

**Pr.K. Benlabed.**

## **Génétique bactérienne**

### **I-Introduction**

Les caractères d'un individu ou d'une cellule sont régulièrement et fidèlement transmis de génération en génération, on dit qu'ils sont héréditaires. L'hérédité est cette remarquable stabilité des propriétés et des fonctions spécifiques d'une cellule, d'un tissu, d'un organe ou d'un individu au cours de la filiation. Pourtant, cette règle présente des exceptions: des caractères nouveaux peuvent apparaître dans la descendance. Ces phénomènes sont désignés du nom de variations génotypiques.

Bien qu'elle soit du domaine de la biologie moléculaire, la génétique est intéressante du point de vue épidémiologique et du diagnostic bactériologique, et aussi pour comprendre les mécanismes de résistance aux antibiotiques et donc de l'antibiothérapie.

Les phénomènes les plus étudiés sont les variations génotypiques (Mutations) ainsi que les transferts génétiques.

### **II- Mutation chromosomique :**

**A) Définition:** c'est l'apparition dans une population donnée, d'une bactérie présentant un caractère différent, qu'elle peut transmettre indéfiniment à toute sa descendance. C'est donc une modification brusque d'un caractère transmissible héréditairement.

**B) Mise en évidence:** plusieurs expériences ont été menées.

Exemple: sensibilité ou résistance à un antibiotique ( Lederberg ).

On ensemence sur un milieu solide, contenant un antibiotique (la streptomycine), quelques centaines ou milliers de bactéries à partir d'une souche pure sensible à la streptomycine. Aucune colonie ne se forme sur le milieu.

On refait la même expérience mais en utilisant plusieurs centaines de millions de bactéries de la même souche. On voit, alors, apparaître une ou plusieurs colonies. Ces colonies (bactéries) sont devenues résistantes à la streptomycine et conservent indéfiniment ce nouveau caractère au cours des sub cultures sur milieux contenant ou non de la streptomycine. Ce sont des mutants.

### **C) Caractères de la mutation:**

1°) Rareté: elle est définie par le taux de mutation qui est la probabilité pour une bactérie de muter pendant une génération. Ce taux varie entre  $10^{-6}$  et  $10^{-10}$ , il est constant dans des conditions données et ne dépend pas de la présence d'un agent sélectif.

2°) Spontanéité : à cause de leur rareté, les chercheurs ont essayé de savoir si ces mutations sont spontanées ou induites par un agent sélectif (mutagène).

Les résultats des différentes études (exemple: expérience de Lederberg) prouvent que les mutations sont spontanées et peuvent se produire en absence des mutagènes.

Néanmoins, on peut les induire par :

- Agents physiques : rayons X (RX) et ultra-violets (UV).
- Agents chimiques : Acide nitreux et nitro-guanidine

3°) Spécificité - Indépendance: la mutation est, d'une part, spécifique d'un caractère déterminé à l'exclusion de tout autre. D'autre part, elle est indépendante, c'est à dire qu'une bactérie peut subir une mutation double sur deux caractères totalement différents. Le taux de mutation dans ce cas est pratiquement négligeable (de l'ordre de  $10^{-15}$ ) car c'est le produit des deux probabilités individuelles des deux caractères.

4°) Discontinuité - Stabilité : la mutation est un phénomène discontinu, il obéit à la loi du "tout ou rien", la nouvelle propriété acquise est transmise indéfiniment à toute la descendance et se maintient, même en absence de l'agent sélecteur. On dit qu'elle est héréditaire et stable.

Néanmoins, le caractère acquis peut disparaître grâce à une mutation reverse qui obéit aux mêmes lois que la mutation initiale.

**D) Bases chimiques de la mutation:** quelle soit spontanée ou induite, la mutation entraîne une modification dans la séquence de bases de l'ADN, ceci aboutit à un changement dans la structure de la protéine codée par le gène modifié .

1°) Mécanisme: la fréquence de la mutation est augmentée en présence de nombreux agents mutagènes. On peut avoir trois principaux processus:

a) Modification par substitution de bases : on décrit 2 classes,

\* Celle où une base purique est remplacée par une autre base purique, ou une base pyrimidique par une autre base pyrimidique (transition).

\* Celle où une base purique est remplacée par une base pyrimidique, et vice versa (transversion).

La substitution peut être réalisée grâce aux agents mutagènes, comme les analogues de bases ou les agents nitreux.

Exemple: substitution grâce aux analogues de bases, comme le 5 bromo-uracile (5BU) analogue de la thymine.

Le 5 BU (forme cétonique) peut remplacer la thymine en face d'une adénine. A la génération suivante, par suite d'un changement de forme (forme énolique), il s'apparie à une guanine. La paire A-T est, ainsi, remplacée par la paire G-C.

A-T → A - 5 BU(c) → G - 5 BU(e) → G-C.



Exemple 2: mutations létales: lorsque le produit codé par un gène donné est indispensable à la cellule, la mutation qui entraîne son activation est létale et aboutit, donc, à la mort de la bactérie.

Exemple 3: résistance aux ATB: elle survient à la suite de certaines modifications. Ainsi, la membrane cytoplasmique peut devenir imperméable à l'ATB, l'affinité entre la cible enzymatique et l'ATB peut être réduite ou supprimée, la bactérie peut acquérir des enzymes qui dégradent et inactivent l'ATB.

### **III- Transferts génétiques :**

C'est le passage de l'ADN d'une bactérie donatrice vers une autre, réceptrice. L'ADN de la bactérie donatrice est appelé exogénote, alors que celui de la bactérie réceptrice est appelé endogénote. Le passage peut se faire de plusieurs manières:

#### **A) Transformation : (transfécion)**

1) Définition: c'est la fixation puis l'adsorption d'un fragment d'ADN d'une bactérie donnée (donatrice) sur une autre bactérie (réceptrice) génotypiquement différente. Ce phénomène existe chez certaines bactéries, comme les Streptocoques, les Heamophilus ou les Neisseria.

2) Mise en évidence:

Expérience de Griffith (1928) :

- P S<sub>1</sub>V souris mort (septicémie).
- P S<sub>1</sub>T souris survie.
- P R<sub>3</sub> V souris survie.
- PS<sub>1</sub>T + PR<sub>3</sub>V souris mort (septicémie).

Expérience d'Avery et collaborateurs (1944):

- P S<sub>1</sub> → ADN.
- ADN + PR<sub>3</sub>V → injection aux souris: septicémie mortelle.

NB :

PS<sub>1</sub>V et T: Pneumocoque de type 1 capsulé vivant et tué. S : Smooth

PR<sub>3</sub>V: Pneumocoque de type 3 non capsulé vivant. R : Rough.

3) Conditions: il en existe deux, essentiellement.

a) L'état de compétence: la transformation n'est possible que durant une courte durée ( 15 à 30 minutes) à la fin de la phase exponentielle de la croissance bactérienne. La compétence dépend de la production d'une protéine: le facteur de compétence. Cette substance agirait en dégradant certaines structures de surface, démasquant, ainsi, les récepteurs de l'ADN, ou en dégradant les composants pariétaux et permettant le passage de l'ADN transféré.

b) L'ADN transformant: il doit être bicaténaire pour pénétrer dans les bactéries réceptrices. De plus, la taille ( $5 \times 10^6$  pour le Pneumocoque) et, dans une certaine mesure, la concentration sont, aussi, importantes.

En général, un seul caractère est transféré au cours de ce phénomène, même si les 2 bactéries sont différentes pour d'autres caractères. Les transformations multiples sont rares.

4) Mécanisme: la transformation passe par plusieurs étapes.

a) Fixation: elle se fait au hasard. La bactérie réceptrice est dotée de sites d'adsorption pour l'ADN transformant. L'adsorption est dans un premier temps réversible (sensible à l'action de la désoxyribonucléase). Par la suite, elle devient irréversible.

b) Pénétration: l'ADN passe dans le cytoplasme des bactéries réceptrices, dont le nombre dépend de la quantité d'ADN capable de saturer les sites récepteurs.

c) Phase d'éclipse: au cours de laquelle l'ADN subit une profonde modification. Il disparaît sous sa forme initiale, il est ainsi préparé à l'étape suivante.

d) Intégration: l'ADN modifié est, alors, intégré dans le génome de la bactérie réceptrice, qui va acquérir les caractères des gènes transférés.

### **B) Conjugaison :**

1) Définition: c'est le transfert du matériel génétique d'une bactérie donatrice (mâle) à une bactérie réceptrice (femelle) après contact direct entre les deux bactéries grâce aux pili sexuels.

La conjugaison concerne certaines bactéries, comme E coli, Pseudomonas aeruginosa, les salmonelles.

2) Différenciation sexuelle: elle se fait grâce à un facteur appelé: facteur de sexualité (FS) ou de fertilité (FF). Ce facteur code pour les pili sexuels et il peut avoir deux localisations.

\* Sous forme de plasmide, la bactérie mâle est, alors, dite F+.

\* Intégré dans le génome de la bactérie mâle qui est dite, dans ce cas, Hfr (haute fréquence de recombinaison).

\* La bactérie femelle, dépourvue de FF et de pili sexuels est dite F-.

3) Mise en évidence: Lederberg et Tatum (1946).

Les auteurs ont utilisé une souche d'E.coli K<sub>12</sub> rendue auxotrophe par manipulation génétique.

- Culture d'une bactérie A (10<sup>9</sup>)= T+L+B<sub>1</sub>+Ph-B- sur milieu simple → Absence de culture.

- Culture d'une bactérie B (10<sup>9</sup>)= T-L-B<sub>1</sub>-Ph+B+ sur milieu simple → Absence de culture.

- Mélange, avant culture sur milieu simple, de 10<sup>8</sup> de A et de 10<sup>8</sup> de B → présence d'une culture (50 à 100 colonies).

Le mélange des bactéries A et B a donné naissance à des bactéries prototrophes, capables de cultiver sur milieu simple. Ce sont des **recombinants**

### **NB :**

T: Thréonine, L: Leucine, B<sub>1</sub>: Thiamine, Ph: Phénylalanine, B: Biotine, (+): prototrophe,

(-): auxotrophe:

4) Mécanismes: la conjugaison passe par plusieurs étapes.

- \* Fixation de la bactérie mâle sur la bactérie femelle grâce aux pili sexuels.
- \* Rétraction des pili sexuels et, donc, rapprochement des deux bactéries.
- \* Etablissement d'un pont intracytoplasmique.
- \* Transfert. Il dépend de la localisation du FF.

**a) Le FF localisé sur un plasmide:  $F^+ \times F^-$ .**

La bactérie mâle peut transmettre ou pas des caractères chromosomiques, mais le FF est toujours transmis. Ainsi, les bactéries  $F^-$  deviennent systématiquement  $F^+$ , capable, à leur tour, de masculiniser d'autres bactéries femelles.

**b) Le FF intégré dans le chromosome bactérien:  $Hfr \times F^-$ .**

Il y'a possibilité de transfert partiel ou même total du chromosome.

Ce transfert est orienté, progressif. De plus, il est long lorsqu'il est total (90 à 100mn à 37°C) et fragile (peut être arrêté par simple agitation). Les deux derniers éléments provoquent l'arrêt du transfert (agitation du milieu réactionnel, séparation spontanée du couple), qui est donc rarement total. La bactérie réceptrice obtient les caractères des gènes qui ont pu se transférer mais reste généralement femelle ( $F^-$ ) car elle n'acquière le FF que rarement (il passe toujours en dernier). Les recombinants  $Hfr \times F^-$  sont, donc, et dans la majorité des cas  $F^-$ .

NB: la conjugaison joue un grand rôle dans le transfert des plasmides de résistance. La résistance plasmidique représente 90% de la résistance bactérienne aux ATB.

**3) Transfert grâce à un bactériophage ( la Transduction):**

**A) Le bactériophage :** c'est le virus des bactéries. C'est un agent infectieux pouvant être responsable de la lyse bactérienne. la lyse peut être mise en évidence sur milieux solide ou liquide.

Multiplication des phages: il existe deux cycles.

1) Cycle lytique: grâce à sa plaque terminale le phage se fixe au niveau de la paroi bactérienne sur des récepteurs spécifiques. Après fixation irréversible, la gaine se contracte, le canal axial pénètre dans le cytoplasme bactérien. Par la suite, l'acide nucléique du phage est injecté dans la bactérie hôte.

Dans le cytoplasme, le phage utilise les constituants bactériens, en plus de ses propres enzymes, pour synthétiser les différents constituants phagiques. Il synthétise aussi un lysosyme qui provoque la perforation de la paroi puis la lyse bactérienne. Les phages, ainsi, libérés vont infecter d'autres bactéries et le cycle reprend.

2) Cycle non lytique ou lysogénique: dans ce cas il n'y a pas de cycle de multiplication. L'ADN du phage s'intègre dans le chromosome de la bactérie qui va le répliquer au même titre que son propre génome (prophage). Néanmoins, le cycle lytique peut reprendre sous l'influence de facteurs externes, comme par exemple l'irradiation par les UV ou les RX.

### **B) La transduction:**

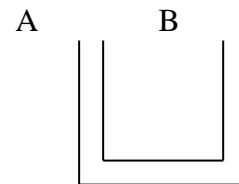
1) Définition: c'est le transfert d'un ou de plusieurs gènes d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice grâce à un phage transducteur. Au cours de son infection, le phage synthétise une endonucléase qui fragmente le chromosome bactérien. Par la suite, le phage peut emporter dans sa capsid n'importe quelle portion de l'ADN fragmenté pour la transmettre à une autre bactérie.

La transduction est possible chez des bactéries comme E.coli, Shigella, Proteus, Pseudomonas ou encore les staphylocoques.

2) Mise en évidence: Zinder et Lederberg (1951).

Les auteurs ont utilisé deux souches différentes de Salmonella typhimurium. L'une auxotrophe pour le tryptophane (souche 22A) et l'autre auxotrophe pour l'histidine (souche 2A).

Dans un tube en U, séparé à la base par une membrane de verre fritté qui permet le passage des virus mais pas des bactéries, on introduit dans le compartiment A,  $10^8$  de la souche 22A, alors qu'on introduit  $10^8$  de la souche 2A dans le compartiment B.



au bout d'un certain temps on obtient, dans le compartiment A, des souches prototrophes.

3) Différents types de transduction: il existe plusieurs types.

a) Transduction généralisée : n'importe quel gène peut être transduit (phénomène qui se fait au hasard). Seuls les caractères proches peuvent être transmis par un même phage. La transduction généralisée est de deux types.

\*T. généralisée complète: le fragment d'ADN transféré s'intègre dans le chromosome de la bactérie réceptrice et sera donc transmis à toute sa descendance.

\* T. généralisée abortive: l'ADN transféré reste libre dans le cytoplasme de la bactérie réceptrice et ne sera donc transmis qu'à une seule cellule fille.

b) Transduction spécialisée ou restreinte: elle a été étudiée chez E. coli et le bactériophage  $\lambda$  pour le gène Gal+.

Le prophage  $\lambda$  est localisé près du gène Gal (galactokinase) sur le génome de la bactérie. Des échanges génétiques provoquent le changement d'une partie du génome du phage par le gène gal. Si le cycle lytique reprend, le phage va transmettre à d'autres bactéries (réceptrices) Gal-, le gène Gal+. Celles-ci deviennent, alors, hétérogénètes pour le gène Gal.

4) Conversion lysogénique : c'est le cas du prophage. L'intégration de l'acide nucléique du phage dans le chromosome bactérien aboutit à l'apparition de nouveaux caractères chez la bactérie hôte. L'information est, donc, bactérienne et virale en même temps.

Exemples :

- Modification des antigènes des Salmonelles
- Production de toxine par *Corynebacterium diphtheriae*, de la toxine érythrogyne par les Streptocoques du groupe A, de la fibrinolyse par les staphylocoques.



# Les Haemophilus

## I- Introduction:

Le germe a été dénommé dans un premier temps *Bacillus influenzae*, car il a été incriminé dans la pandémie de grippe (influenza) de 1889-1892. Le nom *Haemophilus* n'a été proposé qu'en 1917

Ce genre comprend plusieurs espèces bactériennes, caractérisées par leur polymorphisme et leur auxotrophie.

## II- Classification-habitat:

Le genre *Haemophilus* appartient à la famille des Pasteurellaceae. Il contient 16 espèces d'origine humaine et animale. L'espèce type est *Haemophilus influenzae*, mais d'autres espèces jouent aussi un rôle en pathologie humaine, comme *H.aegyptius*, *H.haemolyticus*, *H.parainfluenzae* ou, encore, *H.ducreyi*.

Ces bactéries font partie de la flore normale des muqueuses des voies respiratoires supérieures et de la cavité buccale de l'homme et de nombreuses espèces animales (mammifères et oiseaux). Chez l'homme, elles sont rencontrées, également, dans les selles et la muqueuse urogénitale.

## III- Caractères bactériologiques:

**A) Morphologie:** ce sont de très petits bacilles (1 à 1,5 µ de long), à Gram négatif, très polymorphe (de la forme coccobacillaire à la forme filamentaire). Ils sont immobiles, asporulés, pouvant être capsulés. Ainsi, la capsule d'*H.influenzae* permet de différencier 6 sérotypes (a à f), dont le plus courant est le sérotype b.

**B) Culture:** les *Haemophilus* (qui aiment le sang) sont des bactéries auxotrophes, donc exigeantes. Les facteurs de croissance sont le NAD (nicotinamide-adénine-dinucléotide) ou facteur V, ainsi que l'hémine ou facteur X, apportés généralement par le sang. L'exigence d'un ou des deux facteurs diffère selon les espèces.

Les milieux de culture doivent contenir l'un ou les deux facteurs, en fonction de l'espèce recherchée. La teneur en NAD est faible dans une gélose au sang et ne convient, donc, pas pour *H.influenzae* qui exige les deux facteurs. La gélose au sang cuit ou la gélose chocolat donne des cultures importantes. Notons, aussi, que ce germe peut se multiplier sur milieu simple en présence de colonies du staphylocoque par le phénomène de satellitisme.

Les milieux sont rendus sélectifs par adjonction d'antibiotiques pour lesquels la bactérie est résistante (bacitracine, vancomycine, clindamycine), ces milieux sont utilisés pour les prélèvements contaminés, comme ceux provenant du tractus respiratoire ou vaginal.

La température de culture optimale est de 35-37°C, l'incubation dans une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> favorise la culture. Les colonies d'*H.influenzae* sur gélose au sang cuit, par exemple,

apparaissent en 18 à 24 h d'incubation. Les souches capsulées donnent des colonies lisses, rondes, bombées, à bords réguliers.

C) Caractères biochimiques: ce sont des bactéries aéro-anaérobies facultatives, utilisent les sucres par voie fermentative ou oxydative. Les caractères principaux de quelques espèces sont résumés sur le tableau suivant :

	Hemine	NAD	Oxydase	H2S	Urée	Indole
H. influenzae	+	+	+	-	+	V
H.aegyptius	+	+	+	-	+	-
H.haemolyticus	+	+	+	+	+	-
H.parainfluenzae	-	+	+	+	V	-
H.ducreyi	+	-	-	-	-	-

#### IV- Pouvoir pathogène:

L'espèce type (H.influenzae) est responsable d'infections variées, parfois sévères, surtout chez l'enfant. Il s'agit d'infections aiguës systémiques provoquées par des souches invasives capsulées (du types b surtout). Les infections aiguës sans bactériémie ou chroniques sont dues à des souches non capsulées.

A) Chez l'enfant: avant l'âge de 3 mois, les infections sont rares. La forme septicémique avec détresse respiratoire est la plus fréquente. La méningite est fréquente chez l'enfant âgé entre 3 mois et 3 ans, le type b est le plus incriminé dans ces infections. D'autres types d'infections sont notés: septicémie, pneumonie, arthrite, péricardite. L'épiglottite survient chez des enfants plus âgés (2 à 7 ans), bien qu'elle soit plus rare que la méningite, elle est plus grave. Les infections localisées ( sphère ORL comme les otites et les sinusites ou bronco-pulmonaires) sont dues à des souches non capsulées.

B) Chez l'adulte: les infections à H.influenzae surviennent, généralement, chez des sujets âgés ou débilisés (traumatisme crânien, agammaglobulinémie, diabète, alcoolisme). Les formes pulmonaires et bronchopulmonaires sont les plus fréquentes.

#### V- Diagnostic:

A) Prélèvements: ils peuvent être monomicrobiens ( LCR, hémoculture, liquide articulaire, liquide pleural) ou polymicrobien (sécrétions bronchiques, sphère ORL).

La fiche de renseignements doit accompagner chaque prélèvement.

B) Examens directs: ils mettent en évidence de petits bacilles à Gram négatif, très polymorphes. Ces examens sont très utiles au cours des infections graves comme les méningites.

C) Culture: elle permet la recherche de l'auxotrophie (exigence en facteurs V et/ou X).

L'utilisation de milieux sélectifs est utile pour les prélèvements polymicrobiens.

**D) Identification:** en plus des exigences en facteurs V et X, les caractères les plus recherchés sont l'oxydase, l'uréase, l'indole ainsi que la fermentation de certains sucres.

L'agglutination sur lame est utile pour l'identification précise des souches capsulées d'*H.influenzae*. Cette méthode peut se faire directement sur le prélèvement pathologique, comme le LCR (recherche des Ag solubles).

**E) Antibiogramme:** pour vérifier la sensibilité du germe et mettre en évidence une éventuelle sécrétion d'une bêta-lactamase qui inactive l'ampicilline (amoxicilline), ATB majeur dans le traitement des infections à *H.influenzae*.

#### **VI- Sensibilité aux ATB:**

Les *Haemophilus* sont sensibles à de nombreuses familles d'ATB: bêta-lactamines, aminosides, chloramphénicol, rifampicine, quinolones, triméthoprime, sulfamides, tétracyclines, macrolides. Ils sont résistants aux licosamines. Le traitement est constitué, essentiellement, par l'ampicilline, l'augmentin ou les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération en cas de résistance (synthèse d'une bêta-lactamase). Le chloramphénicol est une bonne alternative en cas d'allergie.

#### **VII- Prophylaxie:**

Les mesures préventives sont mises en œuvre, uniquement, en cas de méningites à *H.influenzae* b. Ces mesures sont de deux types :

\* Chimio-prophylaxie: c'est l'élimination du portage du germe chez les sujets sensibles, s'il y'a apparition d'un cas de méningite. Plusieurs ATB ont été utilisés, les meilleurs résultats sont obtenus avec la rifampicine.

\* Vaccination: le vaccin est constitué par les polysaccharides capsulaires purifiés de la bactérie. Pour le rendre plus immunogène, et donc, plus efficaces, il est couplé à des porteurs, comme la toxine diphtérique, protéines d'origine bactérienne ou protéines de la membrane bactérienne externe. Ce vaccin est administré dès l'âge de 2 mois, en 3 injections à 1 mois d'intervalle avec un rappel à 16-18 mois.

#### **\* H.ducréyi:**

C'est une bactérie responsable d'une IST (infection sexuellement transmissible): Le chancre mou.

La bactérie n'est pas isolée en dehors de l'infection. C'est un coccobacille, à Gram négatif, immobile, peu colorable, à bouts arrondis. Il est exigeant, les colonies apparaissent en 2 à 5 jours, elles sont de tailles différentes (petites colonies à coté de grosses colonies).

Après une incubation brève de quelques jours (1 à 5 j. exceptionnellement 15 j), apparaît une papulo-pustule bordée d'un liseré érythémateux qui se transforme en ulcération arrondie, à bords irréguliers, douloureuse (diagnostic différentiel avec le chancre syphilitique), accompagnée d'adénopathies satellites.

La contamination se fait par contact direct après effraction cutanée (le dépôt d'une suspension bactérienne pure sur une peau saine ne produit pas de chancre).

Le diagnostic est clinique (chancre) et bactériologique (exemple: le Gram révèle la présence de coccobacilles à Gram négatif disposés en chaîne de bicyclette caractéristique)

Le cotrimoxasole est le traitement de choix de cette infection. Mais d'autres ATB peuvent être efficaces, comme l'érythromycine, l'augmentin, la ceftriaxone et les fluoroquinolones.