

BACTÉRIO 1

**STRUCTURE,
CLASSIFICATION
ET
IDENTIFICATION**

I- Généralités sur les bactéries:

A) Le monde bactérien:

Les premières bactéries existent depuis 3,5 milliards d'années, alors que les Hommes existent depuis 3,5 millions d'années: ça fait **1000x** plus longtemps que les Hommes.

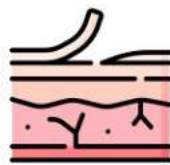
Les bactéries sont des organismes hautement adaptables "tout-terrain" par:

- Leur **génom**e **plastique**: avec beaucoup d'éléments mobiles, permettant de s'adapter aux différentes niches écologiques
- Leur **nombre** (plusieurs milliers d'espèces)
- Leur **lieux de vie** (partout)

On les classe en 3 types:

1. **Saprophytes**: décomposent les végétaux/ matières organiques en matières minérales, présentent dans air/eau/sol (10^9 bactéries/g de terre)
2. **Commensales**: en symbiose avec un hôte
3. **Pathogènes**: infectent/ provoquent des maladies

Les bactéries **Commensales** sont partout, même dans notre organisme. L'Homme est un être **hybride** à la fois eucaryote et procaryote. On possède presque autant de cellules eucaryotes que procaryotes.



10^{14} bactéries dans le colon

10^{12} bactéries sur la peau

10^{10} bactéries dans la bouche+Pharynx

Les bactéries commensales, qui forment la flore commensale aussi appelées microbiote, jouent un rôle important:

- **IMMUNITÉ**: elles vivent en symbiose avec nous et stimulent notre système immunitaire
- **EFFET BARRIÈRE**: car elles inhibent l'implantation d'autres bactéries exogènes et dégradent des toxines
- **DIGESTION**: participent à la déplétion des nutriments

La présence de cette microbiote va entraîner 3 conséquences importantes lors du prélèvement bactériologique:

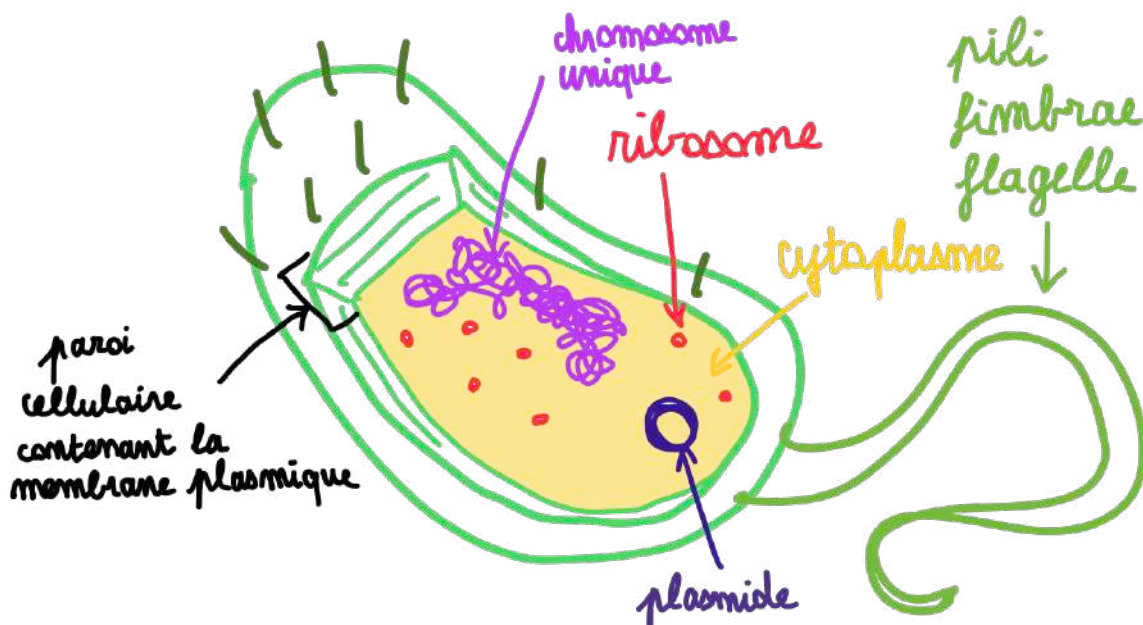
- 1) Lors d'un prélèvement, on risque de rencontrer des bactéries appartenant au microbiote: cela oblige une **asepsie rigoureuse**. Cela est d'autant plus important lorsque le site est stérile, comme le LCR, les os et le sang (que l'on peut mettre dans un bouillon de culture où l'on surveille la pousse bactérienne= *hémoculture*)
- 2) Le microbiote constitue un **réservoir de gènes** codant pour la résistance aux antibiotiques.
- 3) Pour trouver une bactérie pathogène dans un microbiote, il faut développer une stratégie. On adopte notamment une **stratégie de sélection** lorsqu'on effectue une coproculture (=culture des selles) car les bactéries y sont très nombreuses.

Les bactéries commensales, saprophytes et pathogènes sont toutes en communication et **échangent des gènes** et outils génétiques. Cela leur permet de s'adapter et de développer de **nouvelles fonctions** (ex: gènes de résistance aux antibiotiques, gènes de virulence).

B) La structure des bactéries:

La bactérie est un être unicellulaire à structure simple et sans organites:

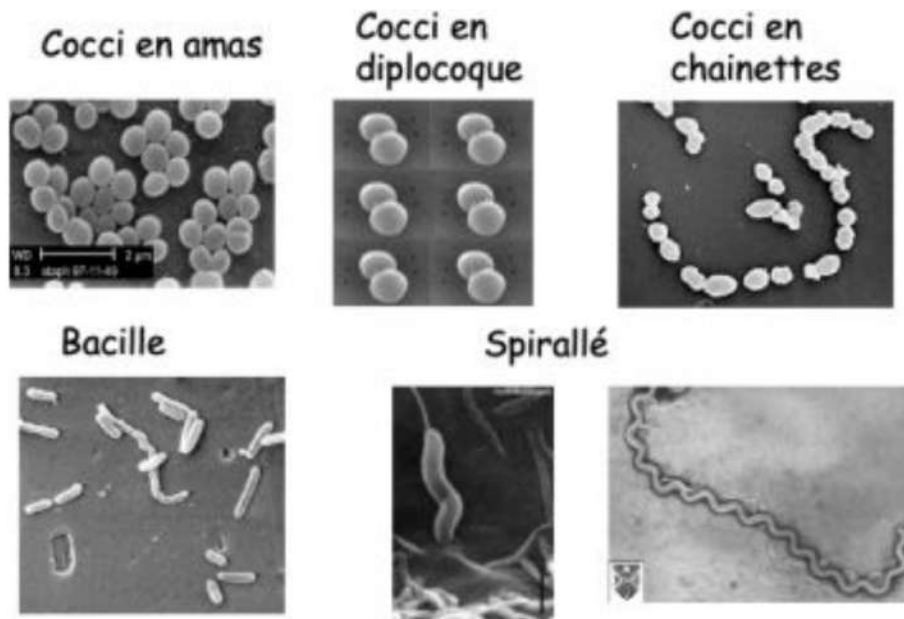
- **Un chromosome unique:** qui baigne directement dans le cytoplasme
- **Un ADN extra chromosomique:** qui forme des plasmides (=ADN de forme circulaire)
- **Une paroi cellulaire:** elle donne la forme à la bactérie et on y retrouve des flagelles/pili/fimbriae
- **Une membrane plasmique:** fait partie de la paroi cellulaire, c'est une barrière perméable sélective impliquée dans le transport d'éléments nutritifs/ déchets et participe à des processus métaboliques
- **Des ribosomes:** participent à la synthèse de protéines



La paroi cellulaire est essentielle puisqu'elle permet aux bactéries de résister aux pressions osmotiques grâce à son **peptidoglycane** (*vu après*). Sans elle la bactérie gonflerait jusqu'à exploser.

pour classer une bactérie on utilise sa **forme** (ex: ronde → Cocci), et son **mode de regroupement** (Cocci en amas → Staphylocoque).

On peut observer ces différentes images de bactéries au Microscope Électronique ME. Cette observation permet de **s'ORIENTER**++ vers un type de bactérie.



C) Comment s'infecte-t-on?

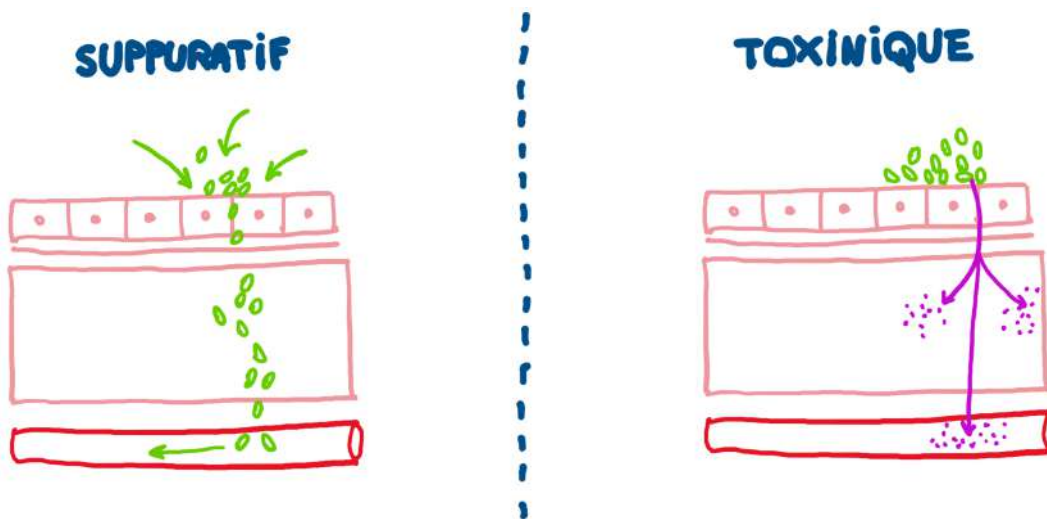
Il existe 2 façons de s'infecter:

- 1) **Par son propre Microbiote**: des bactéries du microbiote se déplacent
 → ex: *Escherichia coli* qui se déplace dans la vessie provoquant des cystites
 → ex: *Staphylococcus aureus* présent dans le pharynx chez **20%** des gens
- 2) **Par l'environnement**: ingestion eau/ aliments contaminés, aérosols, inoculations cutanées, muqueuse directe par salive/ sécrétions sexuelles, transcutanée par insectes

Il existe 2 mécanismes d'infection:

- 1) **SUPPURATIVE**: la bactérie se multiplie et migre/envahit les tissus puis passe dans les vaisseaux sanguins provoquant l'infection elle-même
 → ex: *Staphylococcus aureus* qui donne des **furoncles**
- 2) **TOXINIQUE**: la bactérie adhère à l'épithélium mais le traverse pas: en revanche elle libère des toxines qui traversent l'épithélium et qui provoquent l'infection
 → ex: *Clostridium tetani* qui donne le **tétanos**

Certaines bactéries peuvent cumuler les deux mécanismes d'infection.



D) Étapes du diagnostic bactériologique:

Une problématique essentielle: faire un **BON PRÉLÈVEMENT** en respectant une **CINÉTIQUE** de démarche diagnostic (J0, J1, J2).

Pour avoir un bon prélèvement il faut:

- Condition d'asepsie rigoureuse
- Au site de l'infection et en quantité suffisante
- AVANT antibiothérapie **SAUF en cas de méningite** (dans ce cas on traite avant)
- Avec respect des règles de transport

Une fois le prélèvement fait, on procède à l'**examen direct** au laboratoire après une **coloration GRAM**. Cela nous permettra de donner une **ORIENTATION** sur le type de bactérie.

—> **Et NON pas IDENTIFICATION** (car c'est seulement une observation visuelle au microscope qui nous donne pas de certitude)

Nous allons maintenant voir ce qu'il se passe à J0, J1 et J2:

1. **Ce qui se passe à J0:**

On réalise la coloration GRAM et on fait l'examen direct à la recherche du « *flagrant délit* », c'est à dire la présence de bactéries dans un prélèvement normalement stérile (sang, LCR, os,...), et qui peut être due que à une infection.

Étapes de la coloration GRAM:

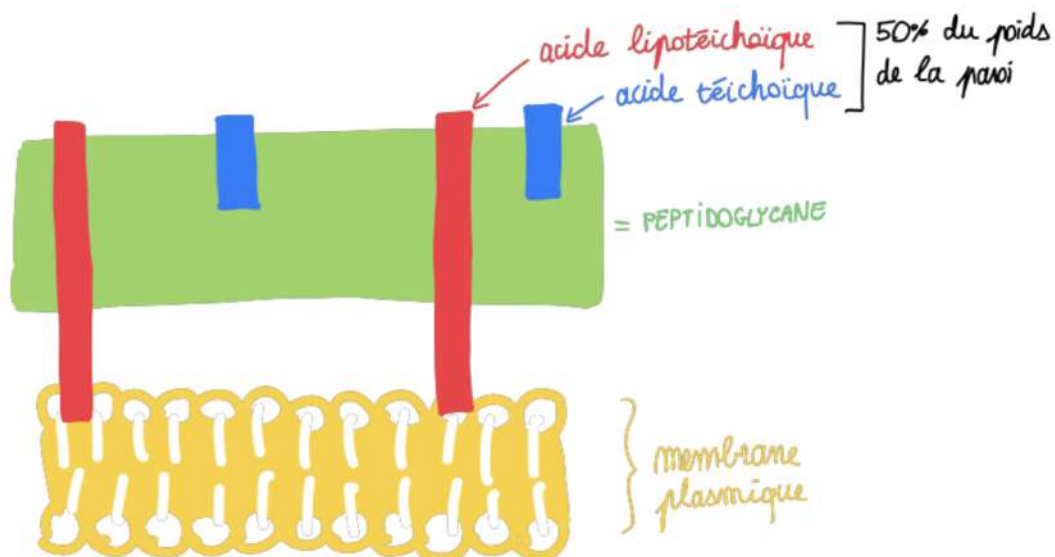
- On réalise un frottis du prélèvement sur une lame
- On fixe le prélèvement à l'alcool ou la chaleur
- On ajoute le premier colorant: le **violet de Gentiane** qui colore toutes les bactéries
- On fixe le violet au lugol
- On ajoute de l'**alcool qui dissout les graisses** qui sont majoritairement présentes chez les GRAM-. Les bactéries GRAM- sont alors incolores et les GRAM+ sont violettes.
- On ajoute le deuxième colorant: la **fuchsine** colorant les bactéries GRAM- en rose

On peut ensuite observer la lame au microscope optique au grossissement x100 les bactéries et donner une **ORIENTATION**.

Une autre coloration réalisable: **May-Grunwald-Giemsa (MGG)** qui nous permet de caractériser les cellules et déterminer la formule des Polynucléaires, des Macrophages et des lymphocytes.

Mais qu'est ce qui différencie les bactéries GRAM- et GRAM+?

—> **GRAM + :**



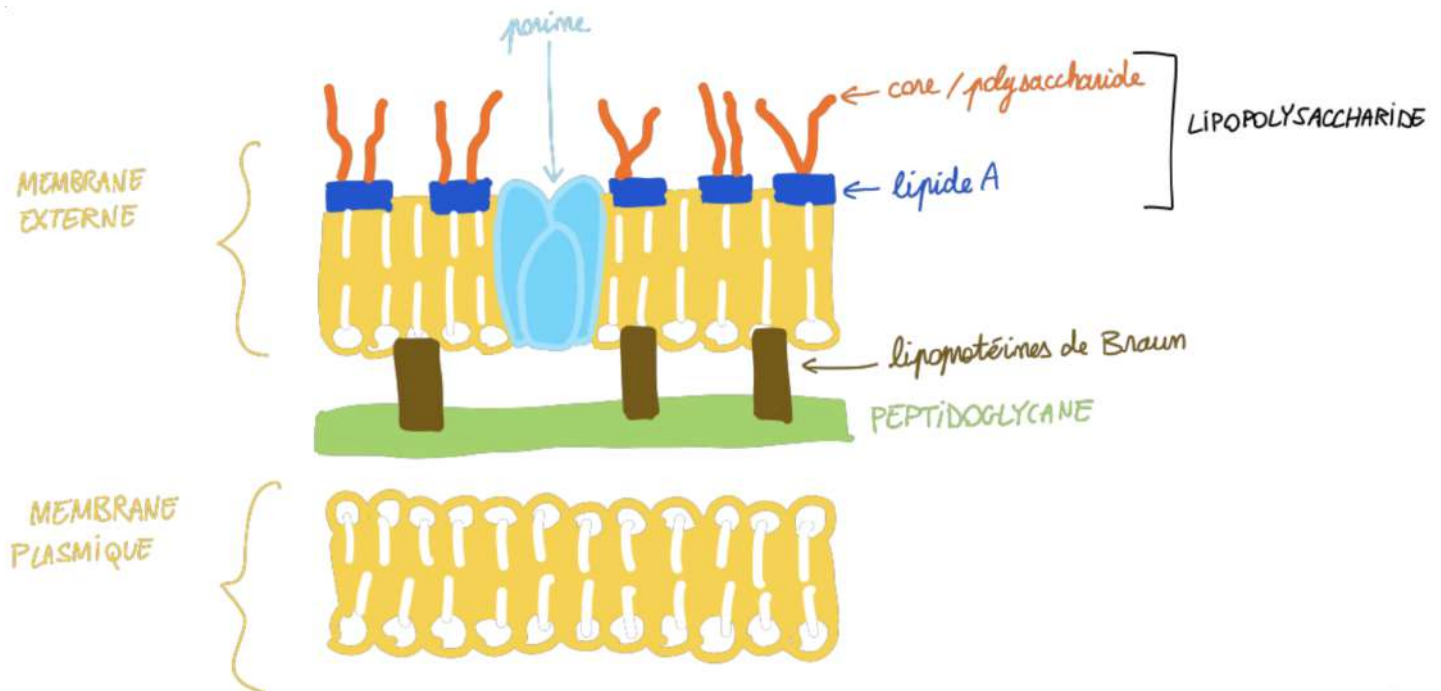
Le **peptidoglycane** est une molécule qui correspond à l'association d'acides aminés et de sucres, retrouvé que chez les bactéries dans leur paroi.

Le peptidoglycane est amarré à la **membrane plasmique** par des **acides lipotéichoïques**. On retrouve dans le peptidoglycane aussi des **acides téichoïques**, qui ont un rôle important dans les infections.

On retrouve aussi dans la membrane plasmique des protéines intrinsèques.

Ces bactéries sont **VIOLETTES**.

—> **GRAM -** :



On retrouve ici un **peptidoglycane** nettement plus petit. Ces bactéries possèdent une **membrane plasmique** avec des phospholipides et des protéines intrinsèques.

Mais on retrouve aussi une **membrane externe** amarrée au peptidoglycane par des **lipoprotéines de Braun** (avec une partie protéique associée au peptidoglycane et une partie lipidique associée à la membrane externe). Les lipoprotéines de Braun ont un rôle dans la stabilisation de la paroi.

Dans la membrane externe on retrouve des **porines**, des protéines intrinsèques et des **lipopolysaccharides**.

Les lipopolysaccharides sont composés de deux choses: le **lipide A** et le **core/ polysaccharide**. Le core a des chaînes latérales plus ou moins longues qui constituent l'antigène somatique ayant un rôle dans le choc septique.

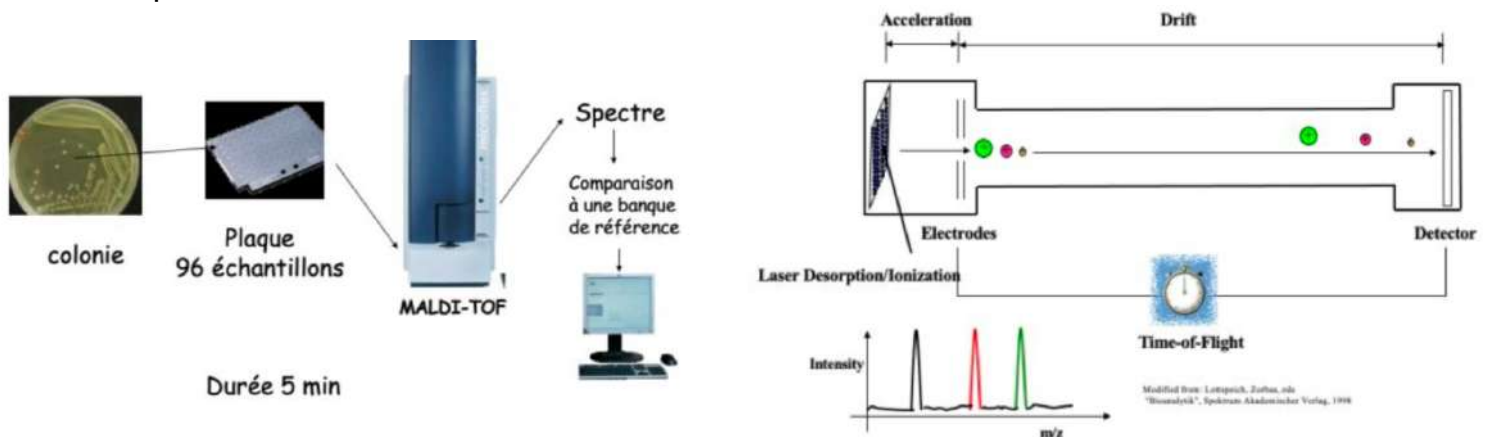
Ces bactéries sont **ROSES**.

2. **Ce qui se passe à J1:**

On réalise l'**IDENTIFICATION** de la bactérie grâce à l'analyse des cultures par **spectrométrie de masse**. L'appareil de spectrométrie est appelé **MALDI-TOF**. Pour le faire fonctionner, on insère une plaque en métal recouverte de la colonie de bactérie et d'une matrice protectrice. Le MALDI-TOF va générer un spectre protéique qui sera comparé à une base de données en quelques minutes.

Voici son fonctionnement en détaille: un laser vient taper une cible qui provoque un transfert d'énergie. Cette énergie va charger positivement les protéines des bactéries qui vont migrer en fonction de leur masse/charge.

Les protéines les plus rapides vont donner un premier pic, et on obtiendra un spectre.



Le MALDI-TOF est utilisé en routine, c'est une démarche universelle et rapide (*évite de faire une identification sur galerie de 12h*). Cela fonctionne pour tout type de bactéries sauf deux exceptions. C'est une manipulation simple avec un coût modeste pour l'identification.

Mais on trouve aussi des limites: le coût de l'équipement est élevé, et la bactérie qu'on recherche doit se trouver dans la base de données. Aussi l'identification se fait que à partir de 10^5 bactéries: c'est pour cette raison que l'on ne peut pas utiliser la spectrométrie à J0, car on met en culture les colonies.

Ensuite on réalise un **antibiogramme** par diffusion en milieu gélosé qui nous permettra de tester l'effet des antibiotiques sur cette souche de bactérie.

3. Ce qui se passe à J2:

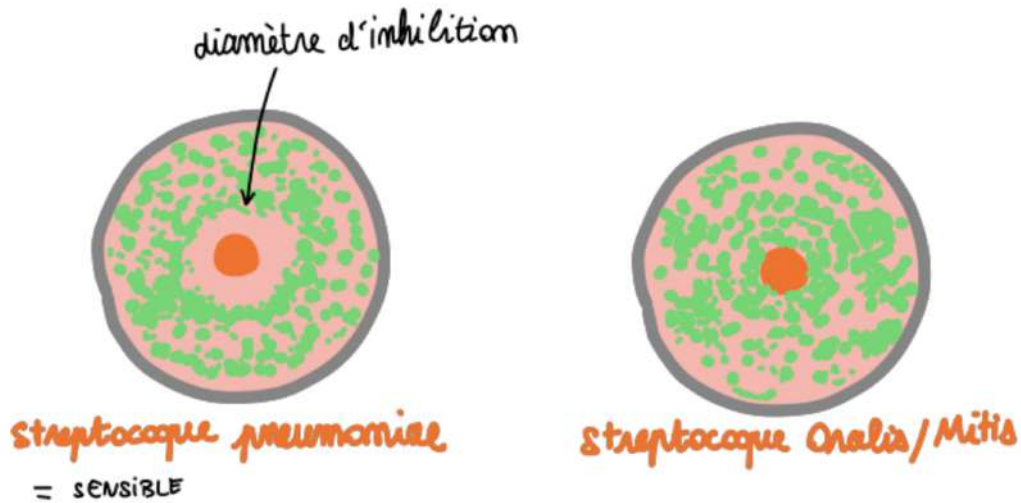
Le MALDI-TOF présente une limite: il n'est pas capable de distinguer certaines espèces bactériennes proches. Nous allons en voir deux cas:

—> **E. coli** et **Shigella sp**: elles ont pratiquement le même ADN mais ne produisent pas les mêmes toxines et ne donnent pas les mêmes pathologies = E. Coli est **commensale** et Shigella sp est **toujours pathogène**. On cherche à faire la distinction que en cas d'infections intestinales/ coprocultures.

On utilise une **galerie d'identification phénotypique**.

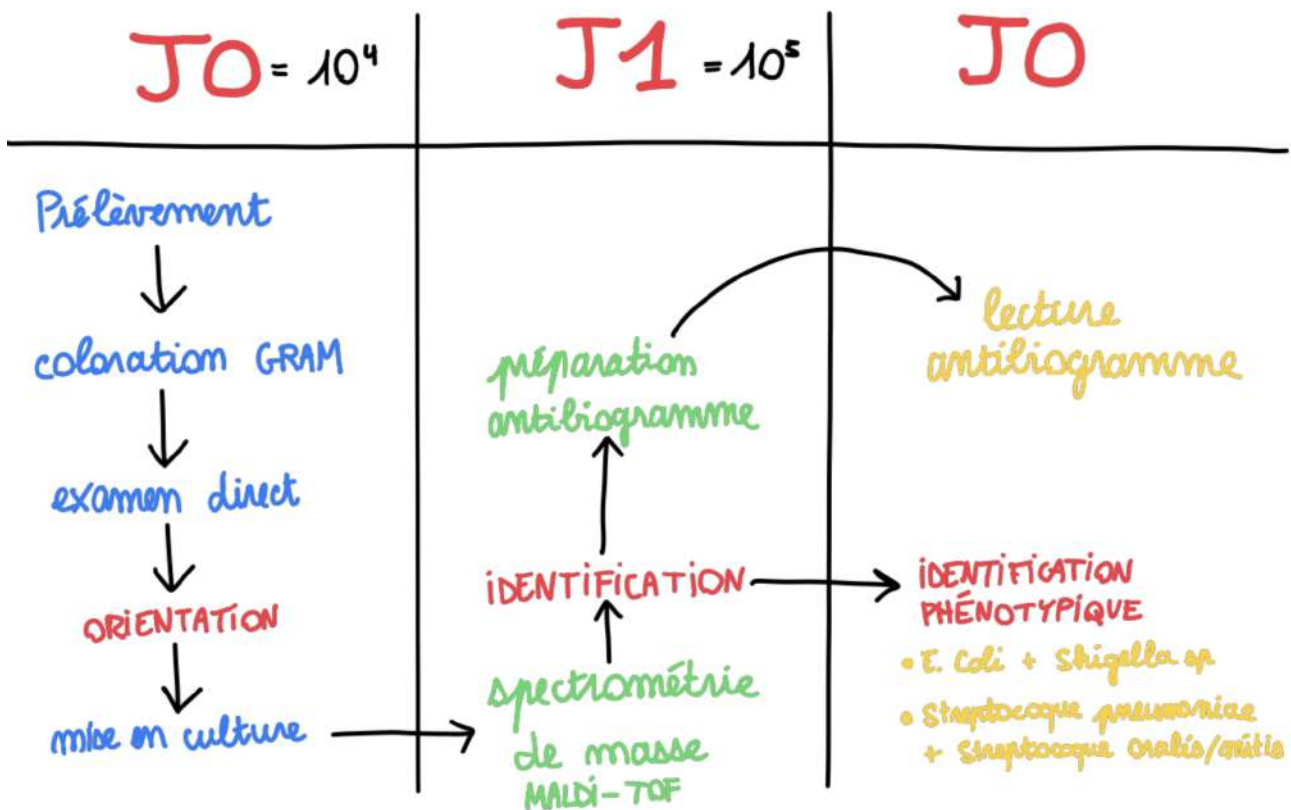


—> **Streptococcus pneumoniae** et **Streptococcus oralis ou mitis**: la première est responsable de la **pneumonie** alors que la deuxième est **peu pathogène** et présent souvent dans les voies aériennes supérieures.
On utilise un **disque d'optochine** à laquelle seul le *Streptococcus pneumoniae* est sensible.



À J2 on va également procéder à la **lecture de l'antibiogramme** à la recherche de disques d'inhibition.

Voici un résumé de la cinétique:

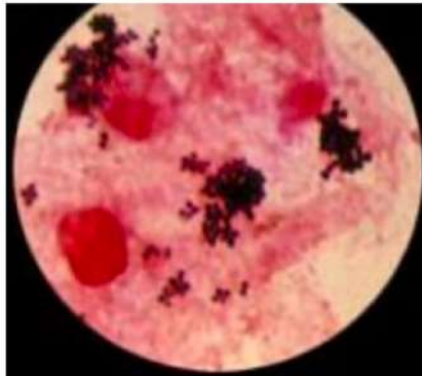


E) Identification et caractéristiques des bactéries:

Nous allons voir des exemples de bactéries selon leur GRAM, leur habitat et leur pouvoir pathogène.

1. Les bactéries GRAM + :

a) Cocci GRAM + en amas:



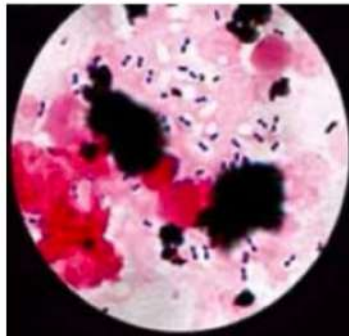
Nom/ genre d'espèce	Staphylococcus aureus	Staphylococcus epidermidis (40 espèces)
Nom courant	Staphylocoque Doré	Staphylocoque Blanc
Habitat	Ubiquitaire (surtout peau et muqueuses, parfois environnement)	Ubiquitaire (surtout peau et muqueuses, parfois environnement)
Pouvoir pathogène	-Suppuratif (furuncles) -Toxinique	Très rare, quelques infections sur matériaux

b) Cocci GRAM + en chaîne:



Nom/ genre d'espèce	Streptococcus pyogenes	Streptococcus agalactiae	Streptococcus spp.
Nom courant	Groupe A	Groupe B	Groupe ACG ou alpha-hémolytique
Habitat	Pharynx	Muqueuses digestives et génitales	Pharyngée/ digestif
Pouvoir pathogène	-Angines -Complications infections cutanées	-Infections maternofoetales -Endocardite	Rares infections

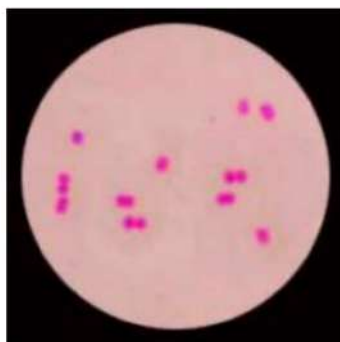
c) **Cocci GRAM + en diplocoque, courte chaîne:**



Nom/ genre d'espèce	Streptococcus pneumoniae
Nom courant	Pneumocoque
Habitat	Voies respiratoires
Pouvoir pathogène	-Otites chez l'enfant -Pneumonies -Méningites

2. Les bactéries GRAM - :

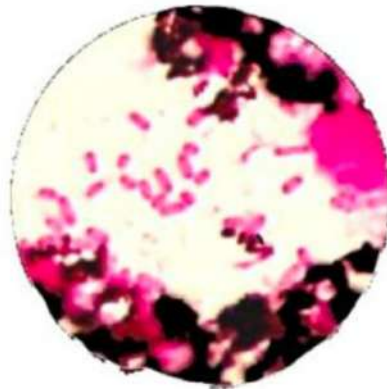
a) **Cocci GRAM - en diplocoque, grains de café:**



Nom/ genre d'espèce	Neisseria meningitis	Neisseria gonorrhoeae	Autres Neisseria spp.
Nom courant	Méningocoque	Gonocoque	X
Habitat	Pharynx	-Muqueuses génitales -Pharynx	Voies aériennes supérieures
Pouvoir pathogène	-Méningites -Méningo-encéphalites	-Urétrites -IST	NON pathogènes

Le Méningocoque est porté par **5%** de la population. Seul l'Homme en est portable.

b) Bacille GRAM -:

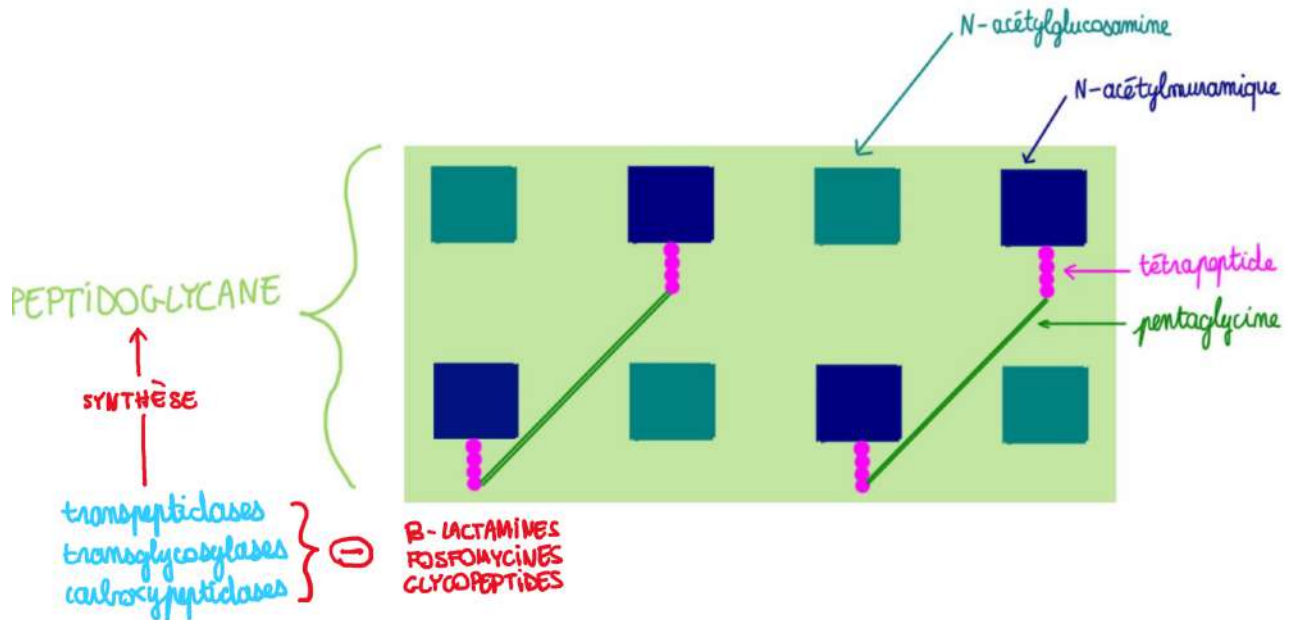


Nom/ genre d'espèce	Famille des Enterobacteriaceae: E. Coli, Citrobacter spp., Klebsiella spp., Enterobacter spp., Proteus spp., Serratia spp., Salmonella spp., Shigella spp.
Nom courant	Pour E. coli = colibacille
Habitat	Intestins
Pouvoir pathogène	-Infections digestives, urinaires, biliaires, méningées, pulmonaires, néonatales -Fièvre typhoïde, toxi-infection alimentaire, dysenterie

II- Caractérisation structurale des bactéries:

A) Structure du peptidoglycane:

Le peptidoglycane est aussi nommé muréine ou mucopeptide. C'est un polymère de chaînes linéaires de **N-acétylglucosamine** et d'acide **N-acétylmuramique**: c'est un réseaux de sucres et d'acides aminés.



Les N-acétylmuramiques sont reliés entre eux via les **tétrapeptides** (composé de D/L-Alanine, D-Glutamate, L-Lysine), des courtes chaînes peptidiques qui font le lien entre les **pentaglycines** (des liaisons peptidiques).

Les tétrapeptides sont reliés entre eux par **transpeptidation** entre une D-Alanine d'une chaîne et la L-Lysine d'une autre chaîne.

Il est important de connaître cette structure car elle est ciblée par les **antibiotiques**.

La synthèse du peptidoglycane débute dans le cytoplasme avec des **précurseurs** générant les sucres et acides aminés. Les précurseurs mûrissent dans la membrane plasmique et s'insèrent dans la paroi en cours de formation et de dégradation.

Plusieurs enzymes sont impliquées dans la synthèse: les antibiotiques viennent inhiber la synthèse de peptidoglycane en **bloquant ces enzymes**. La forme de la bactérie est impactée: avec un peptidoglycane absent ou altéré la bactérie gonfle et meurt.

Voici les enzymes ciblées à connaître: **transpeptidase, transglycosylase, carboxypeptidase**

Il existe 3 types d'antibiotiques capables de bloquer la synthèse du peptidoglycane:

- **FOSFOMYCINES**: agissent sur les précurseurs en inhibant la pyruvyl transférase
- **GLYCOPEPTIDES**: bloquent l'élongation des peptidoglycanes
- **BÉTA-LACTAMINES**: inhibent les transpeptidase, transglycosylase, carboxypeptidase

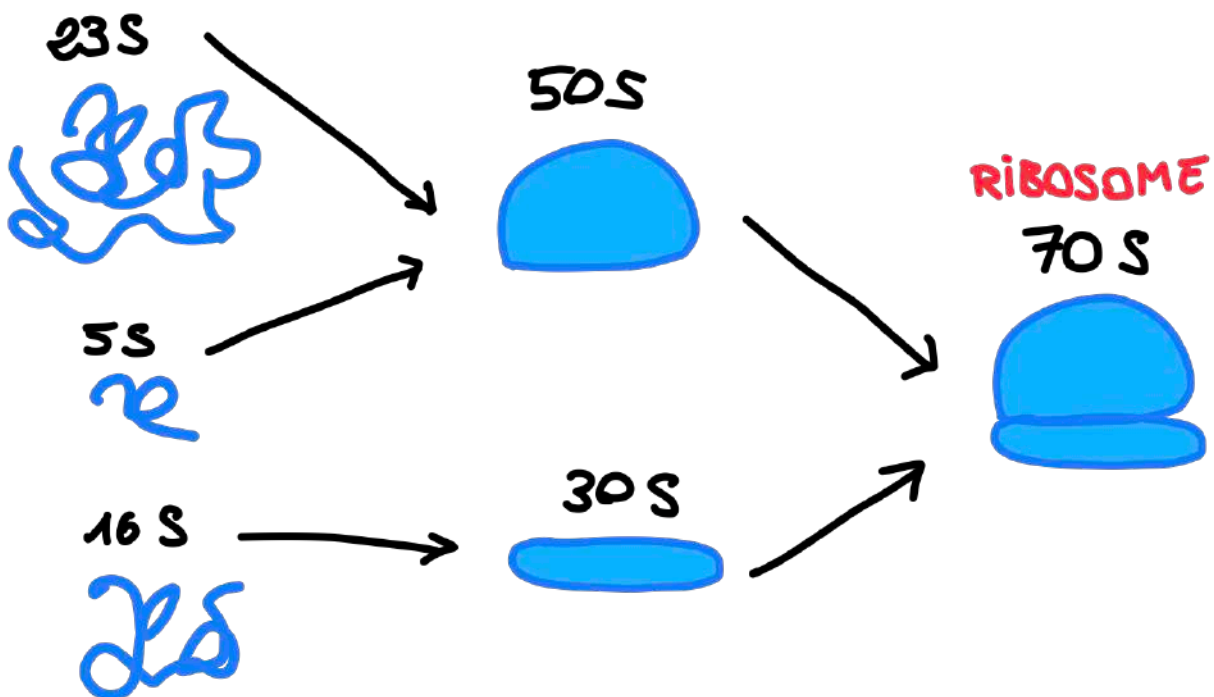
B) L'ARN ribosomal:

1. Structure du ribosome:

Dans les bactéries ce sont les ribosomes qui s'occupent de la synthèse des protéines.

Le ribosome est composé de **3 ARN ribosomiques** (ARNr) le **23S**, le **5S** et le **16S**. Le « S » signifie « *Svedberg* »: c'est une unité de mesure pour le coefficient de sédimentation.

Ces ARNr vont former des sous-unités: 23S et 5S forment la sous-unité **50S**, et 16S forme la sous-unité **30S**. L'association de ces deux sous-unités forme le ribosome **70S**.



Cependant, la découverte de ces 3 ARNr s'est faite dans l'autre sens: on a réalisé une expérience où l'on a chauffé les ribosomes qui se sont peu à peu séparés en sous-unités puis en ARNr.

2. L'ARN ribosomal 16S:

La petite sous-unité va nous intéresser particulièrement car elle est composée de l'ARNr 16S: l'ARNr 16S est **UNIVERSELLE** chez les procaryotes, et permet ainsi de retrouver les **liens de parenté** entre les espèces.

L'ARNr 16S est composé d'une succession de séquences à vitesse d'évolution variable avec des séquences: **conservées, variables et hypervariables**. Cela nous permet de savoir à quelle espèce appartient une bactérie.

Les **séquences conservées** de l'ARNr 16S vont être intéressantes car elles vont nous permettre d'**hybrider des amorces et d'amplifier des gènes** de n'importe quelle bactérie (#*biomol*). De ce fait, l'amplification et le séquençage de ces gènes sont **UNIVERSELS**.

Ces amorces universelles nous permettent également de réaliser des **hybridations in situ** avec des ondes fluorescentes. La quantité de ribosomes disponibles dans chaque bactérie est importante puisqu'elle va nous permettre de visualiser les bactéries.

La banque d'ARNr 16S correspond à la plus grande banque de séquences communes avec plus de **200 000 séquences**.

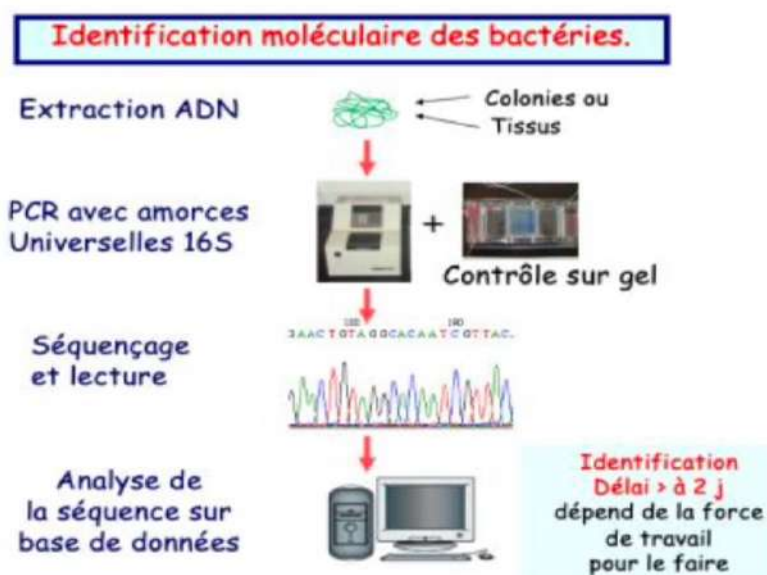
3. Histoire de l'ARN 16S:

On doit se séquençage à **Carl Woese** qui a commencé à comparer et séquencer ces différentes séquences avec celles des autres bactéries. Il a ainsi remarqué la présence de séquences conservées et de séquences différentes. In fine il a établi l'arbre phylogénétique en comparant les séquences entre elles.

Ainsi on a décidé de séparer les eubactéries (comptant les bactéries commensales et pathogènes) des eucaryotes et des archées. Cependant l'origine de la vie demeure incertaine.

4. L'identification moléculaire des bactéries:

L'identification moléculaire des bactéries fonctionne de la manière suivante: à partir d'un prélèvement on extrait de l'ADN correspondant à l'ARNr 16S. Puis on réalise une **amplification PCR** grâce aux **amorces universelles**. Cela permet le



séquençage et la lecture des séquences obtenues que l'on va comparer à la banque de données → on **IDENTIFIE** la bactérie.

Mais la réalisation d'une identification moléculaire se fait que dans certaines situations:

- Pour identifier une bactérie **non reconnue** par spectrométrie
- Bactéries **non cultivables** sur milieux de culture habituels
- **Culture négative** après un traitement antibiotique pour s'assurer de l'absence d'une bactérie donnée
- Dans un **prélèvement considéré stérile** sans microbiote, à priori mono bactérien (ex: LCR, liquide articulaire, valve cardiaque)

Dans les autres cas (*quand c'est polymicrobien*), on utilise plutôt la spectrométrie de masse qui est plus efficace et moins coûteuse.

C) Plasticité du génome bactérien:

Cela concerne à la fois l'ADN chromosomique et l'ADN extra-chromosomique. La plasticité est rendue possible par 2 mécanismes:

1. Par mutations aléatoires:

Lors de la réplication d'ADN chromosomique et plasmidique on retrouve tous les **10⁶ à 10⁷** nucléotides des **mutations aléatoires non corrigées**. Ces mutations vont exercer une pression de sélection: notamment si la mutation touche la cible des antibiotiques. En effet ces mutations peuvent offrir une résistance aux antibiotiques.

2. Par acquisition d'un nouveau matériel génétique:

Les bactéries sont capables de récupérer de l'ADN extérieur par 3 mécanismes:

- Transformation
- Transduction
- Conjugaison

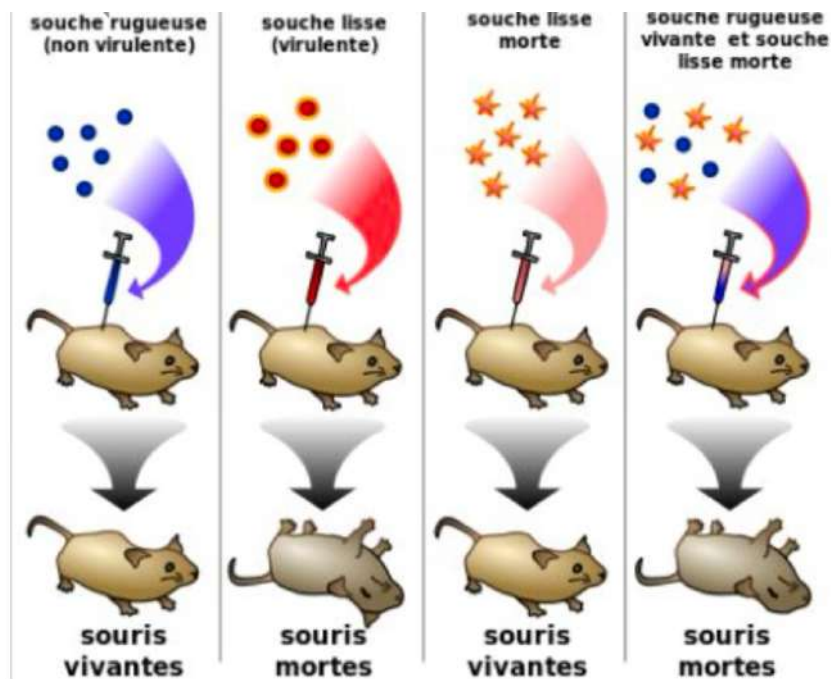
Ce sont les gènes chromosomiques ET plasmidiques qui peuvent passer d'une bactérie à une autre.

Le plasmide correspond à de l'ADN circulaire superenroulé et extra-chromosomique avec une réplication indépendante de l'ADN chromosomique, localisé dans le cytoplasme.

Le plasmide est de petite taille mais joue un rôle important dans la diversité des gènes. Il contient des gènes métaboliques et cataboliques, de production de toxines et de résistance aux antibiotiques.

a. Transformation:

Elle a été découverte en 1928 avec l'**expérience de Griffith**. Dans cette expérience on utilise des colonies de *Streptococcus pneumoniae*: une souche rugueuse **non virulente** et une souche lisse **virulente**.



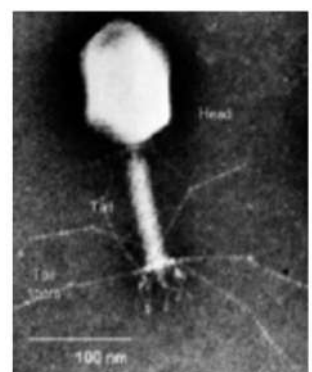
- Lorsqu'on injecte la souche non virulente la souris vit, et meurt avec la souche virulente. On distingue le caractère létale de la souche lisse virulente.
- Si on injecte la souche virulente morte (après chauffage), la souris vit.
- Cependant lorsqu'on injecte la souche virulente morte ET la souche non virulente vivante la souris meurt.

On en déduit que quelque chose passe de la souche virulente à la souche non virulente: ce sont des fragments d'ADN.

b. Transduction:

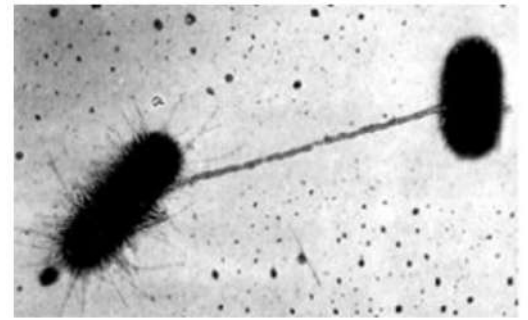
Elle se fait via un virus qui n'infecte que les bactéries: c'est un **bactériophage**. Il se fixe sur une bactérie puis lui injecte son ADN. Par la suite il réalise soit un cycle lytique soit un cycle lysogénique.

- **Cycle lytique:** le bactériophage se reproduit et **détruit** la bactérie pour libérer ses clones. Cependant chaque clone peut **recupérer un morceau de l'ADN** de la bactérie.
- **Cycle lysogénique:** le bactériophage s'intègre dans le chromosome et reste **dormant**. À ce moment il **rapporte à la bactérie de l'ADN** issu des précédentes bactéries infectées et qui peut coder pour de nouveaux caractères.



c. Conjugaison:

Elle se fait entre une bactérie **mâle** et une bactérie **femelle** par l'intermédiaire d'un **pilus sexuel**. Au sein de ce pilus sont échangés des fragments d'ADN chromosomiques ou plasmidiques. Le transfert dépend du temps de contact.



D) Règles de classification et nomenclature des bactéries:

L'espèce correspond à l'unité fondamentale de la classification.

La souche correspond à une **sous-division** de l'espèce.

Un clone correspond à la population descendant d'une **même souche**.

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

- **Critère Phénotypique**: distinct des autres espèces
- **Critère Génotypique**: qui correspond à une hybridation ADN/ADN $\geq 70\%$

En réalité ces deux critères commencent à être abandonnés de nos jours. Maintenant on utilise plutôt des **comparaisons de séquences génomiques complètes** avec une identité moyenne $\geq 95\%$.

Ainsi la classification des bactéries est devenue **phylogénétique** et se base sur le séquençage de l'ARN 16S.

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.



Le nom d'une bactérie comprend un nom de **genre** (qui commence par une majuscule), et un nom **d'espèce** (tout en minuscule).

Ex: **Streptococcus pneumoniae**