

# Cours 1. Les bactéries : Structure, Classification, Identification

Introduction par notre super professeur Ruimy : La bactériologie s'inscrit dans les cours de microbiologie. C'est complètement nouveau cette année, et les tuteurs (*c'est nous !*) sont là pour vous apporter les réponses avec moi si vous avez des questions. Il y aura 2 cours en présentiel et un cours en distanciel. Le premier cours concerne les bactéries, leur Structure, Classification et Identification (*celui-là t'as capté*). Ces cours-là sont des cours avec beaucoup de connaissances, mais aussi un peu de réflexion. Un peu de réflexion, ça change un peu de la médecine (*Ahaha..*). Le cours sera fait sous forme de questions, auxquelles on va apporter des réponses (*je vous remet les questions au début ;-)* Si tu sais y répondre, c'est que t'es un(e) boss de la bactério)

## Première série de 6 questions :

- 1) Quelle est la constitution du monde bactérien ?
- 2) Quels sont les éléments essentiels de la structure des bactéries ?
- 3) Comment on s'infecte par une bactérie ?
- 4) Quelles sont les étapes du diagnostic bactériologique ?
- 5) Pourquoi avons-nous besoin d'identifier les bactéries ?
- 6) A quelles espèces faut-il penser selon le GRAM, l'habitat et le pouvoir pathogène ?

## 1) Quelle est la constitution du monde bactérien ?

### Le monde bactérien

Les premières bactéries sont apparues il y a **3,5 milliards** d'années ! Soit **1000 fois** avant les premiers hommes, qui sont apparus il y a **3,5 millions** d'années.

Les bactéries sont des organismes qui sont **hautement adaptables** (tout-terrain) grâce à leur :

- **Plasticité du génome (éléments mobiles)** : elles ont un génome très plastique qui leur permet de s'adapter à ces différentes niches écologiques.
- **Nombre (des milliers d'espèces)**
- **Lieux (partout)**

Le tutorat est gratuit. Toute vente ou reproduction est interdite.

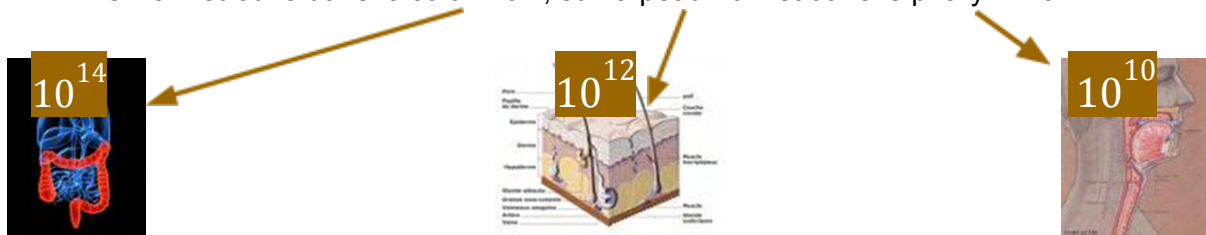
## Les divers types de bactéries

Saprophytes	Commensales	Pathogènes
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Décomposent les végétaux (matières organiques en matières minérales)</li> <li>- Sont des bactéries environnementales, présentes dans l'air, l'eau et le sol (<math>10^9</math> bactéries /g de terre)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vivent en symbiose avec leur hôte</li> <li>- Stimulent le système immunitaire</li> <li>- Effet de barrière</li> <li>- Contribue à la digestion des aliments</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Capacité d'une bactérie à produire une maladie</li> </ul>

### Point sur les bactéries commensales :

Nous avons des bactéries commensales partout. Nous sommes des êtres hybrides, à la fois eucaryote et procaryote. Nous avons sur nous quasiment autant de cellules eucaryotes que de cellules procaryotes. Ces cellules procaryotes sont les bactéries commensales et forment les flores commensales ou **microbiote**.

On en retrouve dans le côlon  $10^{14}$ , sur la peau  $10^{12}$  et dans le pharynx  $10^{10}$ .



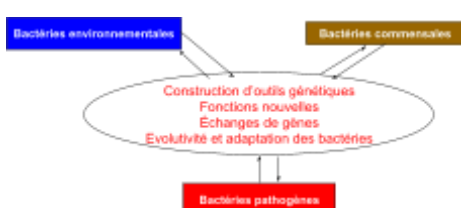
Elles ont un **effet de barrière**, qui permet :

- d'inhiber l'implantation de bactéries étrangères notamment pathogènes.
- la déplétion des nutriments (participe au métabolisme).
- de même dégrader des toxines.

Toutes ces propriétés ont 3 conséquences importantes pour la pratique bactériologique :

- 1) Ca impose une **asepsie** rigoureuse pour réaliser un prélèvement dans un site dit **stérile** (LCR, sang, os)
- 2) Les bactéries commensales constituent un **réservoir** de gènes, notamment de **gènes de résistance aux antibiotiques**.
- 3) Lorsque l'on cherche une **bactérie pathogène** dans un **microbiote**, il est nécessaire de **développer une stratégie** pour les rechercher parmi les **autres bactéries**.

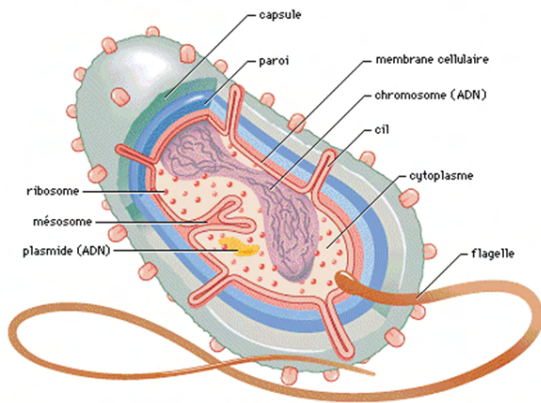
### Communication entre les différentes bactéries



Les **bactéries environnementales**, les **bactéries commensales** et les **bactéries pathogènes** sont en communication. Il y a des échanges de gènes. Il y a une évolutivité et une adaptation des bactéries. Elles échangent aussi des outils génétiques.

## 2) Quels sont les éléments essentiels de la structure des bactéries ?

Dans une bactérie, on retrouve :



Un **chromosome**, qui baigne dans le cytoplasme. Il n'est pas séparé par une membrane nucléaire. Il est formé d'ADN circulaire.

Des **plasmides**, ADN circulaire extrachromosomique.

Une **paroi cellulaire**. (très importante on va y revenir)

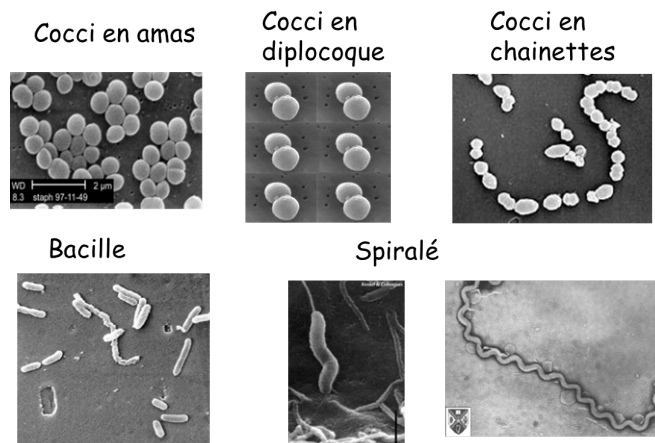
Une **membrane plasmique** qui est une barrière perméable sélective. Elle permet le transport des éléments nutritifs et des déchets (processus métabolique).

Des **flagelles, pili, fimbriae**.

Des **ribosomes** qui participent à la synthèse protéique.

### La paroi cellulaire : définit la forme et l'arrangement des bactéries

La paroi cellulaire va permettre à la bactérie de **résister aux pressions osmotiques**. S'il n'y avait pas cette paroi, la bactérie gonflerait et exploserait. Cette paroi très particulière va donner une forme, et c'est ces formes qui vont nous permettre de visualiser les bactéries :



On a des formes de **Cocci (=rondes)**, des formes un peu rondes, des **Bacilles (=de forme allongée)**, des formes **spiralées**.

Ce sont des images de microscope électronique. En pratique au laboratoire de diagnostic on utilise plutôt des microscopes optiques. Il faut bien comprendre que ces éléments vont nous orienter vers le type de bactérie.

Par exemple, quand les bactéries se regroupent en amas (*en haut à gauche*), ça nous fait penser à des staphylocoques.

### 3) Comment on s'infecte par une bactérie ?

#### Par les bactéries de sa propre flore ou microbiote

On peut s'infecter par une bactérie, qui était par exemple sur la peau, dans le pharynx, ou en intestinal. **Par déplacement** de cette bactérie vers un microbiote inhabituel, ça peut donner une infection.

**Exemple :** Les bactéries qui sont dans le microbiote intestinal comme *E. coli* peut se déplacer et se retrouver dans la vessie, c'est la cystite. Ça brûle, il faut bien boire et parfois prendre des antibiotiques.

**Exemple :** On sait que 20% d'entre nous sont porteurs d'un germe qui s'appelle *Staphylococcus aureus*, notamment dans le rhinopharynx. Donc si quelqu'un a une plaie, qu'il se met les doigts dans le nez (*beuurk*) et qu'il touche sa plaie, ça peut donner une infection purulente.

Un microbiote peut contaminer une plaie et peut être à l'origine d'une infection. C'est parfois aussi favorisé par les actes de soin ou un acte opératoire (chirurgie).

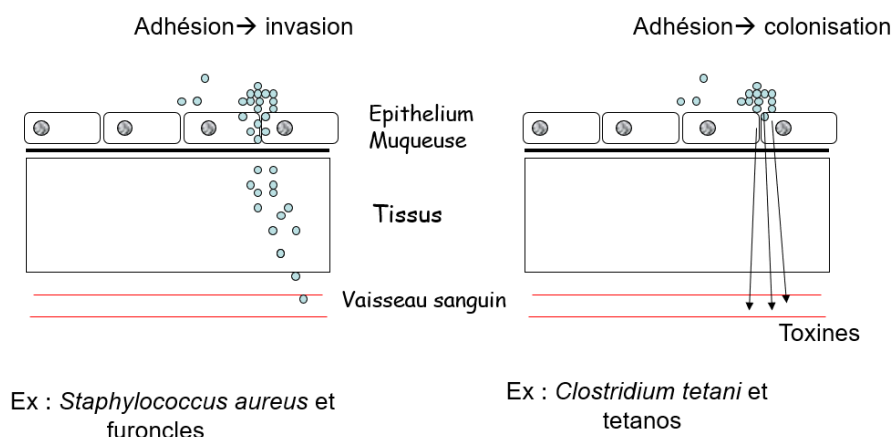
#### Par les bactéries de son environnement

Il y a plusieurs façons de s'infecter :

- Soit par l'ingestion d'eau, d'aliments contaminés, qui va donner une diarrhée.
- L'inhalation d'aérosols va donner des infections respiratoires.
- L'inoculation cutanée.
- L'inoculation des muqueuses directe par la salive ou les sécrétions sexuelles.
- Ou par voie transcutanée par les insectes.

#### Deux types de mécanismes d'infection

- Infections suppuratives
- Infections toxiques



Dans les **infections suppuratives**, la bactérie apparaît au contact de l'épithélium ou de la muqueuse. Elle **se multiplie**, ce qui entraîne une **réaction inflammatoire** et puis les

bactéries vont **migrer**. Elles vont parfois **envahir le tissu et même passer dans les vaisseaux**, ce qui peut donner des infections graves.

Dans les **infections toxiques**, il y a une **adhésion**, une **colonisation**, et une **libération d'une toxine**. C'est cette toxine qui va être responsable de toutes les manifestations de la maladie.

Donc simplement on a un type suppuratif et un toxinique. Bien sûr, certaines couplent les deux. (*"sinon ce serait trop facile" Ahaa yes*)

## **4) Quelles sont les étapes du diagnostic bactériologique ?**

### **Faire un bon prélèvement**

C'est vraiment le plus important. On le néglige souvent parce que ce n'est pas très noble. C'est essentiel de le faire de manière rigoureuse parce qu'il va **influencer sur le diagnostic et/ou sur le traitement**.

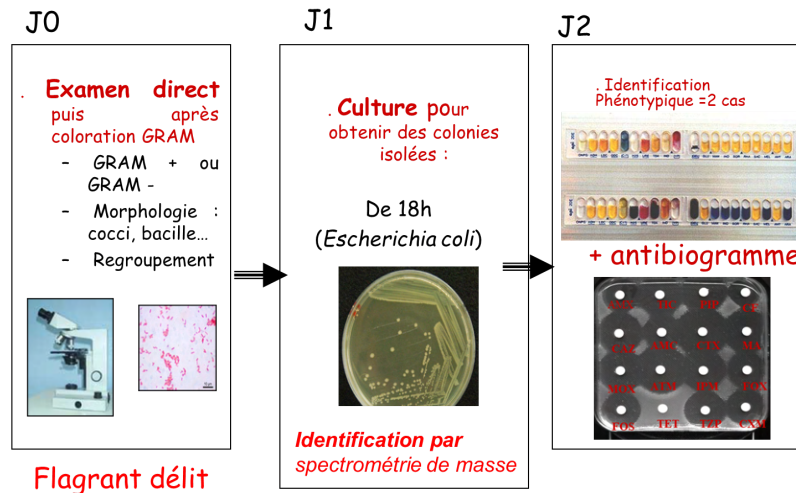
Le prélèvement se fait **au site de l'infection**. Il ne faut pas faire de prélèvement "tout azimut", c'est-à-dire un peu sur la peau, un peu sur les selles... parce que ça ne va pas être informatif.

Il se fait **avant toute antibiothérapie** (*C'est logique, si on les déglingue avant on ne les voit plus*). **Avec une seule exception : les méningites**. Dans ce cas, l'urgence est de traiter le patient.

On prélève une **quantité suffisante** pour l'examen direct et pour ensemercer les milieux.

Il faut une **bonne réalisation** du geste. C'est essentiel de respecter les règles de prélèvement (pour éviter le risque de contamination par les flores) et de respecter les règles de transport.

*(bon retiens ça surtout pour les années sup, j pense qu'en stage il a vu des étudiants qui faisaient de tout. La suite est très importante. je mets le plan/récap en haut de la page suivante pour la compréhension)*



## Examen direct

Le prélèvement est arrivé au laboratoire. On va faire l'examen direct, avec une coloration (on est bien en microscopie optique) qui s'appelle la coloration de GRAM.

Cette coloration va nous donner une **orientation** en fonction de **la forme** des bactéries et **du mode de regroupement** de ces bactéries. (et là "vous voyez que le stéthoscope du microbiologiste c'est le microscope")

On est à **J0** et on va suivre la cinétique. On travaille avec des organismes vivants, donc on doit respecter cet ordre qui commence par l'examen direct. Ça permet de trouver un éventuel **flagrant délit** : Si on retrouve des bactéries dans un **prélèvement stérile** (de LCR par exemple) c'est que **forcément on a une infection**. Ça ne peut pas être une contamination.

## Coloration de GRAM

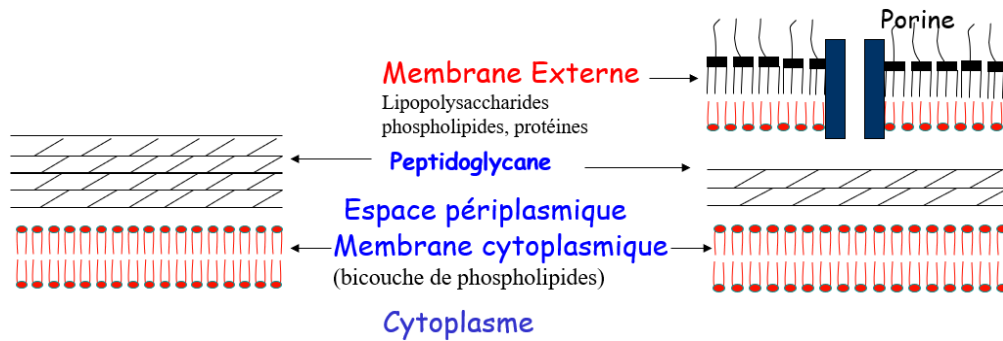
### La méthode :

- On réalise un **frottis** du prélèvement sur une lame.
- On le **fixe** soit à l'alcool, soit à la chaleur.
- On va recouvrir la lame de **violet de Gentiane**, qui colore toutes les bactéries.
- On utilise du **lugol** pour fixer le **violet**.
- On **déclore à l'alcool** jusqu'à ce qu'il n'entraîne plus de violet. L'alcool va dissoudre les graisses, qui sont présentes chez les **Gram négatif** (=GRAM -). Donc **à cette étape, les Gram négatif sont incolores alors que les Gram positif restent violet** car elles ont une paroi très épaisse qui va résister à l'alcool.
- Ensuite pour voir les **Gram négatif** on met de la **fuchsine** qui comme son nom l'indique est rose. Le **rose** sur le **violet des Gram +** reste **violet**.
- Ensuite on observe au microscope optique avec un **objectif × 100**. (après avoir recouvert la lame d'huile à immersion).



## Différence de structure de paroi entre un GRAM+ et un GRAM-

La paroi confère des propriétés biochimiques.



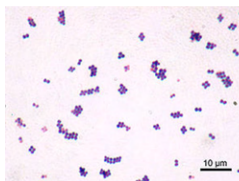
A gauche, le Gram+ a de l'extérieur vers l'intérieur :

- Le **peptidoglycane**. C'est une structure uniquement retrouvée chez les bactéries, faite d'acides aminés et sucres.
- Une membrane plasmique.
- Le cytoplasme.

A droite, le Gram- a de l'extérieur vers l'intérieur :

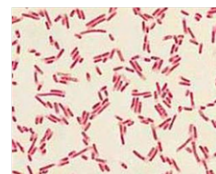
- Une **membrane externe**, qui contient des **porines** (structures protéiques qui forment des canaux).
- Un **peptidoglycane** qui est **très petit**.
- Une membrane cytoplasmique.

Gram positif



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

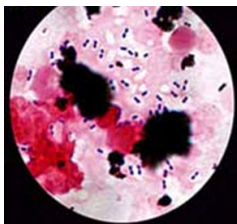
Gram négatif



Donc les **Gram positif vont être violet**, et les **Gram négatif vont être rose**. C'est le peptidoglycane qui permet de faire la différence dans la coloration de Gram. Donc le **type de Gram**, **la forme** des bactéries et leur **mode de regroupement** donnent une **orientation** vers le type de bactérie. Notamment sur un prélèvement stérile sur lequel il y a des bactéries.

### Exemples :

Après coloration de Gram (= grossissement de 1000 en général). On voit aussi des hématies, parfois des cellules nucléées, etc.

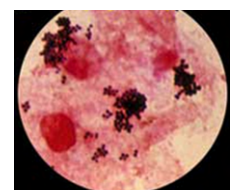


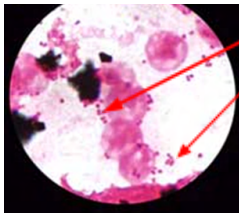
**Pneumocoque**

On voit ici des cocci à Gram positif en diplocoque. Ça fait penser à un streptocoque, et si on sait que le patient a une pneumonie franche lobaire aiguë, ça fait penser à un pneumocoque.

**Staphylocoque**

Ici, ce sont des cocci à Gram positif en amas.



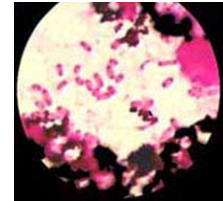


### Méningocoque

On a de petits cocci à Gram négatif en diplocoque, en grain de café. C'est typique dans un liquide céphalorachidien (LCR).

### Entérobactéries

Ici ce sont des bacilles à Gram négatif.



Donc la coloration de Gram est essentielle. Parfois ce qu'on peut faire aussi c'est une **coloration de May-Grunwald-Giemsa**, qui est nécessaire pour caractériser les cellules et déterminer la formule des polynucléaires, macrophages, lymphocytes.

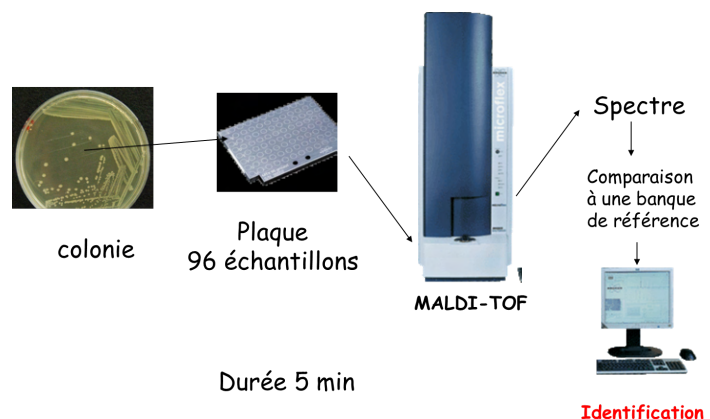
Si l'examen direct d'un prélèvement stérile est **positif et monobactérien**, on a une forte présomption d'**infection**. On est sûr que ce n'est pas une contamination, parce que pour voir les bactéries au microscope, il faut au moins  $10^4$  bactéries par mL (*c'est énorme !*).

### Point chronologie :

On a mis les cultures en **J0** sur différentes géloses (milieu nutritif). En **J1**, on va lire les cultures et on va faire l'identification par spectrométrie de masse. Enfin toujours en **J1** on va réaliser l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé (*cf cours 3*).

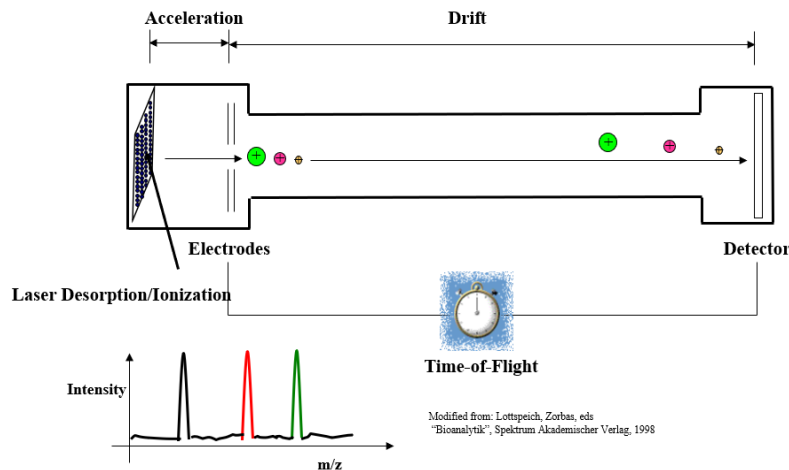
### Spectrométrie de masse

D'un point de vue pratique, c'est assez simple. On part d'une **colonie**, qu'on dépose sur une **plaque** en métal. On va recouvrir d'une matrice pour protéger ces bactéries. Puis on va le mettre dans un **spectromètre de masse** ou **MALDI-TOF** qui va générer un **spectre protéique**. Ce spectre sera **comparé** à une base de données, et on peut avoir le résultat en quelques minutes. (*dire "tiens ce spectre protéique correspond dans la base de données au spectre protéique de E. coli" par exemple*)



**Mais alors qu'est-ce qu'il se passe dans le MALDI-TOF ?**





Avec un **laser** on va taper sur la cible. On va transférer de l'énergie. (heureusement une matrice vient protéger pour éviter d'exploser les bactéries)

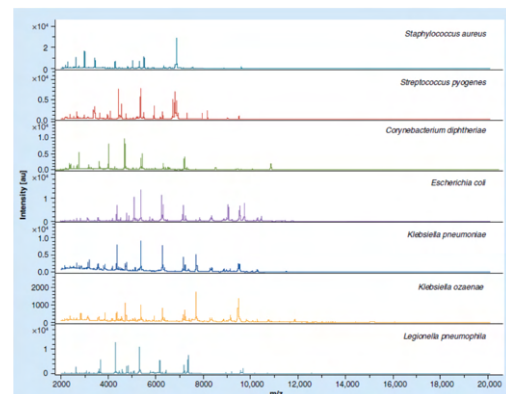
Les protéines se chargent **positivement**, puis vont **migrer en fonction de leur rapport masse/charge**.

Les petites masses très chargées vont migrer très vite et donner le premier pic noir. Les protéines intermédiaires vont donner le pic rouge. Les plus grosses protéines peu chargées vont mettre plus de temps à atteindre le détecteur et donner un pic plus tardif.

Donc les pics sont générés par les **protéines bactériennes**, et l'ensemble des pics donne un spectre. (exemples ci-contre)

C'est une innovation utilisable en routine, qui **réduit le délai** de rendu de l'identification à partir de culture de 18h à 24h, à **moins d'une minute**.

C'est une démarche **universelle** : quelle que soit la bactérie, on peut l'identifier.



### Les avantages :

- **Universelle**
- Résultat **rapide** à partir d'une colonie (1 min). On évite l'étape de 12h d'identification sur galerie.
- Manipulation simple, haut débit possible.
- Coût par identification très modeste.

### Les limites :

- Il faut que la bactérie soit **déjà enregistrée** dans la base de données pour les bactéries d'intérêt médical.
- Limite de détection basse : **10<sup>5</sup> cellules**. Donc pas directement à partir du prélèvement.
- Coût de l'équipement.
- Ne permet pas toujours de différencier les espèces proches (2 exceptions).

### Point chronologie :

On a vu **J0** avec l'examen direct, **J1** avec l'identification des bactéries. Maintenant, la dernière limite du spectromètre va nous permettre de comprendre ce qu'il se passe à **J2**.

**Il y a deux exceptions dans lesquelles le MALDI-TOF ne fait pas la distinction entre les bactéries proches :**

Entre *E. coli* et *Shigella sp* (*sp* = species = espèces, donc entre *E. coli* et toutes les shigelles au sens large). Il ne fait pas la différence parce que c'est le même ADN. Elles ne se différencient que par des toxines, et par le fait que ce n'est pas la même pathologie : *E. coli* est une bactérie commensale, dont seules quelques souches sont pathogènes, tandis que *Shigella sp* est toujours pathogène. La différence n'est recherchée que dans les infections intestinales et les coprocultures. On utilise alors l'ancienne méthode par **galerie d'identification** API 20<sup>E</sup>. Plusieurs substrats sont mis dans la galerie. La culture bactérienne est mise en contact de ces substrats. Par exemple, cette bactérie (en haut à droite sur la galerie) a acidifié tous les sucres (qui étaient bleus au départ).



### Entre *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus oralis* ou *mitis*

*Streptococcus pneumoniae* est responsable de la pneumonie et est **sensible à l'optochine**. *Streptococcus oralis* ou *mitis* sont souvent peu pathogènes et présents aussi dans les voies aériennes supérieures. On a pour ça un petit test simple. On ensemence le Streptocoque inconnu dans une gélose avec un disque d'optochine. Le lendemain, si il y a un diamètre de diminution autour de l'optochine c'est un pneumocoque. Sinon, c'est un *oralis* ou *mitis*.

Ces deux tests sont des méthodes **d'identification phénotypique**. Ils se déroulent à **J2**.

## **5) Pourquoi avons-nous besoin d'isoler et d'identifier les bactéries à partir de prélèvements cliniques ?**

### **A chaque espèce bactérienne**

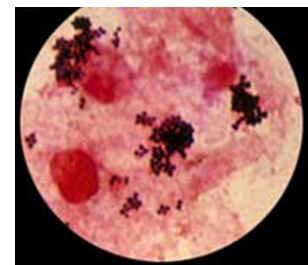
Il est important d'identifier chaque espèce de bactérie parce qu'en fonction de l'espèce, on va définir :

- Un certain **panel d'infections**.
- Le **degré de virulence**.
- Un **spectre de sensibilité aux antibiotiques**. A **J2** on aura l'antibiogramme.

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

### Quelques exemples typiques des infections :

(hello ! Là on arrive au cœur de la bactério, on va découvrir pleins de micro-organismes et leurs caractéristiques. Pas de panique, il faut les connaître, mais il ne faut pas tout apprendre par cœur. Lisez bien pour comprendre. C'est une partie assez complexe, donc je vous ai mis leur carte d'identité (= diapo) et j'ai retranscrit ce qu'il a dit en cours. Je vous surlignerai ce sur quoi vous pourrez être interrogés.)

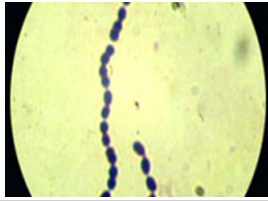


**Cocci GRAM positif en amas**

<b><u>Genre Espèce</u> :</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ... (40 espèces)
<b><u>Nom Courant</u> :</b>	Staphylocoque doré	Staphylocoques blancs
<b><u>Habitat</u> :</b>	Ubiquitaires, peau, muqueuses	
<b><u>Pouvoir pathogène</u> :</b>	Suppurations, infections toxiques	Infections sur matériel

Dans ce cas, on pense à *Staphylococcus aureus*, qu'on appelle communément Staphylocoque doré. On le retrouve sur la peau, les muqueuses, parfois dans l'environnement. Son pouvoir pathogène est assez large. Il peut donner des suppurations et des infections toxiques.

A côté de ça, on pense aux autres staphylocoques. On les appelle staphylocoques blancs parce que leurs colonies sont blanches alors que le staphylocoque doré a plutôt une couleur or. On en retrouve plus de 40 espèces. On est tous porteurs de staphylocoques blancs et ils donnent très rarement des infections (uniquement sur du matériel implanté quelque part).



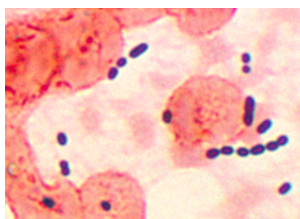
### Cocci GRAM positif en chaînettes

<b><u>Genre Espèce :</u></b>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
<b><u>Nom Courant :</u></b>	du groupe A	du groupe B	du groupe ACG... αhémolytique
<b><u>Habitat :</u></b>	Pharynx	Muqueuses digestives et génitale	Pharyngé digestive
<b><u>Pouvoir pathogène :</u></b>	Angine et complications, manifestations cutanées	Infections materno-foetale Endocardite	Rares infections

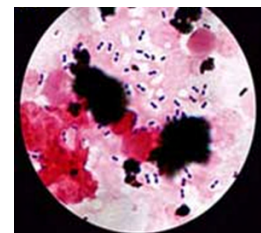
Un que vous connaissez peut-être, parce qu'ayant un mal de gorge, vous avez dû faire un prélèvement de gorge chez votre généraliste, c'est le *Streptococcus pyogenes*. Il donne une angine blanche (qui peut se compliquer en phlegmon) et peut donner un érysipèle (dermo-épidermite des jambes) parfois grave. Ces bactéries sont toujours sensibles à l'amoxicilline. Le test du généraliste est positif si ça s'agglutine. S'il est négatif, c'est plutôt viral, et on ne traite pas par antibiothérapie.

*Streptococcus agalactiae*, ou streptocoque du groupe B, est retrouvé chez tout le monde, dans le tube digestif. Mais de temps en temps, il va coloniser la muqueuse vaginale. Chez la femme enceinte, ça peut donner des problèmes (infect. materno-foetale). On va dépister régulièrement ce portage chez la femme enceinte, notamment au dernier trimestre. Si on le détecte, on traite avec de l'amoxicilline.

On a plein d'autres streptocoques, en particulier dans la bouche. Ils font partie de la flore commensale.

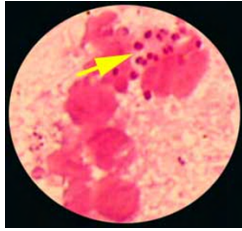


### Cocci GRAM positif en diplocoques, courtes chaînettes

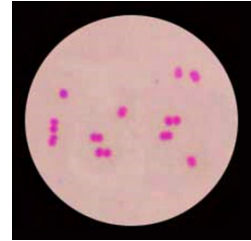


<b><u>Genre Espèce :</u></b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<b><u>Nom Courant :</u></b>	Pneumocoque
<b><u>Habitat :</u></b>	Voies respiratoires
<b><u>Pouvoir pathogène :</u></b>	Otites, pneumonies, méningites

Devant des Cocci GRAM positif en diplocoques et à courte chaînettes, on pense à *Streptococcus pneumoniae*. Il peut donner des otites chez les enfants (risque contagieux), des pneumonies et des méningites.



**Cocci GRAM négatif en diplocoques,  
en grain de café**

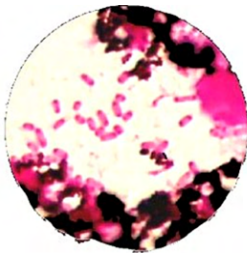


<b>Genre Espèce :</b>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	autres <i>Neisseria</i> spp.
<b>Nom Courant :</b>	Méningocoque	Gonocoque	
<b>Habitat :</b>	Pharynx	Génitale, pharynx	Oropharynx
<b>Pouvoir pathogène :</b>	Méningites, méningo-encéphalite	Urétrites, IST	Non pathogènes

Dans ce cas, il faut surtout connaître *Neisseria meningitidis*. On le trouve dans le pharynx. Ils sont portés par 5% de la population, et seul l'Homme est porteur. C'est une impasse évolutive. De temps en temps, il devient virulent et donne des méningites ou des méningo-encéphalites.

A côté de ça, on a le gonocoque qui est responsable d'infections sexuellement transmissibles ("sortez couverts !") et d'urétrites.

Et puis on a, comme toujours, d'autres *Neisseria* qui ne sont ni des méningocoques, ni des gonocoques. On les retrouve dans les voies aériennes supérieures.




**Bacille GRAM négatif, coloration bipolaire**

<b>Famille :</b>	<i>Enterobacteriaceae</i>
<b>Genre Espèce :</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Escherichia coli</i>, <i>Citrobacter</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp.</li> <li>- <i>Enterobacter</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Serratia</i> spp.</li> <li>- <i>Salmonella</i> spp.</li> <li>- <i>Shigella</i> spp.</li> </ul>
<b>Nom Courant :</b>	(pour <i>E. coli</i> : colibacille)
<b>Habitat :</b>	Intestin
<b>Pouvoir pathogène :</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Infections digestives, urinaires, biliaires, méningées, pulmonaires. Infections néonatales</li> <li>- Fièvre typhoïde, toxi-infection alimentaires</li> <li>- Dysenterie</li> </ul>

Devant des bacilles GRAM négatif, avec une coloration bipolaire (qui renforce le rose), on pense à la grande famille des *Enterobacteriaceae*. Vous connaissez déjà *E. coli*, il faut aussi connaître les salmonelles, qui donnent des diarrhées, les shigelles aussi. Tout ça donne des infections très larges.

Petit mot du prof : “Vous inquiétez pas, je vous dirai exactement ce qu’il faut apprendre, il y a presque tout...” (Il rigole, mais petite panique dans la salle quand même aha)

“J’avais besoin de vous raconter ça pour vous illustrer que voilà, la médecine, vous y êtes en plein dedans, même si vous êtes en première année. Tout ce qu’on vous raconte ça a un lien avec la vie de tous les jours, et on en fait l’expérience.” (trop sympa ce prof <3)

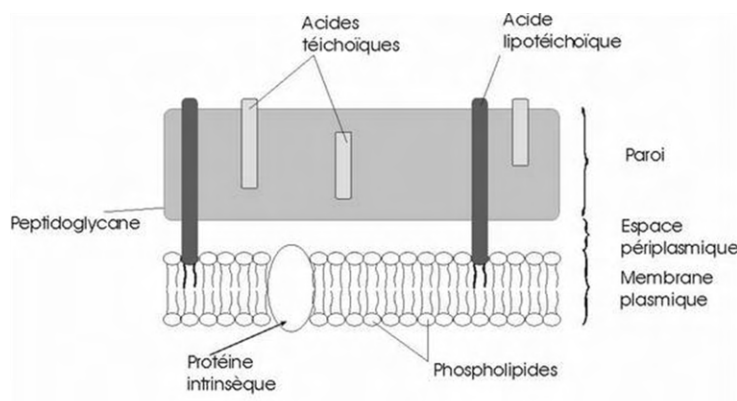
  
**Deuxième série de 5 questions :**

- 1) Quels sont les éléments de la structure de la paroi des GRAM positif et négatif ?
- 2) Quelle est la structure peptidoglycane ?
- 3) Quelle est la composition de l'ARN ribosomal et l'intérêt de son étude ?
- 4) Qu'est la plasticité du génome bactérien ?
- 5) Quelles sont les bases et règles de classification des bactéries ?

## 1) Quels sont les éléments de la structure de la paroi des GRAM positif et négatif ?

**Rappels** : Une bactérie est un organisme unicellulaire avec une structure simple et sans organites. On a vu que la paroi, avec le peptidoglycane, confère des propriétés biochimiques à la bactérie (coloration de GRAM). On va maintenant s'intéresser à la paroi d'un GRAM positif, puis celle d'un GRAM négatif.

### Paroi d'un Gram positif



On retrouve du cytoplasme vers l'extérieur, la membrane plasmique (avec des phospholipides, des protéines) et puis le peptidoglycane. Ce peptidoglycane est

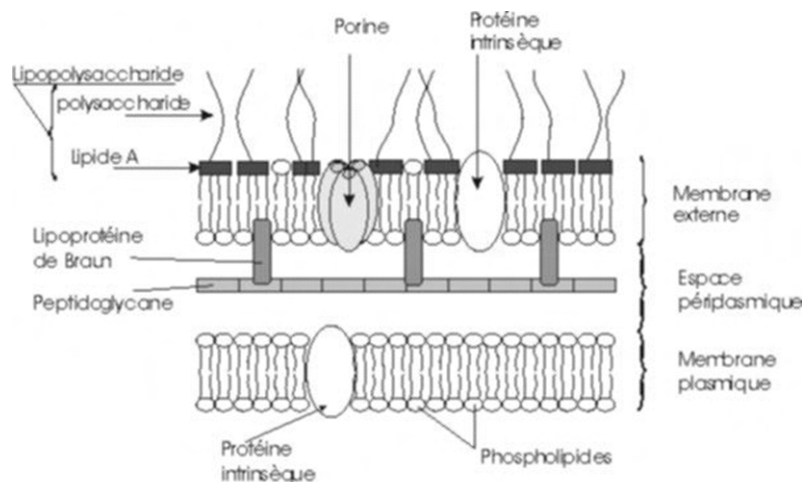


amarré à la membrane cytoplasmique avec des **acides lipotéichoïques**. A l'intérieur de la paroi des Gram +, on a d'autres acides teichoïques.

**Point sur les acides teichoïques :**

- Ils ne sont présents **que chez les bactéries à Gram +**.
- C'est le **deuxième composant majeur** de la paroi des Gram + (50% du poids sec de la paroi).
- Ils ont parfois un **pouvoir antigénique**. Donc ils vont jouer un rôle important lors de l'infection.

**Paroi d'un Gram négatif**



On retrouve de l'intérieur vers l'extérieur, toujours une bicouche phospholipidique (avec des protéines intrinsèques), un peptidoglycane, une membrane externe (avec des porines, des lipopolysaccharides et des protéines intrinsèques).

Pour amarrer le peptidoglycane à la membrane externe on a des **lipoprotéines de Braun** (rôle dans la cohésion et stabilisation de la paroi).

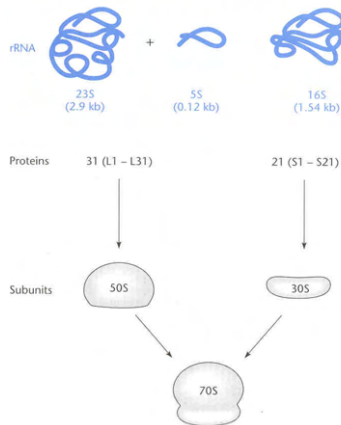
**Point sur les lipopolysaccharides (LPS) :**

- Ils ne sont présents **que chez les bactéries à Gram -**.
- Aussi appelé **endotoxine**, c'est le constituant essentiel de la membrane externe des bactéries à Gram -.
- **Surtout**, il est **impliqué dans le choc septique** (=infection grave). C'est le LPS qui va provoquer une réaction inflammatoire démesurée.
- Le LPS comporte 2 parties. Un **lipide A** (support de la toxicité de la molécule entière) et **le core** (de composition variant d'une espèce à l'autre).



### 3) Quelle est la composition de l'ARN ribosomal et l'intérêt de son étude ?

#### Structure de l'ARNr bactérien



Il y a 3 ARN ribosomiques, 23S, 5S et 16S (S c'est pour Svedberg = unité du coefficient de sédimentation).

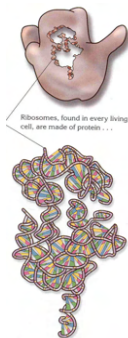
Ensuite ces 3 unités d'ARNr se lient à des protéines ribosomales (ici le S c'est pour small).

Le 23S et le 5S forment avec les protéines la sous-unité 50S (à nouveau S à droite donc S=Svedberg). Alors que le 16S forme avec des protéines la sous-unité 30S.

L'ensemble des deux forme le ribosome qui est le **70S**.

Ci-contre, on voit la structure 3D d'un ribosome.

Chez les bactéries, l'ARNr de la petite sous-unité a une constante de sédimentation **ARNr 16S**.



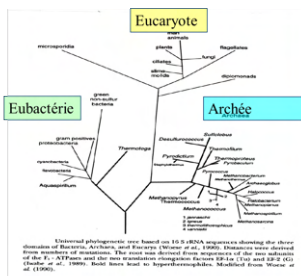
#### Point sur l'ARNr 16S :

Nous allons voir que l'**ARNr 16S est une molécule de choix pour retrouver les liens de parenté entre les espèces** :

- L'ARNr 16S est une molécule **universelle** chez les procaryotes qui participe à la synthèse des protéines. Chez l'eucaryote c'est l'ARNr 18S qui a ce rôle.
- Elle a une particularité : Elle est faite d'une **succession de séquences à vitesse d'évolution variable**. C'est-à-dire qu'il y a des séquences **conservées**, des séquences **variables** et des séquences **hypervariables**. Ça permet, en comparant les séquences conservées, de voir à quelle famille appartient la bactérie, voire à quel genre, voire à quelle espèce.
- **Amplification et séquençage universel** : Le fait d'avoir ces séquences conservées tout au long de l'ARNr, permet aussi d'hybrider des amorces, et d'amplifier le gène qui code pour l'ARNr de n'importe quelle bactérie.
- Il y en a une **quantité très importante** dans chaque cellule. Il est donc possible de faire de l'**hybridation in situ**, et de voir les bactéries.
- **La plus grande banque de séquences communes** est pour cet ARNr 16S (plus de 200 000 séquences d'ARNr 16S).



C'est Carl Woese, qui a commencé à séquencer cet ARNr 16S, et à comparer les différentes parties d'ARNr 16S des différentes bactéries. Il a vu qu'il y avait des régions conservées, d'autres présentes que chez certaines bactéries, etc. Il a réussi à faire l'**arbre phylogénétique**.

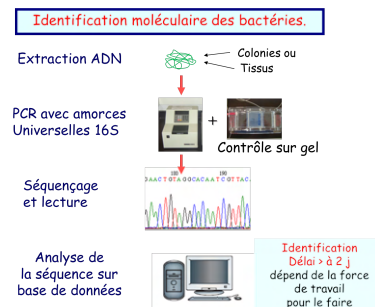


C'est comme ça qu'on a proposé de séparer les organismes en **eubactéries** (dont les bactéries commensales et pathogènes chez l'homme), en **eucaryotes** et en **archées**. On ne sait pas pour autant où est l'origine de la vie.

Arbre phylogénétique à partir de l'analyse des séquences ARNr16S

## Identification moléculaire des bactéries

A partir d'un prélèvement, on peut **amplifier** l'ADNr 16S. Grâce à ça on va pouvoir **extraire** l'ADN amplifié avec des amorces universelles, puis **séquencer** pour lire la séquence et **comparer** à une banque de données.



## Indications de la recherche ADNr 16S

### A partir de colonie isolée :

- On ne le fera que lorsque la spectrométrie de masse n'arrive pas à donner un nom. Par exemple, si c'est une nouvelle espèce.

### A partir de prélèvement :

- Si on visualise des bactéries au microscope mais **non cultivables** sur milieux de cultures usuels.
- On le fera aussi sur un prélèvement où la culture est négative et on veut absolument voir si une bactérie est présente ou pas. Par exemple, dans un LCR, si le patient a **eu des antibiotiques**, et qu'on est pas sûr si on voit des bactéries ou pas, on va amplifier.
- Et avec la condition que ce soit un **prélèvement stérile et monobactérien** (parce que si on amplifie dans un prélèvement de selles par exemple, on amplifie de tout).

## 4) Qu'est la plasticité du génome bactérien ?

### Introduction

Ça concerne l'ADN chromosomique et extra-chromosomique. Le génome évolue par :

- **mutations aléatoires** non corrigées lors de la réplication de l'ADN chromosomique ou plasmidique (fréquence de 1 tous les  $10^6$  à  $10^7$  nucléotides). Elle va se fixer dans la population. Par pression de sélection (antibiotiques, système immunitaire), on risque de sélectionner la bactérie. Par exemple, si elle fait des erreurs sur la cible des antibiotiques, ça donne la **résistance aux antibiotiques** des bactéries.
- **L'acquisition d'un nouveau matériel génétique**. Elles sont capables, sans sexe, de récupérer de l'ADN de l'extérieur, par transformation, transduction ou conjugaison. (*tkk, c'est bien expliqué ci-dessous*)

### Les plasmides

**Définition** : Un plasmide est de l'**ADN circulaire**, **superenroulé** et **extrachromosomique**. Il a une réplication indépendante de l'ADN chromosomique.

**Structure** : De petite taille (1/100e du chromosome bactérien). Il porte une grande diversité de gènes, notamment des **gènes structuraux** (fimbriae) et des **gènes de résistance aux antibiotiques**.

### Acquisition d'un nouveau matériel génétique

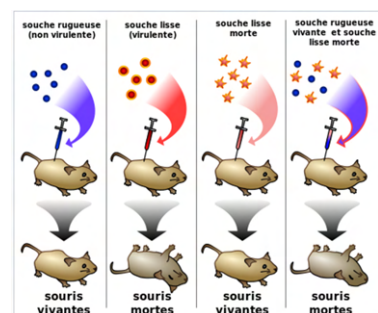
Les gènes plasmidiques ou chromosomiques peuvent se transférer d'une bactérie à l'autre par transformation, transduction ou par conjugaison.

### Par transformation

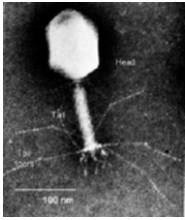
On l'a découvert avec l'expérience de Griffith en 1928 (avant la découverte de l'ADN !). Il a pris des colonies de *Streptococcus pneumoniae* rugueuse (non virulente), qu'il a injectées en intra-péritonéal, et la souris est restée vivante. En injectant une souche lisse (virulente), la souris meurt. Donc il a pu distinguer les souches virulentes des souches non virulentes. Ensuite, il a chauffé des souches virulentes (lisses) pour les tuer, et après injection la souris reste vivante.

**Enfin, il a injecté dans une souris à la fois une souche lisse morte (chauffée) et une souche rugueuse vivante (non virulente). Et là, la souris est morte.**

Donc il y a quelque chose dans les bactéries virulentes qui, même lorsqu'elles sont mortes, arrive à passer à des bactéries non virulentes qui le deviennent. Il ne savait pas que c'est des **morceaux d'ADN qui passent d'une bactérie à l'autre**.



## Par transduction

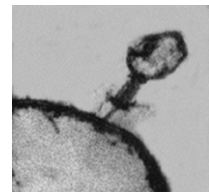


C'est très simple, c'est par un virus exclusivement bactérien, qu'on appelle **bactériophage**. Il va se fixer sur la bactérie et injecter son ADN.

Une fois la bactérie infectée, il peut suivre un cycle lytique, ou un cycle lysogénique.

### Cycle lytique

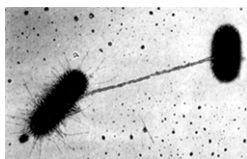
Le bactériophage va se reproduire et détruire la bactérie pour libérer les bactériophages. Chaque bactériophage peut récupérer des morceaux d'ADN de la bactérie.



### Cycle lysogénique

Le bactériophage s'intègre dans le chromosome et reste dormant. Il a apporté avec lui de l'ADN de la bactérie précédemment infectée, codant parfois pour de nouveaux caractères.

## Par conjugaison



La conjugaison se fait entre une bactérie mâle et une bactérie femelle par l'intermédiaire d'un pilus sexuel. A partir de ce canal, on va passer un morceau d'ADN chromosomique ou plasmidique.

## 5) Quelles sont les bases et règles de classification des bactéries ?

### Classification des bactéries

**Espèce** : C'est l'unité fondamentale de la classification.

**Souche** : Sous-division de l'espèce.

**Clone** : Population descendant d'une même souche.

Il y a deux types de critères pour que deux souches appartiennent à la même espèce. On a les **critères phénotypiques** (plus ou moins abandonnés), et les **critères génotypiques**. C'est à dire qu'en prenant l'ADN bactérien des deux souches, il faut qu'il y ait une **hybridation ADN/ADN  $\geq$  à 70%**. Aujourd'hui, même ça commence à être abandonné, puisqu'on parle de **séquence génomique complète, avec 95% de séquences identiques**.

La classification des bactéries est devenue **phylogénétique** (étude des liens de parenté). Elle peut se baser sur l'ARNr 16S et plus facilement par son gène (PCR et séquençage). Maintenant, elle peut se baser par séquençage haut débit sur tout le génome bactérien.



## Nomenclature des bactéries

C'est l'ensemble des règles qui régissent l'attribution d'un nom à chaque taxon distinct. Elle est universelle. La classification est hiérarchique.

Comme on l'a vu, le nom d'une bactérie comprend deux noms latins :

- Son genre (1ère lettre Majuscule)
- Son espèce (1ère lettre minuscule)

Le tout en *italique*, dans l'exemple *Staphylococcus aureus*.

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

*(Voilààà, le premier cours est fini, j'espère qu'il vous plaît beaucoup ! Je vous sors un DM très prochainement, et les autres fiches arriveront dans quelques jours. Si vous avez des questions ou des remarques, je suis à votre disposition à tout moment sur le forum ou sur discord.*

*Et maintenant, place aux **dédi**iiiiiii !!!*

*Dédicace avant tout et surtout à toi pour tout le travail que tu fais ! Que ce soit la galère ou pas, tu persévères dans cette année particulièrement difficile comme un(e) champ', et pour ça, tu as tout le mérite du monde. En plus tu lis les dédis de bactério donc je t'aime d'office.*

*Dédicace à Seldjan, et tous ceux qui étaient à ce cours vous êtes au top !!*

*Dédi à Dorian, Nilay, Enzo, Luna, Camille, Seldjan (encore ? ouioui), Noa, Salah, et Camille (encore ? nan c'est pas la même aha), qui forment la plus belle famille de parrainage. Je suis tellement heureux de vous avoir rencontré, vous êtes géniaux <3.*

*Voilà, à très bientôt pour les prochains cours de bactério)*