catalase positive, oxydase négative ; glucose fermenté avec production d'acide lactique ; esculine et hippurate hydrolysés, réactions rouges de méthyle et Voges-Proskauer positives ; pas de production d'indole, ni de SFL, pas d'hydrolyse de l'urée. Il existe des types antigéniques définis par des antigènes O et des antigènes H.

16.3. Bacillus

Le genre *Bacillus* comprend des bactéries en forme de bâtonnets, généralement mobiles, sporogènes. Ces bacilles sont à Gram positif, aérobies stricts ou anaérobies facultatifs.

Le genre *Bacillus* comprend une vingtaine d'espèces, mais on s'intéresse essentiellement à *B. anthracis*, en raison de son pouvoir pathogène (animaux, homme) et à *B. cereus* (intoxication alimentaire).

Néanmoins, depuis quelques années, de nombreuses publications rendent d'autres espèces de *Bacillus* responsables d'infections chez les immunodéprimés (bactériémies, méningites, méningo-encéphalites, pneumonies, endocardites).

Classification et nomenclature

Les espèces du genre *Bacillus* sont classées sur leur morphologie et la position de leurs spores. Cette classification divise le genre *Bacillus* en 3 groupes :

- Groupe 1 Bacilles à spores ne déformant pas le corps microbien,
- Groupe 2 Bacilles à spores déformantes, ovales,
- Groupe 3 Bacilles à spores déformantes, rondes.

A l'intérieur de ces groupes, les espèces et les variétés se distinguent par des caractères morphologiques et physiologiques.

Morphologie

Mobile par ciliature péritriche, à contrôler à partir d'un bouillon (*B. anthracis* est toujours immobile).

La coloration de Gram théoriquement positive peut être négative (le groupe 1 garde mieux la coloration).

La coloration simple à la fuchsine diluée permet de mieux apprécier les formes, les dimensions, la présence de vacuoles cytoplasmiques dues à des inclusions lipidiques.

Les *Bacillus* sont rarement capsulés, sauf *B. anthracis* dans certaines conditions.

Une gélose sans peptone est le milieu le plus favorable à la sporulation. La spore mûre est ovale ou ronde. Son diamètre est inférieur ou supérieur à celui du bacille. Sa localisation est centrale, paracentrale, subterminale ou terminale. Dans certaines espèces il existe des inclusions parasporales. Parfois on note la présence de cristaux de protéines.

La résistance aux agents physico-chimiques est faible pour les formes bacillaires, facilement tuées par le vieillissement et la chaleur (1 h à 55°C) et les antiseptiques.

Elle est plus élevée pour les spores (40 mn à 120°C). *B. subtilis* compte parmi les plus résistants.

Caractères cultureux

La plupart des espèces se développent mieux à 28-33°C qu'à 37°C, mais beaucoup d'espèces tolèrent des différences thermiques marquées.

Les déterminations des températures seuil de croissance sont réalisées sur gélose inclinées incubées au bain marie.

Les milieux de culture usuels permettent la croissance de la plupart des espèces du genre *Bacillus*.

Les espèces ont chacune leurs exigences propres et souvent relativement homogènes : utilisation d'azote ammoniacal pour les uns, des acides aminés pour les autres, etc...

Les milieux favorables ou hostiles utiles pour l'identification sont :

- gélose nutritive à pH 6,
- pomme de terre : culture ou non,
- bouillon hypersalé.

C - Caractères biochimiques généraux

Métabolisme respiratoire

Catalase (+), oxydase (\pm), aérobies stricts ou anaérobiose facultative suivant les espèces. *Nitrate réductase*

Elle est présente ou non suivant l'espèce.

Attaque des hydrates de carbone

En milieu complexe, l'acidification est souvent masquée. Il faut donc employer un milieu minéral gélose (milieu de Smith, Gordon, Clark), enrichi d'extrait de levure.

L'acidification ou non du glucose, arabinose et xylose suffisent généralement pour l'identification.

Production d'acétoïne (acétyl-méthyl-carbinol)

Sa production sur le milieu usuel de Clark et Lubs n'est pas toujours bonne. Il vaut mieux utiliser un milieu glucose, peptoné sans phosphate. La température favorable à la production varie suivant les espèces (32°C, 37°C et 45°C).

Autres caractères à étudier

Hydrolyse de l'amidon, de la caséine, de la gélatine,

Hydrolyse de la lécithine ; *B. subtilis* possède une phospholipase qui hydrolyse la lécithine en diglycéride et phosphorylcholine (opacification). Souvent, la réaction est R (= restreinte), c'est à dire très localisée sous la culture. Il faut donc parfois enlever les colonies pour la mettre en évidence.

- Indole : rarement positive.

-

Uréase.

17. *Enterobacteriaceae*

La famille des *Enterobacteriaceae* est constituée de genres bactériens qui sont rassemblés en raison de leurs caractères bactériologiques communs.

- Ce sont des bacilles à Gram négatif dont les dimensions varient de 1 à 6 μm de long et 0,3 à 1 μm de large ;

- Mobiles par une ciliature péritriche ou immobiles ;

- Se développant en aéro-anaérobiose et sur gélose nutritive ordinaire ;

- Acidifiant le glucose par voie fermentative (à la différence des *Pseudomonas*) avec souvent production de gaz ;

- Ne possédant pas d'oxydase (à la différence des *Vibrio* et *Pasteurella*) ;

- Réduisant les nitrates en nitrites.

Les *Enterobacteriaceae* ont un G + C % du DNA compris entre 38 et 60 mol %. Les travaux de taxonomie génétique basés sur l'hybridation de DNA ont entraîné la distinction récente de nouveaux genres et de nouvelles espèces dont beaucoup n'ont pas de pouvoir pathogène défini.

Voici les genres décrits dans la famille des *Enterobacteriaceae* :

Buttiauxella, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*,

Moellerella, Koserella, Leclercia, Morganella, Obesumbacterium, Proteus, Providencia, Rahnella, Salmonella, Serratia, Shigella, Tatumella, Xenorhabdus, Yersinia, Yokenella. Seuls les genres et les espèces qui ont un intérêt médical reconnu seront envisagés plus loin. Une centaine d'espèces d'*Enterobacteriaceae* sont individualisées, mais 23 d'entre elles représentent 99 % des souches isolées en clinique.

Caractères cultureux

Les *Enterobacteriaceae* se développent bien dans un bouillon ou sur une gélose ordinaire incubés 18 heures à 37°C.

- Les formes *S* (smooth) sont l'aspect habituel au sortir de l'organisme.

Les colonies sont lisses, bombées, brillantes et humides, elles ont 2 à 4 mm de diamètre. Le bouillon est trouble de façon homogène.

- Les formes *R* (rough) s'observent surtout avec des souches ayant subi plusieurs repiquages.

Les colonies sont rugueuses, sèches, à contours irréguliers et de teinte mate.

En bouillon, les formes *R* donnent un aspect grumeleux.

- Les colonies muqueuses sont habituelles avec les *Klebsiella*. Leur diamètre peut dépasser 10 mm ; elles ont une tendance à la confluence. On peut les rencontrer aussi avec d'autres espèces, notamment *Salmonella paratyphi B*.

- Les colonies naines s'observent avec des souches déficientes dans certaines de leurs chaînes métaboliques. Elles ne sont pas exceptionnelles chez les *Escherichia coli* isolés d'infections urinaires.

18. Bacilles à Gram négatif à croissance difficile

18.1. *Cardiobacterium hominis*

Slotnick et Dougherthy ont proposé en 1964 le nom de *C. hominis* pour désigner des bacilles à Gram négatif, polymorphes, de culture lente, placés initialement dans le groupe II-D (bactéries apparentées aux *Pasteurella*), responsables exclusivement d'endocardites. Il n'existe aucune parenté andgénique avec *Brucella*, *Streptobacillus*, *Pasteurella* et *Haenwphilus*.

Habita et épidémiologie

C. hominis fait partie de la flore normale des voies respiratoires supérieures et est présent dans le nez et le pharynx. Il est plus rarement présent au niveau du vagin.

Pouvoir pathogène naturel

Cette espèce bactérienne est responsable exclusivement d'endocardites. *C. hominis* est une espèce peu virulente. L'endocardite survient lors de bactériémie à point de départ oro-pharyngé et greffe sur des lésions préexistantes.

Diagnostic bactériologique

Le prélèvement est uniquement représenté par l'hémoculture qui est le seul moyen de diagnostic de l'endocardite à *C. hominis*. La culture positive est habituellement décelable après 1 à 7 jours d'incubation à 37°C (moyenne 4 jours) ; l'incubation doit être prolongée 2 à 3 semaines.

La culture se manifeste par un dépôt floconneux discret sans modification de la limpidité du milieu liquide.

Examen direct -morphologie

C. hominis est un bacille droit, à extrémités arrondies, parfois renflées, de

0,5-0,7 x 1-3 μm , polymorphe, avec des formes longues de 10-20 μm ; les bactéries sont isolées, par paires, en courtes chaînes ou groupées en rosette, en paquets d'épingles.

C'est un bacille à Gram négatif (avec la particularité de retenir le colorant dans sa partie médiane ou à l'extrémité renflée), immobile, non capsulé, non sporulé.

Culture- Caractères d'identification

C. hominis fait partie du groupe aéro-anaérobie facultatif ; certaines souches ont besoin de CO_2 (3 à 5 % de CO_2) à l'isolement.

En aérobiose, les souches ont besoin d'humidité. La croissance est obtenue à 30-37°C.

Les milieux doivent contenir de l'hémine, gélose au sang (lapin, mouton, cheval), gélose chocolat ; il n'y a pas de culture sur milieu ordinaire. En 48 heures, les colonies sont petites, 1-2 mm, lisses, circulaires, convexes, à bords nets, opaques, non hémolytiques.

Les bactéries possèdent un métabolisme fermentatif acidifiant divers sucres (glucose, fructose, saccharose...) sans production de gaz.

Les principales réactions biochimiques sont : oxydase (+), catalase (-), absence de réduction des nitrates en nitrites, ODC (-), urée (-), production d'indole en faible quantité recherchée après extraction par le xylène.

19. Bacilles à Gram négatif aérobies stricts

19.1. Pseudomonas

Bacilles à Gram négatif, mobiles par une ciliature polaire, rarement immobiles, non sporulés.

Bactéries chimio-organotrophes avec un métabolisme strictement respiratoire avec comme accepteur terminal d'électrons l'oxygène en aérobiose et pour certaines espèces le nitrate en anaérobiose avec synthèse d'une nitrate-réductase (« respiration des nitrates »).

Oxydatifs ou inactifs dans l'épreuve de Hugh et Leifson.

Presque toujours oxydase (+) c'est-à-dire possédant pour la plupart une chaîne cytochromique complète comprenant le cytochrome C et une cytochrome C oxydase.

Caractérisés par la pluralité des substrats hydrocarbonés utilisés comme source de carbone et d'énergie.

Bactéries très répandues dans la nature, caractérisées par leur résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques.

G + C % compris entre 58 et 70 (assez homogène).

Morphologie et structure

Bâtonnets droits et fins 0,5 à 1,3 μ m.

Structure des bacilles à Gram négatif, pas de différence significative dans la structure du peptidoglycane de la paroi.

Mobilité très vive en aérobiose. Ciliature polaire : monotriche - multitriche.

Pour les espèces multitriches le type de ciliature ne peut être établi que statistiquement en déterminant l'index flagellaire. Elle peut varier selon les conditions de culture.

Quelques souches et *P. mallei* sont immobiles et aciliées.

Croissance et nutrition

De nombreuses espèces ou souches de *Pseudomonas* ne cultivent pas à 37°C alors que la **température de 30°C** convient à tous, pathogènes et saprophytes.

- sont capables de cultiver sur des milieux minéraux synthétiques avec une source
- simple de carbone : acétate, pyruvate. Ces propriétés sont utilisées pour mettre en
- évidence les auxotrophies nécessaires pour l'identification.

Pigments élaborés par les *Pseudomonas*

Les deux pigments les plus fréquents et caractéristiques sont la pyocyanine et la pyoverdine.

Ds sont solubles dans les milieux de culture, et peuvent les colorer.

Les espèces pigmentées sont par exemple :

- *P. aeruginosa* : pyocyanine + pyoverdine, il possède l'un ou l'autre ou les deux, mais pouvant être perdus par mutation. Il existe des variétés mélanogènes **ou** érythrogènes produisant un pigment noir ou un pigment rouge.
- *P. fluorescens*, *P.putida*, *P.syringae*, et *P. cichorii* produisent de la pyoverdine mais certaines souches sont parfois apigmentées.
- *P. aureofaciens* : pigment jaune orange ou pourpre.

Caractères physiologiques

Ces bactéries ont une longévité faible en culture même à 4°C.

- Tous les modes de conservation possibles sont proposés : lyophilisation, eau distillée stérile avec une anse de culture à température ordinaire de 18°C

(*Pseudomonas* phytopathogènes), gélose inclinée avec huile de paraffine, surface d'une gélose molle, tube à vis comme pour les Entérobactéries, congélation.

- Propriétés lytiques : *P. aeruginosa* - autolyse tardive (4 à 5 jours) ou précoce (taches irisées à reflets métalliques sur gélose).

- Sensibilité aux agents lyriques : plusieurs espèces de *Pseudomonas* sont lysogènes et bactériocinogènes

-*P. aeruginosa* : probablement 100 % de souches lysogènes + nombreuses pyocines.

- *P. fluorescens* : lysogénie fréquente ; fluocines.

- *P. stutzeri* : lysogénie encore peu étudiée.

Ces caractères présentent un intérêt épidémiologique.

Métabolisme

Les *Pseudomonas* constituent le modèle des bactéries oxydantes ou dites

oxybiontiques. Le rendement de la croissance est strictement dépendant de la concentration en oxygène dissout donc de l'agitation.

- **Les** enzymes de la glycolyse (voie fermentative d'Embden-Meyerhof) **sont** absentes.

- L'oxydation complète du glucose en aérobiose est réalisée dans le shunt de l'hexose monophosphate ou voie de Warburg-Dickens-Horecker par l'intermédiaire du 6 P-gluconate, la voie du 2-céto-3 désoxygluconate (voie d'Entner-Doudoroff aboutissant au pyruvate qui alimente le cycle de Krebs). D'où l'intérêt du milieu de Hugh et Leifson (acidification dans le tube sans vaseline en aérobiose).

Paradoxalement pour des organismes aérobies stricts certains *Pseudomonas* peuvent tirer leur énergie d'une réaction catabolique en anaérobiose, par hydrolyse de l'arginine = système de **l'arginine dihydrolase** (ADH) qui est constitutif :



Ce système a permis de renforcer l'hypothèse selon laquelle la mobilité due au mouvement de flagelles est liée à l'ATP. Il est mis en évidence chez *Pseudomonas fluorescens*, immobile en anaérobiose mais qui devient mobile en présence d'arginine.

Cette réaction a une importance taxonomique. On note une alcalinisation du milieu donnant une coloration violette caractéristique (Milieu de Moeller).

L'attaque des hydrates de carbone par oxydation peut être à la base de l'identification des *Pseudomonas*, mais toutes les espèces ne donnent pas de produits acides à partir de sucres comme le glucose ; certaines donnent une alcalinisation ou sont inactives.

CLASSIFICATION

Le genre *Pseudomonas* est un genre pléthorique avec 160 espèces, un certain nombre d'études génétiques ont été réalisées et ont permis de diviser le genre *Pseudomonas* en 5 **groupes d'affinité génétique** différents : Groupes d'homologies d'après les hybridations ADN-rARN et ADN-ADN :

- Groupe génomique I groupe *fluorescens* + groupe *stutzeri* + groupe *alcaligenes*
- Groupe génomique II groupe *pseudomallei* + *cepacia*
- Groupe génomique III groupe *acidovorans*
- Groupe génomique IV groupe *diminuta-vesicularis*
- Groupe génomique V groupe *maltophilia* (*Xanthomonas*)

Il faut avoir conscience, et ceci est vrai pour toute bactérie largement répandue dans la nature, que le diagnostic d'une souche de *Pseudomonas* sera souvent effectué par la combinaison de plusieurs caractères. Ces germes ubiquitaires présentent de très nombreux biotypes qui tendent à s'écarter de l'espèce-type.

20. Autres bacilles non fermentant

20.1. *Flavobacterium*

Pendant longtemps, le genre *Flavobacterium* a présenté une très grande hétérogénéité : il rassemblait en effet des bacilles à Gram négatif ou positif, immobiles ou mobiles, à ciliature péritriche, bacilles dont la seule propriété commune était la pigmentation jaune de leurs cultures.

Dans la dernière édition du « *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* », 1984, le genre *Flavobacterium* a été redéfini comme regroupant « des bacilles à

Gram négatif, de 0,5 à 1-3 μm (en milieu liquide, présence de bacilles de longueur supérieure à 5 μm), ne formant pas de spores, aérobies stricts, (métabolisme de type strictement respiratoire), oxydase (+), catalase (+), immobiles et dépourvus de mobilité par glissement, et n'essaimant pas comme les *Cytophaga* ».

Les souches de l'environnement croissent entre 5 et 30°C, la plupart des souches d'origine humaine se développent également à 37°C. Les colonies sont translucides, parfois opaques, rondes, de 1 à 2 mm de diamètre, légèrement ou peu bombées, lisses, brillantes. Les colonies sont pigmentées en jaune, jaune orangé voire orangé (pigment non diffusible, dont la production est favorisée par une température de 15 à 20°C, par la lumière du jour et par l'emploi de milieux à base de caséine, de lait ou d'amidon) ou ne sont pas pigmentées. Chimio-organotrophes, la majorité des souches sont protéolytiques, hydrolysent la gélatine et la caséine, produisent

une DNase. Les nitrates ne sont généralement pas réduits. Différentes espèces produisent de l'indole.

Les *Flavobacterium* ont pour habitat le sol et l'eau : on les rencontre également dans les viandes crues, le lait et divers aliments, dans l'environnement hospitalier et dans divers prélèvements d'origine humaine.

La teneur en bases (G + C %) des ADN est comprise entre 31 et 42 moles %.

F. brève a été proposé par HOLMES et OWEN comme espèce-type du genre *Flavobacterium* en remplacement de *F. aquatile*. Selon ces auteurs, *F. aquatile* n'est pas représentatif de l'ensemble des espèces du genre *Flavobacterium* et s'apparente davantage aux *Cytophaga* qu'aux *Flavobacterium*.

Les autres espèces de *Flavobacterium* et les souches types correspondantes sont respectivement :

- *F. balustinum* (syn. *Flavobacterium* du groupe IIb),
- *F. meningosepticum* espèce la plus importante sur le plan médical,
- *F. odoratum*,
- *F. multivorum* (syn. groupe IIk, biovar 2),
- *F. spiritovorum*.

20.2. Agrobacterium

Ce genre a longtemps été considéré comme pathogène des plantes (par exemple *Agrobacterium tumefaciens*) : agent de tumeur du collet (crown gall), prolifération des racines (hairy root).

L'habitat de ces bactéries est le sol. Une espèce pourrait avoir un intérêt médical :

A. radiobacter (non pathogène pour les plantes).

Les souches hospitalières isolées présentent différents biotypes, avec trois caractères principaux : esculine (+), uréase (+), ONPG (+). Ce sont des bacilles mobiles à ciliature péritriche souvent dégénérée avec des flagelles peu nombreux.

Ils peuvent contaminer et être isolés dans divers produits pathologiques, leur signification clinique est difficile à établir même lors d'hémoculture positive.

20.3. Xanthomonas

Le genre *Xanthomonas* fut créé pour regrouper des bactéries phytopathogènes pigmentées en jaune voisines des *Pseudomonas*. Ce genre contenait une soixantaine d'espèces dont la distinction se faisait sur la base de leur pouvoir pathogène vis-à-vis d'une plante donnée.

La dernière édition du « Bergey's Manual » reconnaît cinq espèces principales :

X. campestris, *X. fragariae*, *X. albilineans*, *X. axonopodis*, *X. ampelina*.

Pseudomonas maltophilia a été transféré dans le genre *Xanthomonas*.

Morphologie

Bacilles à Gram négatif, mobiles par un cil polaire monotriche.

Caractères cultureux

Bactéries chimio-organotrophes, apparemment peu exigeantes mais pas absolument prototrophes. Température optimum 25 à 30°C. Les *Xanthomonas* produisent un pigment jaune, mais il y a des exceptions. A l'origine, défini comme étant de nature caroténoïde, il s'agirait en fait de xanthomonadine = aryl-polyènebrome, soluble dans les solvants organiques. Sur gélose nutritive contenant du glucose, certaines souches produisent un « slime » abondant.

Caractères biochimiques

- ✓ Oxydase (-) parfois faiblement positive
- ✓ Catalase (+)
- ✓ Fréquemment lipolytiques, protéolytiques, pectolytiques et/ou amylolytiques.
- ✓ Les caractères biochimiques simples de *X. maltophilia* (Avril, et al., 1992).

REFERENCES

Avril , J. I., Darernat, H., Denis, F. & Monteil , H., 1992. *Bactériologie clinique*. 2e éd. s.l.:Eidtion Marketing .

Ardre, M., 2014. *Dynamique de formation des biofilms de Bacillus subtilis à l'interface eau-air : experiences et modelisation*. Université Paris-Sud éd. s.l.:Thèse de doctorat.

Bouharmont, J., Masson, P. L. & Van Ho, C., 2017. *Biologie*. 4e édition éd. s.l.:De Boeck supérieur.

Coyette , J. & Mergeay, M., 2013. *Microbiologie*. 4e édition éd. s.l.:De Boeck Supérieur.

Faucher, J. & Lachaine, R., 2012. *Campbell Biologie*. 4e édition éd. s.l.:Bibliothèque et Archives nationales du Québec.

Laberche, J.-C., 2010. *Biologie végétale*. 3e édition éd. s.l.:Dunod.