



Structure, Classification & Identification



➤ Quelle est la Constitution du Monde Bactérien ?

≡ Le Monde Bactérien :

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

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

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

On peut classer les bactéries selon divers types :

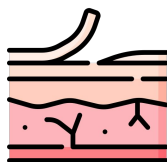
Les SAPROPHYTES	Les COMMENSALES	Les PATHOGÈNES
<p>Ce sont des bactéries environnementales qui participent à la <u>décomposition des végétaux</u>, plus généralement des matières organiques en matières minérales. Elles sont présentes dans l'air, dans l'eau et dans le sol (10⁹ bactéries par gramme de terre)</p> <p>(mémo: les saprophytes, <u>ça profite</u> de la nature)</p>	<p>Celles qui vivent en symbiose avec un hôte (comme celles dans tes intestins pour la digestion)</p>	<p>Celles qui peuvent <u>infecter</u> un hôte et provoquer des maladies :(</p>

Concernant les bactéries commensales, on en retrouve partout dans notre organisme.

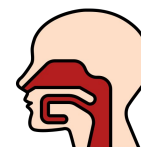
Par exemple, on a : +++



10¹⁴ bactéries dans le
CÔLON



10¹² bactéries sur la
PEAU



10¹⁰ bactéries dans la
BOUCHE & PHARYNX

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

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

* l'**IMMUNITÉ**, puisqu'elles vivent en **symbiose** avec nous (ce qui fait qu'on est capables de les **tolérer**) et stimulent notre système immunitaire

* l'**EFFET DE BARRIÈRE** qu'elles génèrent, car elles **inhibent** l'implantation d'autres bactéries exogènes (notamment les pathogènes, ça évite qu'on soit malades tout le temps...) et participent à la **déplétion** des nutriments et à la **dégradation** des toxines

* la **DIGESTION** des aliments (elles sont sacrément fortes quand même)

C'est important à savoir, car cela va entraîner des conséquences pour nous sur le prélèvement. La présence du microbiote et ses propriétés ont **trois conséquences importantes** sur la pratique bactériologique :



Premièrement, lorsqu'on veut faire un **prélèvement** dans un site où l'on risque de rencontrer des bactéries appartenant au microbiote, il faut veiller à ce qu'il se fasse dans des conditions d'**asepsie rigoureuse** (il s'agira donc de bien décontaminer avant de prélever, parce que sinon pour trouver la bactérie pathogène parmi toutes les autres c'est galère un peu). C'est en particulier le cas quand on prélève dans un site **stérile** comme le **LCR**, les **os** ou le **sang** que l'on peut alors mettre dans un bouillon de cultures : c'est ce qu'on appelle une **hémoculture**, durant laquelle on surveille la pousse bactérienne.

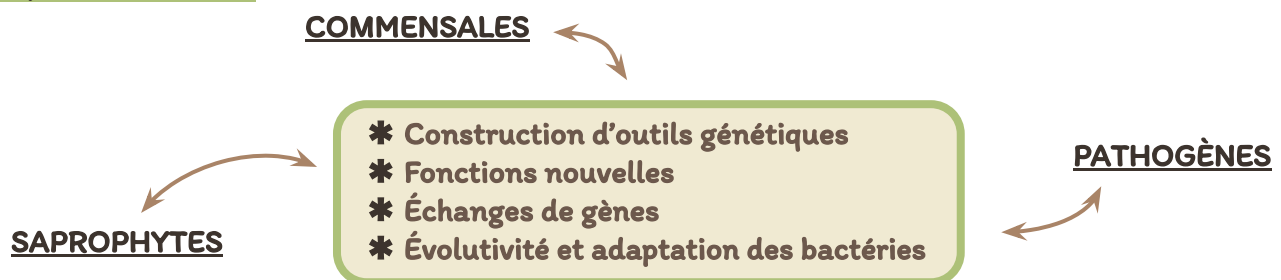


Deuxièmement, il faut savoir que le microbiote constitue un **réservoir de gènes** qui codent pour la **résistance aux antibiotiques**.



Troisièmement, il faut développer une stratégie lorsqu'on souhaite rechercher une bactérie **pathogène** dans un microbiote. Si l'on veut par exemple la rechercher dans les selles (qui contiennent beaucoup de bactéries), on effectue alors une coproculture (=culture des selles) et on adopte une **stratégie de sélection** et d'enrichissement qui permettra de la reconnaître.

Les trois grands types de bactéries (saprophytes, commensales et pathogènes) sont tous **en communication** entre eux. En effet, toutes ces bactéries **échangent** entre elles **des gènes et des outils génétiques**, ce qui leur permet d'évoluer, de s'adapter et de développer de nouvelles fonctions. C'est un aspect important pour les gènes de virulence, mais aussi et surtout, pour les gènes de résistance aux antibiotiques. Ça leur permet de s'adapter et d'évoluer.



➤ Quels sont les éléments essentiels de la structure des bactéries ?

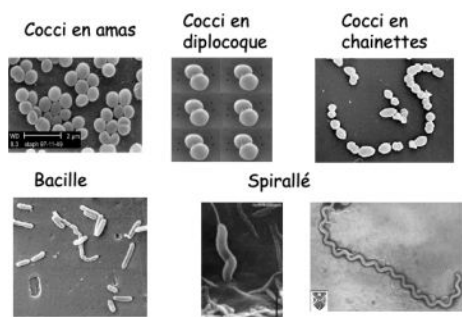
La bactérie correspond à un être **unicellulaire** qui possède une structure simple, **dépourvue d'organite**. À l'intérieur d'une bactérie se trouve **un unique chromosome**, lequel n'est **pas séparé du cytoplasme** par une membrane nucléaire, mais aussi de l'**ADN extra-chromosomique** qui forme des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

Une bactérie possède également :

- * Une **PAROI CELLULAIRE** qui forme une sorte de protection. Elle est très importante car elle permet à la bactérie de résister aux pressions osmotiques de par son peptidoglycane.
- * Parfois un **flagelle** et des **pili** (pluriel de pilus) ou **fimbriae** (c'est la même chose)
- * Une **MEMBRANE PLASMIQUE** qui correspond à une **barrière perméable sélective** qui est impliquée dans le transport des éléments nutritifs et des déchets mais aussi dans les processus métaboliques
- * Des **ribosomes** participant à la **synthèse des protéines**

La **paroi cellulaire** est un composant essentiel de la bactérie : c'est elle qui va **définir sa forme** et qui va lui permettre de **résister aux pressions osmotiques**. Pour classer une bactérie, on utilise sa forme et son **mode de regroupement**.

Si cette paroi n'existait pas, la bactérie **gonflerait** jusqu'à ce qu'elle **explose**. La forme de la bactérie donnée par la paroi est importante car c'est elle qui va nous permettre de la visualiser. Il en existe plusieurs : des formes de **cocci**, des formes **rondes**, des formes un peu moins rondes et **plus allongées**, des formes **complètement allongées**, des formes **spiralées**, etc. (dw on les revoit un peu plus loin <3)



On observe ici des images de bactéries de différentes formes observées au microscope électronique (bien qu'en pratique, dans un laboratoire de diagnostic, on utilise plutôt un microscope optique). Ces éléments nous permettront de nous **orienter vers le type de bactérie qu'on observe** (et surtout pas de poser directement un diagnostic, c'est simplement une orientation et pas une identification, faites attention en QCM!!)

Comment s'infecte-t-on par une bactérie ?

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

- * Soit par les bactéries de son **PROPRE MICROBIOTE** : une bactérie localisée dans un microbiote bien précis (qui peut-être la peau, le rhinopharynx ou encore les intestins) peut se **déplacer** vers un microbiote **inhabituel** et ainsi causer une infection.

Deux petits cas cliniques pour illustrer :

- ☆ Des bactéries localisées dans les intestins comme la bactérie *E. coli* peuvent **se déplacer** et se retrouver dans la **vessie**. Cela cause alors une **cystite** (notamment chez les femmes) qui entraîne des brûlures et qui nécessite de bien boire et parfois de prendre des antibiotiques.
- ☆ On sait que **20%** d'entre nous sont porteurs d'un germe qui s'appelle *Staphylococcus aureus* (plus connu sous le nom de **staphylocoque doré**), notamment dans le **rhinopharynx**. Ainsi, si quelqu'un a une plaie à ce niveau-là et qu'il la touche en se mettant le doigt dans le nez (qui fait ça??? bref), il peut amener la bactérie vers la plaie et provoquer une **infection purulente**.

Ce type d'infection peut être favorisé par **certains actes de soin** et notamment par un **acte opératoire** (puisque si la peau n'est pas bien décontaminée avant une opération, une infection par des bactéries de la peau peut survenir).

- * Soit par les bactéries de **L'ENVIRONNEMENT** : par ingestion d'eau ou d'aliments contaminés (ce qui peut donner des diarrhées), inhalation d'aérosols (qui peut donner des infections respiratoires **type pneumopathie à pneumocoque ou à méningocoque**), inoculation cutanée, muqueuse directe par la **salive** ou les **sécrétions sexuelles** ou alors transcutanée par les **insectes**.

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

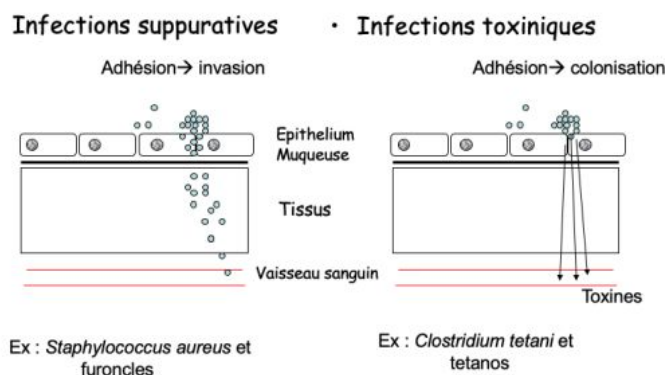
* L'infection **SUPPURATIVE** dans laquelle la bactérie se trouve au contact d'un épithélium ou d'une muqueuse et va ensuite se **multiplier** et entraîner une **réaction inflammatoire**. Elle va alors **migrer**, parfois **envahir** le tissu voire même passer **dans les vaisseaux sanguins**, ce qui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

* L'infection **TOXINIQUE** : dans ce cas on a une **adhésion**, une **colonisation** puis une **libération de toxines**, lesquelles seront responsables de toutes les manifestations de la maladie (exemple : *Clostridium tetani* qui entraîne le **tétanos**).

Petit récap' pour pas confondre les deux mécanismes :

- La **Suppurative**, c'est la bactérie en **elle-même** qui, en se multipliant, cause l'infection
- La **Toxinique**, c'est la bactérie qui libère des **toxines**, et ce sont ces toxines qui causent l'infection

À noter que certaines bactéries sont capables de **coupler les deux** mécanismes (sinon c'est pas drôle).



➤ Quelles sont les étapes du diagnostic bactériologique ?

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

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

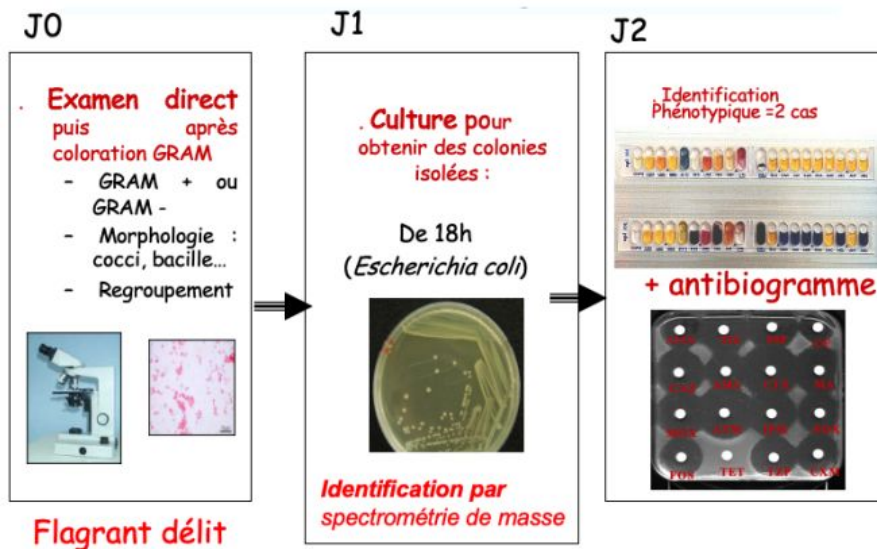
Plus précisément, le prélèvement doit se faire au site de l'infection et ne doit pas être "tous azimuts" car le résultat pourrait de ce fait ne plus être informatif (en gros on ira pas faire un prélèvement de selles alors qu'on a une infection dans le pharynx c'est pas logique mdr).

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

Une fois que le prélèvement est arrivé au laboratoire, on procède à l'**examen direct** et on effectue une **coloration de GRAM**. Cette coloration est importante car elle nous donnera une **orientation** sur le type de bactéries, en fonction du GRAM de la bactérie, de la forme des bactéries et de leur mode de regroupement (tout ça est revu plus tard, le prof spoile un peu).

+++ RAPPEL : On parle bien d'**ORIENTATION** et pas d'**IDENTIFICATION** +++
 (il faut faire encore d'autres tests pour être sûrs que c'est bien la bonne bactérie)

En fait il existe une certaine **cinétique**, une séquence pour la démarche diagnostique qui doit être respectée +++ car, contrairement à ce qu'on fait en biochimie, on travaille ici avec des organismes vivants.



± Ce qui se passe à J-0 :

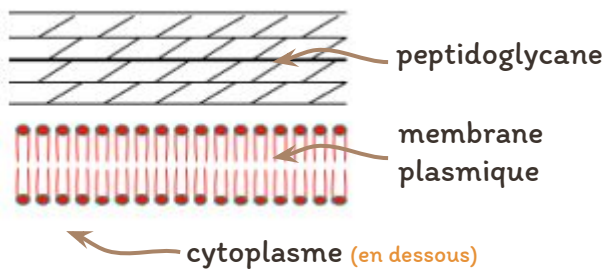
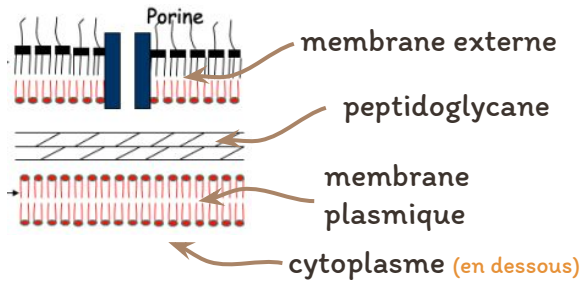
Cette séquence commence donc avec l'examen direct et la **coloration de GRAM** qui se fait à **J-0**. Lors de cet examen, on recherche un **"flagrant délit"** (et pas le fragment délire), c'est-à-dire la présence de bactéries dans un prélèvement normalement stérile qui ne peut être **due qu'à une infection**,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

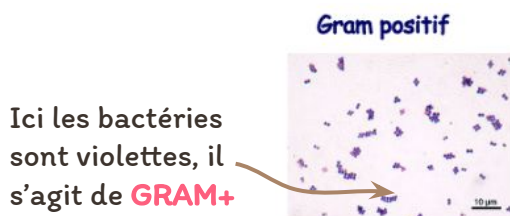
La **coloration de GRAM** se fait en plusieurs étapes :

- * D'abord, on réalise un **frottis** du prélèvement sur une lame
- * On **fixe le prélèvement** soit à l'alcool, soit à la chaleur
- * On recouvre la lame de **violet de Gentiane** qui colore **toutes les bactéries** (en violet du coup vous imaginez bien), puis on y met du lugol pour fixer le violet
- * On **déclore** à l'alcool jusqu'à ce qu'il n'y ait **plus de violet** : cette étape est **très importante** pour différencier les bactéries **GRAM négatif (GRAM-)** des bactéries **GRAM positif (GRAM+)** parce que l'alcool dissout les graisses, lesquelles sont essentiellement présentes chez les bactéries GRAM-. Ainsi, à ce stade, les **GRAM- sont incolores** tandis que les **GRAM+ vont rester violets** à cause de leur paroi épaisse qui résiste à l'alcool
- * On recolore à la **fuch sine** (qui donne une coloration rose) afin de pouvoir visualiser les bactéries GRAM-, les bactéries GRAM+ restant en violet
- * Et pour terminer on observe la lame au microscope avec un grossissement x100, après l'avoir recouverte d'huile à immersion.

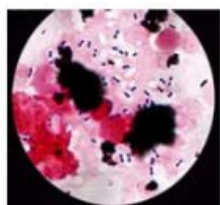
+++ Après coloration, les **GRAM+** sont donc en violet et les **GRAM-** en rose +++

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

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

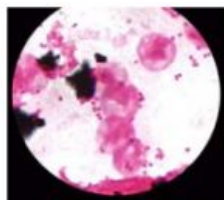
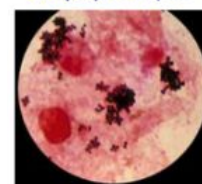


- après coloration de GRAM
- Observation au microscope optique objectif X100



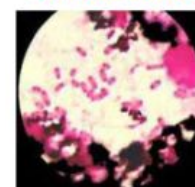
Sur cette photo on voit des **cocci à GRAM+** (étant donné qu'ils apparaissent violets) en diplocoques. Comparée à celles d'autres éléments (comme les hématies, les noyaux des cellules nucléées, etc.), on se rend compte que la taille des bactéries est très petite. Cette morphologie de cocci en diplocoques fait penser à des **streptocoques**, et si le patient chez lequel a été fait le prélèvement souffre d'une pneumonie franche lobaire aiguë, cela nous orientera vers des **pneumocoques**

Sur la deuxième photo, on observe des **cocci à GRAM+** cette fois en amas avec des tétrades typiques : cela oriente vers des bactéries de type **staphylocoque**.



Sur la troisième, on peut voir des petits **cocci à GRAM-** (là ils sont roses) en diplocoques, voire en grains de café. Cette morphologie suggère la présence de **méningocoques**, typiquement retrouvés dans le LCR.

Et finalement sur la dernière photo, on peut voir des **bacilles à GRAM-** qui peuvent correspondre à des **entérobactéries**.



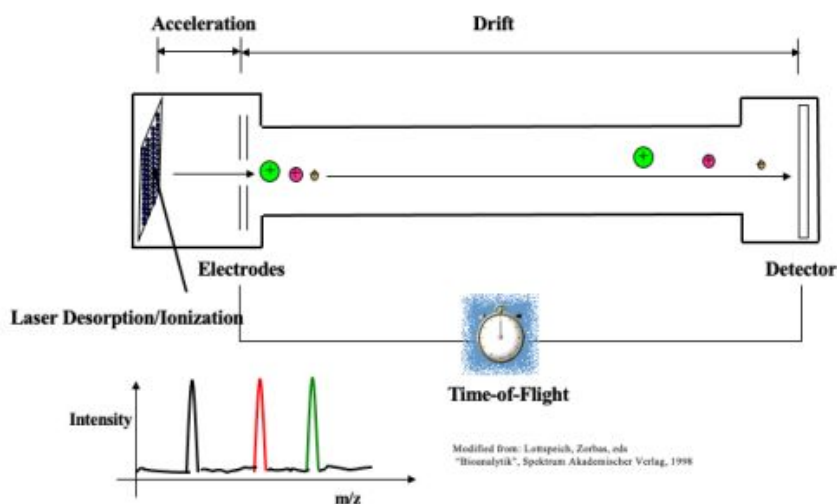
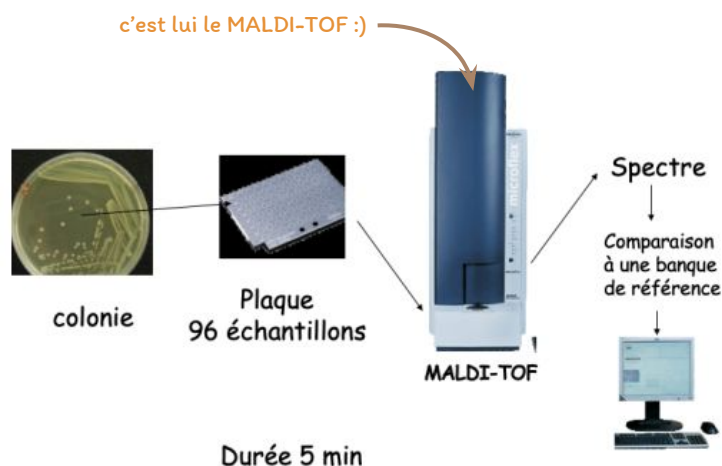
NDLR : N'apprenez pas forcément ces exemples-là, ils sont répétés plus bas dans la fiche en plus détaillé ;)

La coloration de GRAM est donc essentielle pour savoir vers quel type de bactéries s'orienter. On peut néanmoins utiliser une **autre coloration** : la coloration de **May-Grunwald-Giemsa** (MGG pour les intimes). Elle est nécessaire pour caractériser les cellules et déterminer la formule des polynucléaires, des macrophages et des lymphocytes (coucou l'histo <3).

± Ce qui se passe à J-1 :

À J-1, on observe, on analyse les cultures et on procède surtout à l'**identification** des bactéries par la méthode de **spectrométrie de masse**. On réalise ensuite, si nécessaire, un antibiogramme par diffusion en milieu gélosé : les colonies seront mises en suspension, puis celle-ci sera étalée sur une gélose et on dépose ensuite des disques d'antibiotiques (plus détaillé dans le cours 2).

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



D'un point de vue plus théorique, voici ce qui se passe au sein du **MALDI-TOF** : un **laser** est émis et vient "**taper**" une **cible**, ce qui provoque un **transfert d'énergie**. Les protéines se chargent alors **positivement** et vont **migrer** en fonction du **rapport entre la masse et la charge**. Ainsi, les protéines avec une **petite masse et une charge élevée** vont **migrer très rapidement** et donner sur le spectre le **premier pic** à gauche (**pic noir**), puisqu'elles atteignent le détecteur en

premier. Les protéines **plus lourdes et moins chargées migrent lentement** et donnent le **troisième pic** à droite (**pic vert**). On obtient alors plusieurs pics (générés par les protéines bactériennes) qui forment un **spectre**.

spectres qui d'ailleurs ressemblent à ça (celui-ci c'est le staphylocoque doré) (dsl c'est flou)



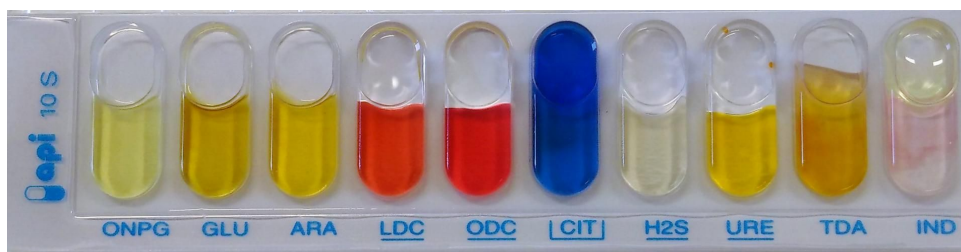
Le **MALDI-TOF** correspond à une innovation **utilisable en routine**, dans la mesure où elle **réduit** le délai de rendu de l'identification de **18 à 24h sur galerie à moins d'une minute**, et elle correspond à une **démarche universelle** qui fonctionne quelle que soit l'espèce bactérienne considérée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

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

≠ Ce qui se passe à J-2 :

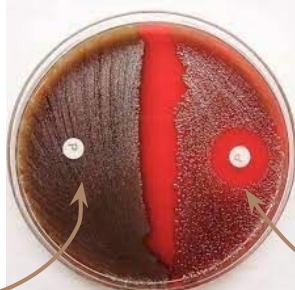
Le **MALDI-TOF** présente cependant un problème : il n'est **pas capable de distinguer certaines espèces bactériennes proches**. Nous allons voir deux cas de routine (en réalité il en existe d'autres) :

* Entre *E. coli* et *Shigella sp.* : ces bactéries possèdent pratiquement le **même ADN**, mais ne produisent **pas les mêmes toxines**, à cause d'un plasmide que seules les shigelles ont, et n'entraînent **pas la même pathologie**. *E. coli* correspond à une bactérie généralement **commensale** (seules quelques souches sont en fait pathogènes), tandis que *Shigella sp.* correspond **toujours à une bactérie pathogène**. La distinction entre les deux n'est recherchée **que dans les cas d'infections intestinales et de réalisation de coprocultures**. Dans ces cas, on identifie les bactéries avec l'**ancienne méthode**, en utilisant des **galeries d'identification phénotypiques** (cf. en bas du paragraphe). Plusieurs substrats sont incorporés dans la galerie, et les colonies de bactéries seront ensuite mises en contact avec ces substrats. Par exemple, la bactérie tout à gauche de la galerie a déjà acidifié tous les sucres qui sont alors devenus jaunes (bien qu'ils étaient bleus au début comme celui du milieu).



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

Ici, le disque ne s'est pas formé, la bactérie est donc **résistante à l'optochine** : c'est ***Streptococcus oralis* ou *mitis***



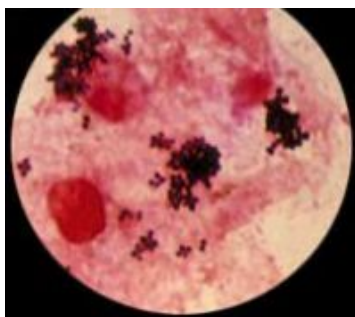
Là, il y a bien un diamètre d'inhibition, la bactérie est donc **sensible à l'optochine** : c'est ***Streptococcus pneumoniae***

Ces deux tests correspondent à des **méthodes d'identification phénotypique**, réalisée à **J-2**. Le même jour, on va également lire l'antibiogramme, qui présente **plusieurs disques d'inhibition** autour des antibiotiques (chaque disque comprenant un antibiotique différent, ce qui permet d'étudier jusqu'à 16 antibiotiques différents sur une même gélose).

Cette cinétique est très importante, c'est ce qui différencie l'hématologie de la bactériologie : ce n'est pas une spécialité où on peut tout mettre dans un tube et avoir tout ce qu'on cherche d'un coup, "**on ne peut pas aller plus vite que la musique**". Dans tous les cas, il est important d'**identifier l'espèce bactérienne mise en cause**, parce qu'à **chaque espèce bactérienne** correspond un panel d'infections, un degré de virulence et un spectre de sensibilité aux antibiotiques (ce qui influencera le traitement).

➤ À quelle(s) espèce(s) de bactérie(s) faut-il penser selon le GRAM, l'habitat et le pouvoir pathogène ?

Nous allons maintenant voir des exemples d'identification de bactéries selon plusieurs éléments. (svp apprenez-moi ça par cœur le prof aime bien le faire tomber ++++).



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

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

Les staphylocoques blancs ont des propriétés d'adhésion, ils sécrètent des sucres d'adhérence, ce qui leur permet d'infecter les surfaces, et c'est difficile de s'en débarrasser. (faut bien nettoyer les paillasse)



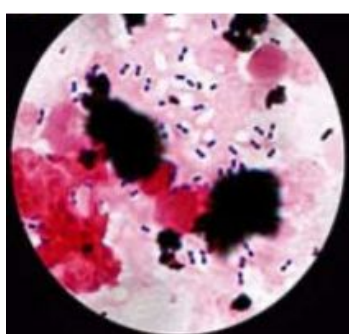
DEUXIÈME CAS : Bactéries de morphologie **Cocci GRAM+** **en chaînettes**

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

Dans le cas d'une angine, le médecin généraliste va faire un test pour savoir si l'angine est d'origine virale ou bactérienne à *Streptococcus pyogenes*, pour savoir s'il doit prescrire des antibiotiques. On assiste, sans trop savoir pourquoi, depuis 3 mois à une explosion d'infections cutanées graves à *Streptococcus pyogenes*, que l'on appelle des érysipèles, des plaques rouges inflammatoires d'apparition brutale qu'il faut traiter rapidement.

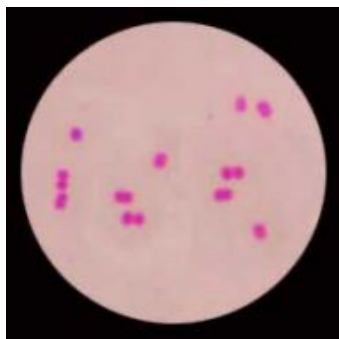
On a tous dans notre tube digestif des *Streptococcus agalactiae*. Le risque pour les femmes enceintes, c'est qu'elle colonise les voies vaginales et entraîner une infection néonatale au passage du bébé lors de l'accouchement. On les dépiste donc lors du dernier trimestre.

(retenez surtout les 2 premiers, le reste osef un peu)



TROISIÈME CAS : Bactéries de morphologie **Cocci GRAM+ en diplocoques** (=courtes chaînettes)

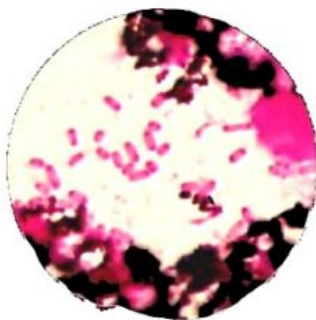
Nom & Genre d'Espèce	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Nom Courant	Pneumocoque
Habitat	Voies respiratoires
Pouvoir Pathogène	Otites (chez les enfants avec un certain risque contagieux), pneumonies et méningites , voire parfois des endocardites



QUATRIÈME CAS : Bactéries de morphologie **Cocci GRAM- en diplocoques** (=courtes chaînettes)

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

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



CINQUIÈME CAS : Bactéries de morphologie **Bacille GRAM-** (en présence d'une coloration bipolaire qui renforce le rose)

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

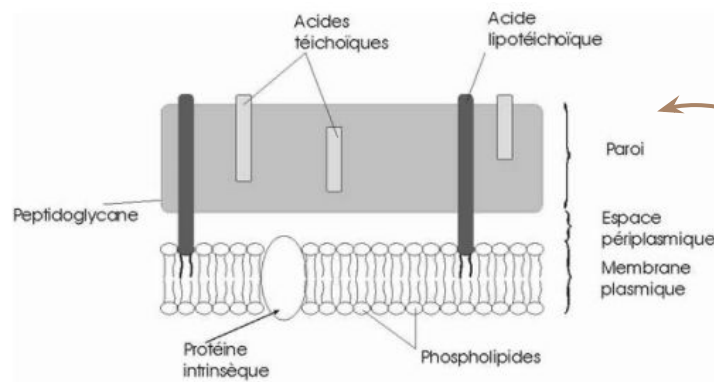
Il existe 2 types de salmonelles : les salmonelles mineures (qui donnent plutôt des infections digestives) et les salmonelles majeures (à l'origine de la fièvre typhoïde).

➤ Quels sont les éléments de la structure de la paroi des bactéries à GRAM- et GRAM+ ?

++ RAPPELS ++

La **paroi cellulaire** détermine la forme de la bactérie et confère des **propriétés biochimiques** visibles en coloration de GRAM. Le **peptidoglycane** n'est **pas le même** selon que la bactérie ait un GRAM négatif ou positif.

≡ Paroi d'une Bactérie à GRAM+ :

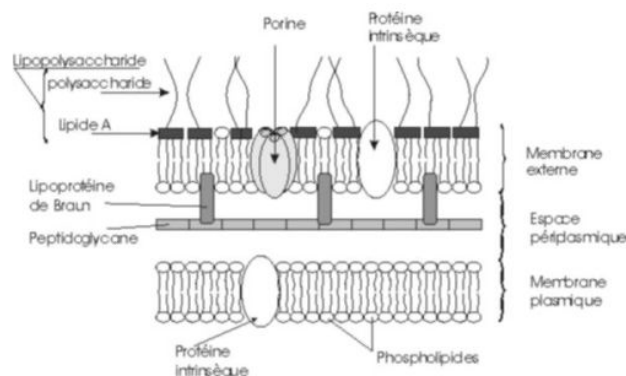


essayez de bien visualiser les schémas pour bien comprendre les différents composants :)

On observe la périphérie du cytoplasme (tout en bas), la membrane plasmique avec ses **phospholipides** et ses **protéines intrinsèques**, et plus à l'extérieur le **peptidoglycane** qui constitue la paroi. Il faut savoir que ce peptidoglycane est amarré à la membrane plasmique par des **acides lipotéichoïques**.

On observe également au sein de cette paroi des **acides téichoïques**. Ce sont des molécules qui ne sont **présentes que chez les bactéries à GRAM+** et qui correspondent au deuxième composant majeur de leur paroi (**50% du poids sec de la paroi**). En outre, ces acides téichoïques présentent parfois un **pouvoir antigénique**, ce qui fait qu'ils peuvent jouer un rôle important dans les **infections**.

≡ Paroi d'une Bactérie à GRAM- :



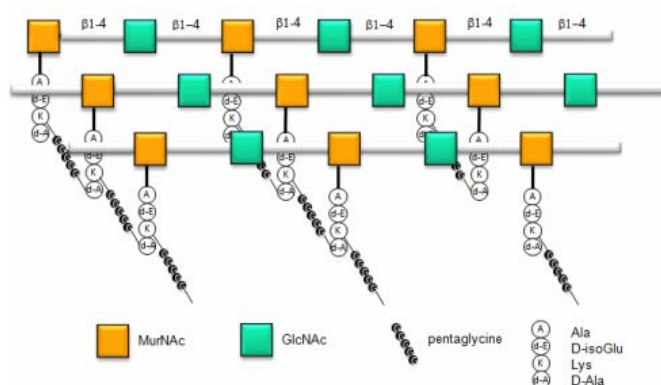
La paroi d'une bactérie GRAM- est plus complexe. On peut ici voir, de l'intérieur vers l'extérieur, la membrane plasmique avec des **phospholipides** et des **protéines**, le **peptidoglycane** (dont le volume est réduit), et une membrane externe qui possède des **porines**, des **lipopolysaccharides** et des **protéines intrinsèques**. Le peptidoglycane est cette fois-ci amarré à la membrane externe (et pas la membrane plasmique!!), et ce par des **lipoprotéines de Braun** dont la partie protéique est associée au peptidoglycane, et la partie lipidique à la **membrane externe**. Ces lipoprotéines de Braun ont un rôle essentiel dans la **cohésion et la stabilisation** de la paroi. Vous avez aussi des porines, des structures protéiques qui s'agencent entre elles et créent un canal pour laisser passer entre autres les antibiotiques.

Concernant les **lipopolysaccharides**, il faut retenir qu'ils ne sont **présents que chez les bactéries à GRAM-** et qu'ils représentent le constituant essentiel de leur membrane externe.

Il comporte deux parties :

- * le **LIPIDE A** qui correspond au **support de la toxicité** de la molécule entière
- * le **CORE** (un polysaccharide) dont la composition varie d'une espèce à une autre. Aussi appelés "**endotoxines**", ils sont impliqués dans le **choc septique** (qui résulte d'une infection grave) et peuvent entraîner une réaction inflammatoire démesurée. Leurs **chaînes latérales** sont plus ou moins longues et constituent l'**antigène somatique** qui a un rôle prépondérant dans ce choc.

➤ Quelle est la structure du peptidoglycane ?



Le **peptidoglycane**, aussi nommé muréine ou mucopéptide, est un **polymère de chaînes linéaires** de **N-acétylglucosamine** et d'**acide N-acétylmuramique**, qui correspond en fait à un réseau de sucres et d'acides aminés. Effectivement, ces chaînes sont liées entre elles par de courtes **chaînes peptidiques** qui sont des **tétrapeptides** (typiquement la D et L-alanine, le D-glutamate et la L-lysine), au niveau de l'acide N-acétylmuramique. Les **tétrapeptides** sont eux-mêmes reliés entre eux par transpeptidation entre une D-Alanine d'une chaîne et la L-lysine d'une autre chaîne. Sur le schéma du dessus, on voit la structure du peptidoglycane, avec tous les éléments mentionnés et aussi des liaisons peptidiques entre les tétrapeptides (**pentaglycine**).

Il est important de connaître cette structure car c'est elle qui sera ciblée par les antibiotiques.

La synthèse du peptidoglycane **commence dans le cytoplasme** avec des **précurseurs** qui génèrent des sucres avec des acides aminés. Il y a ensuite maturation des précurseurs dans la **membrane plasmique**, puis insertion dans la paroi qui est par ailleurs **en cours de formation et de dégradation**, dans le peptidoglycane déjà existant. On remarque qu'il existe **plusieurs enzymes impliquées** dans cette synthèse (des transglycosylases, des transpeptidases, etc...). C'est là que vont agir les **antibiotiques** : ils **inhibent la synthèse** des peptidoglycanes en bloquant les enzymes, ce qui a une **conséquence sur la forme** des bactéries puisque celle-ci dépend des peptidoglycanes. Ainsi, avec des **peptidoglycanes absents ou altérés, la bactérie gonfle et meurt**.

Voici quelques exemples à connaître : (on les verra mieux dans le cours 3 :D)

- * la **FOSFOMYCINE** agit sur les précurseurs en inhibant la pyruvyl transférase
- * les **GLYCOPEPTIDES** bloquent l'élongation des peptidoglycanes
- * et surtout les **β -LACTAMINES** inhibent les transglycosylases, les transpeptidases et les carboxypeptidases.

➤ Quelle est la composition de l'ARN ribosomique et quel est l'intérêt de son étude ?

++ RAPPELS ++

Dans les bactéries (tout comme dans les cellules eucaryotes), ce sont les **ribosomes** qui s'occupent de la synthèse des protéines.

Les bactéries n'ont pas de membrane nucléaire, elles baignent dans le milieu. C'est pour ça qu'elles réagissent super vite aux signaux provenant de l'extérieur en produisant une protéine. Les ribosomes jouent un rôle essentiel pour cette synthèse.

On considère typiquement **trois ARN ribosomiques** (ou ARNr) : le **23S**, le **5S** et le **16S** (ici S ça veut dire Svedberg, c'est l'unité de mesure du coefficient de sédimentation). Ces ARNr vont ensuite se lier à des protéines ribosomiques pour former des **sous-unités**. Ainsi, le **23S** et le **5S** forment avec certaines de ces protéines la **sous-unité 50S**, tandis que le **16S** forme avec d'autres protéines la **sous-unité 30S**. C'est l'association de ces deux sous-unités qui forme le **ribosome** avec un taux de sédimentation de **70S** chez les bactéries.

La **découverte de ces ribosomes** s'est en revanche faite **dans l'autre sens**, puisqu'en chauffant les ribosomes on a découvert les sous-unités, puis en chauffant ces derniers on a finalement trouvé des protéines et des ARNr.

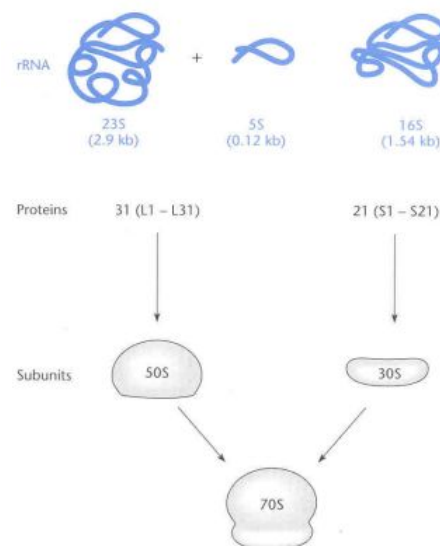
La **petite sous-unité** des bactéries comprend donc un ARNr avec une constante de sédimentation de **16S**. Cet ARNr correspond à une molécule de choix pour **retrouver les liens de parenté** entre les espèces car elle est **universelle chez les procaryotes** (chez les eucaryotes, c'est l'ARNr 18S qui tient ce rôle).

Une particularité de cet ARNr 16S est qu'il est fait d'une succession de **séquences à vitesse d'évolution variable**, avec des séquences **conservées**, des séquences **variables** et des séquences **hypervariables**. C'est intéressant car ça permet, en comparant les séquences conservées, de voir à quelle famille, à quel genre voire à **quelle espèce appartient la bactérie** étudiée. Le fait d'avoir ces séquences conservées tout au long de l'ARNr permet d'**hybrider des amorces** et d'**amplifier le gène** qui code pour l'ARNr de **n'importe quelle bactérie**. Ainsi, l'amplification et le séquençage de ce gène sont **universels**.

La **quantité de ribosomes** disponible dans chaque bactérie est très importante, ce qui permet de faire une **hybridation in situ** (avec des sondes fluorescentes) afin de visualiser les bactéries. Enfin, il faut savoir que la banque de l'ARNr 16S correspond à **la plus grande banque de séquences** communes (avec plus de 200 000 séquences).

On doit le **séquençage** de cet ARNr à Carl Woese : c'est lui qui a commencé à le **séquencer** et à **comparer** ses différentes séquences avec celles des autres bactéries. Il a ainsi remarqué la présence de **séquences conservées et de séquences différentes** et a in fine réussi à établir **l'arbre phylogénétique** en ordonnant les séquences des plus communes au moins communes.

C'est d'ailleurs de cette façon qu'on a proposé de **séparer les eubactéries** (qui comptent notamment les bactéries commensales et pathogènes pour l'homme) des **eucaryotes** et des **archées**. Toujours est-il que l'origine de la vie demeure inconnue.



L'identification moléculaire des bactéries fonctionne ainsi : à partir d'un prélèvement, on **extraît l'ADN correspondant à l'ARNr 16S** et on **l'amplifie par PCR** avec des **amorces universelles**. Puis on fait un **séquençage** et on fait une **lecture** afin de pouvoir par la suite comparer la séquence obtenue à une banque de données et ainsi **identifier la bactérie**.

Néanmoins, il s'agit d'une stratégie qui ne sera utilisée **que dans quelques cas** :

* Soit à partir d'une **colonie isolée**, pour identifier une **bactérie non reconnue par spectrométrie de masse** et qui présente **d'autres caractérisations phénotypiques**.

* Soit à partir d'un **prélèvement**, si :

→ On visualise des bactéries au **microscope** mais qu'elles ne sont **pas cultivables** sur les milieux de culture habituels

→ La **culture est négative**, le plus souvent **après un traitement antibiotique**, afin de **vérifier l'absence** d'une bactérie donnée

→ Le prélèvement est **considéré comme stérile**, notamment sur des **tissus**, c'est-à-dire ne contenant **pas de microbiote** et **à priori monobactérien** (LCR, liquide articulaire, valve cardiaque...).

Dans les autres cas, **quand c'est polymicrobien**, on préférera la **spectrométrie de masse** qui est **plus efficace** et **moins coûteuse**. On peut aussi utiliser le séquençage haut débit, mais c'est plus long. Par exemple, une bactérie comme *Tropheryma whippelii*, qui cause la maladie de Whipple, n'était jusque-là pas cultivable (et encore, ajd on met 45 jours pour qu'elle se cultive).

➤ Qu'est-ce qui caractérise la plasticité du génome bactérien ?

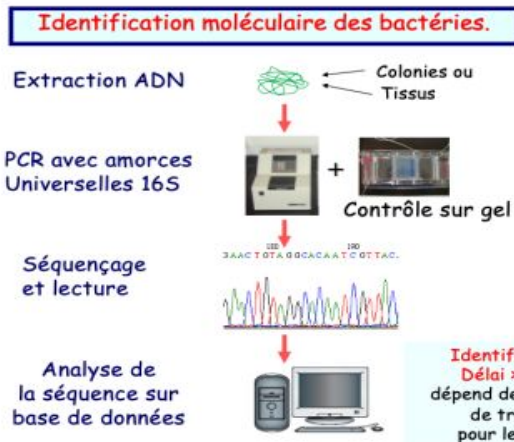
Cela concerne des structures comme l'**ADN chromosomique** et l'**ADN extra-chromosomique**. Le génome évolue par des **mutations aléatoires non corrigées** lors de la réplication de l'**ADN chromosomique ou plasmidique**, à une fréquence **1 sur 10⁶ à 10⁷ nucléotides** plus faible que chez les virus, qui vont se fixer dans la population par **pression de sélection**. En effet, si la mutation touche la **cible des antibiotiques**, celle-ci ne sera plus reconnue et conférera aux bactéries une **résistance aux antibiotiques**. Le génome peut aussi évoluer par **acquisition d'un nouveau matériel génétique** puisque les bactéries sont capables de **recupérer de l'ADN externe** par le biais de plusieurs réactions (**transformation, transduction et/ou conjugaison** notamment). Ca a été typique de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) et la streptomycine.

Point Définition <3 :

Un **PLASMIDE** correspond à de l'**ADN circulaire, superenroulé et extra-chromosomique**, dont la **réplication est indépendante de l'ADN chromosomique** et qui est situé **dans le cytoplasme**.

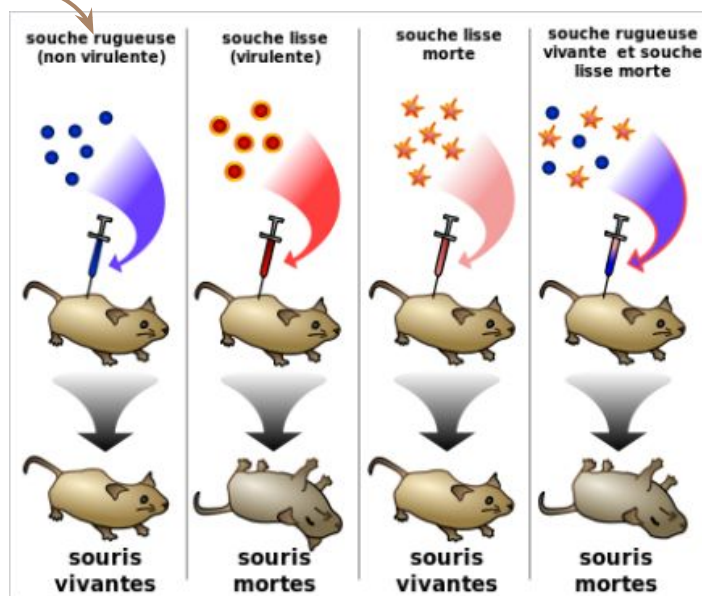
En général, un plasmide a une **petite taille** (de l'ordre d'un centième de celle du chromosome bactérien) et porte pourtant une **grande diversité de gènes**. Il contient ainsi des gènes nécessaires à sa **réplication**, des gènes **structuraux** (impliqués dans la formation des **fimbriae**), des gènes **métaboliques et cataboliques** qui confèrent des **caractères absents chez les souches** de l'espèce (ce qui peut parfois être source d'erreur pour l'identification), des gènes de **production de toxines** mais aussi et surtout des gènes de **résistance aux antibiotiques**.

Et voici quelques mécanismes qu'utilisent les bactéries pour acquérir du nouveau matériel génétique.



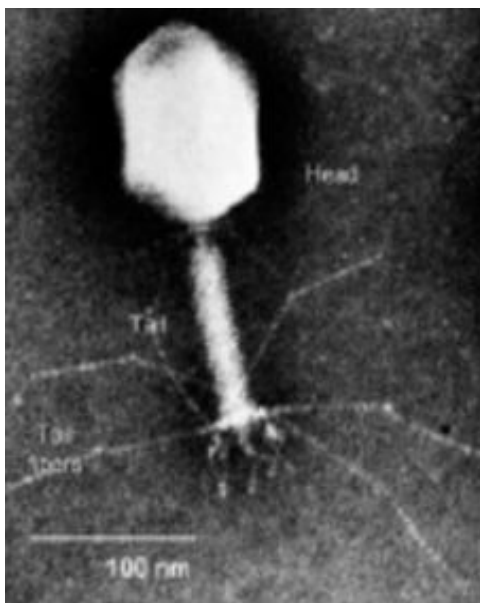
≡ La Transformation :

Elle a été découverte en **1928** avec l'**expérience de Griffith** (donc bien avant la découverte de l'ADN). Dans cette expérience, des colonies de *Streptococcus pneumoniae* d'abord rugueuses non virulentes ont été injectées chez des souris en intra-péritonéal. Après injection, la souris reste vivante. Cependant, en injectant une souche lisse virulente, la souris meurt après l'injection. On a ainsi pu distinguer les souches virulentes létales des souches non virulentes et non létales. Ensuite, on a injecté des souches virulentes qui ont été chauffées pour être tuées ; la souris reste vivante. Pour finir, on a injecté à la fois une souche virulente morte et une souche non virulente vivante ; après injection, la souris meurt. Au terme de cette expérience, Griffith a conclu qu'il existe quelque chose dans les bactéries virulentes qui passe vers les bactéries non virulentes (qui deviennent de ce fait virulentes), et ce même si elles sont mortes.



Ce qu'il ne savait pas c'est que c'étaient plus précisément des fragments d'ADN qui transitaient d'une bactérie à une autre.

≡ La Transduction :



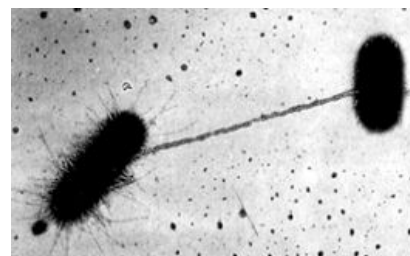
Elle se fait via un virus qui n'infecte que des bactéries, c'est-à-dire un bactériophage, qui va se fixer sur une bactérie et lui injecter son ADN. Une fois la bactérie infectée, il peut suivre un cycle lytique ou un cycle lysogénique.

* Dans un cycle lytique, le bactériophage va se reproduire et détruire la bactérie pour libérer ses clones. Chaque clone peut recupérer des morceaux d'ADN de la bactérie. Une piste thérapeutique utilisant le cycle lytique est en cours de développement pour traiter des infections ostéoarticulaires graves.

* Dans un cycle lysogénique, le bactériophage va plutôt s'intégrer dans le chromosome et rester "en dormant". À ce moment-là, il apporte à la bactérie de l'ADN issu d'autres bactéries précédemment infectées, et qui peut coder pour de nouveaux caractères.

≡ La Conjugaison :

La conjugaison se fait entre une bactérie mâle et une bactérie femelle par l'intermédiaire d'un pilus sexuel. Et c'est au sein de ce pilus que seront échangés des fragments d'ADN chromosomique ou plasmidique, le transfert dépendant du temps de contact entre les deux bactéries.



➤ Quelles sont les bases et les règles de classification des bactéries ?

L'**espèce** correspond à l'**unité fondamentale** de la classification, et la **souche** à une **sous-division** de l'espèce. Un **clone** désigne la **population descendant d'une même souche**.

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

- * un critère **phénotypique**, avec un ou des **caractère(s) distinctif(s)** des autres espèces
- * un critère **génomique**, qui correspond à une **hybridation ADN/ADN** supérieure ou égale à **70%**, à température optimale.

En réalité, ces deux critères commencent à devenir **abandonnés de nos jours** car on compare des bactéries avec **95%** de séquences complètes génomiques **identiques**. Ainsi, la **classification des bactéries** est devenue **phylogénétique** et se base sur **l'amplification et le séquençage de l'ARNr 16S** et plus simplement de l'ADN correspondant, voire désormais sur un **séquençage haut débit** de **tout** le génome bactérien.

Pour terminer, la **nomenclature des bactéries** correspond à l'ensemble des règles qui régissent l'attribution d'un **nom à chaque taxon** distinct ; elle est **universelle** et **hiérarchique**. Comme vu précédemment, le nom d'une bactérie comprend un nom de **genre** (qui commence toujours par une majuscule) et un nom d'**espèce** (tout en minuscule).

Domaine	Ex. : Bacteria
Règne	Procaryotae
Phylum	
Classe	Schizomycetes
Ordre	Micrococcales
Famille	Micrococcaceae
Genre	Staphylococcus
Espèce	S. aureus

Et voilà c'est la fin de ce cours (ouf)! En vrai vous remarquerez que le prof se répète pas mal donc on comprend bien les notions importantes (et surtout y'a des parties que vous pouvez skip psq c'est les mêmes). Bon vous connaissez si jamais vous avez des questions, que qqch n'est pas clair... direction le forum!!

dédi à MissCrobio aka le ballon de foot du tutorat

dédi à Philo, à son obsession pour les pâtes et à Avatar 2 dont on a jamais vu la fin

dédi à Yoshi, le lapin de ma sœur (photo ci-dessous) regardez-le comment il est trop mims (sauf quand il me mord les pieds)

pas dédié au QRU 38 de l'épreuve de SP/SN de l'an dernier qui était en fait un QCM #traumatisme (lisez les énoncés pitié)

dédi à Carla ma cotut de viro on est trop une bonne équipe <33 même quand tu lis pas mes messages <3

dédi à Ilona votre best kiné (pas dédié à tes corpuscules par contre ew)

dédi à Mathilde et à ses talents de couture (fais-moi un patch stp), faudra qu'on se regarde l'Eurovision un jour

dédi à Manon, une SF de qualitéééé (pas pour rien qu'on a le même prénom hehe)

dédi à Marine et à notre stage de gastro, à la RCP et au dernier patient qui a dû se sentir bien seul pendant 5 minutes

dédi à Sofia et à son jeu d'acteur exceptionnel (les marseillais à nice je m'en remet toujours pas)

dédi à vous, vous êtes trop forts <3



Dédi à celui qui trouvera quel organe est dessiné ici (il est immonde bon courage)
(rassurez-vous c'est pas patbaq qui l'a dessiné)

