

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf- Mila
Institut Sciences et Technologie
Département sciences de la nature et de la vie



Polycopié de cours

Microbiologie Générale

Destiné aux étudiants de licence 2 SNV

Préparé par : Dr. AYAD Wissem

Année universitaire : 2022-2023

Préface

Le cours de "**Microbiologie générale**" s'adresse aux étudiants de 2^{ème} année licence SNV; Spécialités : Sciences biologiques, Ecologie et environnement, et Biotechnologie.

Il permet aux étudiants de découvrir le monde microscopique des micro-organismes et de répondre aux multiples questions qu'ils se posent : Comment s'est fait leur découverte ? D'où viennent-ils ? Y'a-t-il que de mauvais micro-organismes ? Comment se développent-ils ? Comment ils se nourrissent ? comment se fait leur étude?... Et bon nombre de questions auxquelles ils trouveront des réponses par ce module.

Dans un premier lieu, le cours traite de l'importance des microorganismes dans le monde vivant. Ensuite, il sera aborder la cellule bactérienne (structure, composition ...) ; la nutrition et la croissance bactérienne (les milieux de cultures, les types trophiques, les agents antimicrobiens...) ; la classification bactérienne et enfin des notions de mycologie et de virologie.

Prérequis

Bases solides en Biologie générale, biochimie, génétique et biologie moléculaire. L'étudiant doit avoir aussi une notion globale sur les agents pathogènes.

Objectifs du cours

Il a pour objectif de faire acquérir aux étudiants les connaissances théoriques et pratiques indispensables en Microbiologie.

- Bases qui seront utilisées dans d'autres parties du tronc commun et dans les modules intégratifs ;
- Structures, génétique, métabolisme et physiologie ;
- Interactions avec les autres composants de la biosphère (biotique et abiotique) ;
- Rôle dans l'équilibre écologique de la planète et importance dans les activités humaines.

Cet ouvrage a été rédigé selon le canevas du ministère de l'enseignement supérieur algérien et destiné à toute personne intéressée par l'étude du monde des microorganismes.

Dr. AYAD Wissem

Spécialité : Microbiologie appliquée.

Email : w.ayad@centre-univ-mila.dz

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Chapitre 1: Le monde microbien.	1
- Introduction	1
1.1. Historique	1
1.2. Place des microorganismes dans le monde vivant	2
1.3. Les protistes	3
1.3.1. Structure et fonction.....	3
1.3.2. Reproduction	3
1.3.3. Métabolisme	3
1.3.4. Ecologie	4
1.3.5. Organisation biologique des protistes	4
1.3.6. Types de protistes	6
1.3.6.1. Les protistes supérieurs (Eucaryotes).....	6
1.3.6.2. Les protistes inférieurs (Procaryotes).....	7
1.4. Caractéristiques générales de cellules procaryotes / cellules eucaryotes	7
Chapitre 2: La cellule bactérienne.	9
2.1. Définition.....	9
2.2. Techniques d'observation de la cellule bactérienne.....	9
2.3. Morphologie Bactérienne	10
2.4. Structure de la cellule bactérienne	11
2.4.1. La paroi bactérienne.....	12
2.4.1.1. Composition chimique de la paroi	12
2.4.1.2. La coloration de Gram.....	13
2.4.1.3. Fonctions de la paroi	15
2.4.2. La membrane cytoplasmique.....	15
2.4.2.1. Composition chimique et structure moléculaire	15
2.4.2.2. Fonction de la membrane plasmique	16
2.4.3. Le cytoplasme.....	17
2.4.3.1. Les ribosomes	17
2.4.3.2. Les granulations ou substances de réserve	17
2.4.3.3. Vacuoles à gaz	18
2.4.4. Le chromosome bactérien	18
2.4.4.1. Morphologie et structure.....	18

2.4.4.2. Composition.....	19
2.4.4.3. Rôle de chromosome	19
2.4.4.4. Réplication chimique.....	19
2.4.5. Les plasmides	20
2.4.5.1. Structure.....	21
2.4.5.2. Réplication	21
2.4.5.3. Le transfert plasmidique	22
2.4.5.4. Propriétés	23
2.4.6. La capsule.....	23
2.4.6.1. Morphologie.....	23
2.4.6.2. Composition chimique.....	24
2.4.6.3. Fonctions de la capsule.....	24
2.4.7. Les cils et flagelles.....	24
2.4.7.1. Structure.....	25
2.4.7.2. Fonctions du flagelle	26
2.4.8. Pili ou Fimbriae	26
2.4.8.1. Structure.....	26
2.4.8.2. Fonction	27
2.4.9. La spore.....	27
2.4.9.1. Morphologie.....	27
2.4.9.2. Structure de la spore	28
2.4.9.3. Phénomène de sporulation	29
2.4.9.4. Propriétés	30
2.4.9.5. Germination	31
Chapitre 3: Classification bactérienne.....	32
3.1. Classification phénotypique.....	34
3.2. Classification génétique ou phylogénique	35
3.2.1. La taille du génome.....	35
3.2.2. Composition en base d'ADN (<i>Coefficient de Chargaff</i>).....	35
3.2.3. Hybridation ADN/ADN	36
3.2.4. Le séquençage des ARN ribosomiaux (ARNr)	36
3.3. La classification selon le manuel de Bergey.....	37
3.3.1. Le domaine des Bacteria	37
3.3.2. Le domaine des Archeae	37

Chapitre 4: Nutrition bactérienne.	38
4.1. Les besoins élémentaires	38
4.1.1. Eau	38
4.1.2. Source d'énergie	38
4.1.3. Source de carbone	39
4.1.4. Source d'azote	39
4.1.5. Source de soufre et phosphore	40
4.2. Besoins en facteurs de croissance	41
4.3. Les différents types nutritionnels ou trophiques	42
4.4. Paramètres physico-chimiques	43
4.4.1. Température	43
4.4.2. pH	44
4.4.3. Pression osmotique	44
4.4.4. Besoins en oxygène	45
Chapitre 5: Croissance bactérienne.	46
5.1. Mesure de la croissance	46
5.1.1. Mesure du nombre de cellule	47
5.1.1.1. Numération directe au microscope	47
5.1.1.2. Compteur de particules	48
5.1.1.3. Épifluorescence	48
5.1.1.4. Dénombrement après culture	49
5.1.2. Mesure de la biomasse	50
5.1.3. Mesure des constituants cellulaire	50
5.2. Les paramètres de croissance	51
5.3. Courbe de croissance (culture discontinue)	51
5.3.1. Autres modes de croissance	53
5.3.1.1. Phénomène de diauxie	53
5.3.1.2. Croissance continue	54
5.4. Culture bactérienne	55
5.4.1. Classification des milieux de culture	55
5.4.1.1. Classification des milieux selon la consistance	56
5.4.1.2. Classification des milieux selon la composition	56
5.4.1.3. Classification des milieux selon l'utilisation	57
5.5. Les agents antimicrobiens	58
5.5.1. Définition	58

5.5.2. Classification	58
5.5.2.1. Les agents physiques	59
5.5.2.2. Les agents chimiques.....	61
5.5.2.3. Les agents chimio-thérapeutiques antimicrobiens	62
Chapitre 6: Notions de mycologie et de virologie.	66
6.1. Mycologie	66
6.1.1. Morphologie et structure	66
6.1.1.1. Levures	67
6.1.1.2. Les moisissures	67
6.1.2. Taxonomie.....	68
6.1.3. Reproduction	69
6.1.3.1. La reproduction asexuée.....	69
6.1.3.2. La reproduction sexuée.....	70
6.2. Virologie.....	71
6.2.1. Définition	71
6.2.2. Morphologie et structure.....	72
6.2.2.1. Génome.....	73
6.2.2.2. Capside	73
6.2.2.3. Enveloppe	74
6.2.3. Classification des virus	74
6.2.4. Multiplication des virus	74
Les références bibliographiques.....	78

Liste des figures

Figure 01 : (a) Portrait de van Leeuwenhoek. (b) Réplique en laiton du microscope de van Leeuwenhoek. (c) Bactéries provenant de la bouche, dessins de van Leeuwenhoek	1
Figure 02 : Classification des organismes vivants	3
Figure 03 : Protistes unicellulaires	5
Figure 04 : Protistes pluricellulaire	5
Figure 05 : Protistes coenocytiques	5
Figure 06 : Schéma d'une cellule bactérienne	9
Figure 07 : Différentes formes et associations bactériennes	11
Figure 08 : Représentation schématique montrant les différentes structures bactériennes.	12
Figure 09 : a) La structure de peptidoglycane. b) un model dans l'espace de la muréine avec quatre sous-unités de peptidoglycane	13
Figure 10 : a) Structure de la paroi des bactéries à Gram positif. b) Structure de la paroi des bactéries à Gram négatif	13
Figure 11 : Principe de la coloration de Gram, avec à gauche une bactérie à Gram positif et à droite une bactérie à Gram négatif	14
Figure 12 : La structure de la membrane plasmique d'une cellule bactérienne	16
Figure 13 : Substance de réserve	18
Figure 14 : Structure et composition de l'ADN	19
Figure 15 : la réplication d'ADN	20
Figure 16 : plasmide (x10000)	21
Figure 17 : Réplication de Type Thêta θ	21
Figure 18 : Réplication de type « Rolling cercle »	22
Figure 19 : Mise en évidence de la capsule	24
Figure 20 : L'ultra structure d'un flagelle bactérien a) Gram négatif b) Gram positif	25
Figure 21 : Les différentes formes et positions de la spore bactérienne	28
Figure 22 : Structure de la spore bactérienne	28
Figure 23 : Le cycle sporale	30
Figure 24 : Tests métaboliques en mini galerie API	34
Figure 25 : Schéma explicative du phénomène de l'hybridation	36
Figure 26 : La division par scissiparité	46
Figure 27 : Exemple d'un hématimètre	47
Figure 28 : Utilisation de la chambre de comptage de Petroff-Hausser	47

Figure 29 : Compteur de particules	48
Figure 30 : Dénombrement des bactéries par la méthode des dilutions	49
Figure 31 : Le procédé de filtration sur membrane	50
Figure 32 : La courbe de croissance microbienne dans un système fermé	52
Figure 33 : Phénomène de diauxie chez les bactéries cultivées en présence du glucose et du lactose comme source de carbone	53
Figure 34 : Un système de culture continue : le chémostat	54
Figure 35 : Schéma du turbidostat	55
Figure 36 : Schéma des sites d'action des antibiotiques	64
Figure 37 : a/Moisissure (thalle filamenteux), b et c/Levures (thalle unicellulaire)	66
Figure 38 : Morphologie des levures (S : <i>Saccharomyces</i> , C : <i>Candida</i>)	67
Figure 39 : a) thalle siphonné b) thalle cloisonné	68
Figure 40 : Les types de thallospores	70
Figure 41 : Les cellules de reproduction sexuée. A : Ascospores, B : Basidiospores, C : Formation de l'oospore, D : Formation de la zygospore	71
Figure 42 : Structure et morphologie des principaux virus	72
Figure 43 : Schéma du cycle viral	76

Liste des tableaux

Tableau I : Caractéristiques générales des cellules eucaryotes et cellules procaryotes.	8
Tableau II : Exemples de vitamines utilisées par les bactéries.	41
Tableau III : Les principaux types nutritionnels chez les micro-organismes	42
Tableau IV : Principales familles d'antibiotiques et leurs modes d'actions.	63
Tableau V : Les principales classes des virus	75

Chapitre 1: Le monde microbien.

- Introduction

La microbiologie a souvent été définie comme l'étude d'organismes trop petits pour être vus à l'œil nu, c'est-à-dire l'étude des micro-organismes.

Un microbe ou un micro-organisme fait partie d'un groupe large et extrêmement de divers organismes. Ces organismes sont regroupés sur la base d'une seule propriété : ils sont si petits qu'ils ne sont visibles qu'au microscope. Ce mot de micro-organisme est donc utilisé pour désigner **les bactéries**, **les mycètes** (champignons) unicellulaires (levures et moisissures), **les protozoaires**, une certaine **algue**, ainsi que **les virus** qui ne sont quant à eux visibles qu'au microscope électronique.

1.1. Historique

Pendant très longtemps, les gens crurent à la génération spontanée grâce à laquelle les organismes vivants pouvaient se développer à partir de matière morte ou en décomposition. Cette opinion fut finalement mise en doute par le médecin italien **Francesco Redi (1626-1697)**, qui réalisa une série d'expériences sur la production spontanée d'asticots par la viande en décomposition.

La découverte des micro-organismes par **Antony Van Leeuwenhoek (1632-1723)** raviva la controverse. C'est le Hollandais qui conçut le microscope le plus simple. Ainsi, il révéla au monde scientifique la prodigieuse diversité des microorganismes et l'incroyable richesse des milieux naturels, comme l'eau en protozoaires, algues, levures et bactéries (**Fig. 01**).

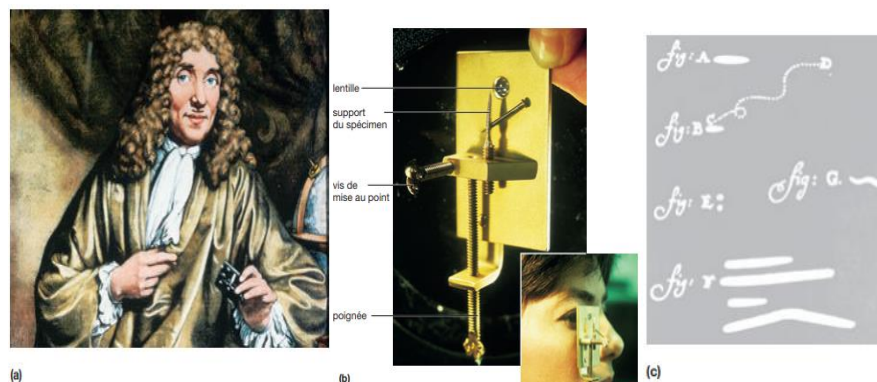


Figure 01 : (a) Portrait de van Leeuwenhoek. (b) Réplique en laiton du microscope de van Leeuwenhoek. (c) Bactéries provenant de la bouche, dessins de van Leeuwenhoek (Brock, 1970).

L'essor de la microbiologie au cours de la seconde moitié du XIX^{ème} siècle a été déclenché puis dominé par le génie de **Louis Pasteur (1822-1895)** et de l'allemand **Robert Koch (1843-1910)**. Les travaux de **Pasteur** jetèrent les bases de la théorie microbienne des maladies infectieuses et apportèrent les clés du contrôle de ces maladies au plan individuel et populationnel par la vaccination. Avec ses avancées méthodologiques, **Robert Koch** ouvrit la voie à la découverte de la majorité des bactéries pathogènes pour l'homme, grâce à leur isolement et leur culture à partir des prélèvements réalisés chez des sujets souffrant de maladies infectieuses. Sa contribution fut déterminante dans le domaine de l'hygiène et de la santé publique.

1.2. Place des microorganismes dans le monde vivant

Les micro-organismes sont différents et leur classification a toujours été un défi pour les taxinomistes. Leur description initiale soit comme plantes soit comme animaux était trop simple. Par exemple, certains sont mobiles comme les animaux, mais ont également des parois ou sont photosynthétiques comme les végétaux. La découverte des microorganismes a rendu difficile leur classement à cause de leurs caractères qui ne correspondent ni à l'un ni à l'autre des deux règnes.

Un troisième règne, **protiste**, est alors proposé par **Haeckel** en 1886. Il rassemble les algues, les protozoaires, les champignons et les bactéries. Les protistes eux, sont caractérisés avant tout par une organisation biologique rudimentaire (Unicellulaires ou pluricellulaires), ils présentent des **Protistes supérieurs ou Eucaryotes** qui ont un noyau entouré d'une enveloppe, leur morphologie est plus complexe et englobent : **Les algues** (excepté les algues bleu-vert), **les protozoaires** et **les champignons**. Et des **Protistes inférieurs ou Procaryotes** qui ont une morphologie plus simple que les cellules eucaryotes et n'ont pas de noyau sont : **Les algues bleu-vert** (ou Cyanophycées), **Bactéries** ou Schizomycètes. **Les Archéobactéries**, découvertes récemment, qui ont des caractéristiques qui ne ressemblent ni aux eucaryotes ni aux procaryotes, font l'objet d'une troisième classe des protistes (**Fig.02**).

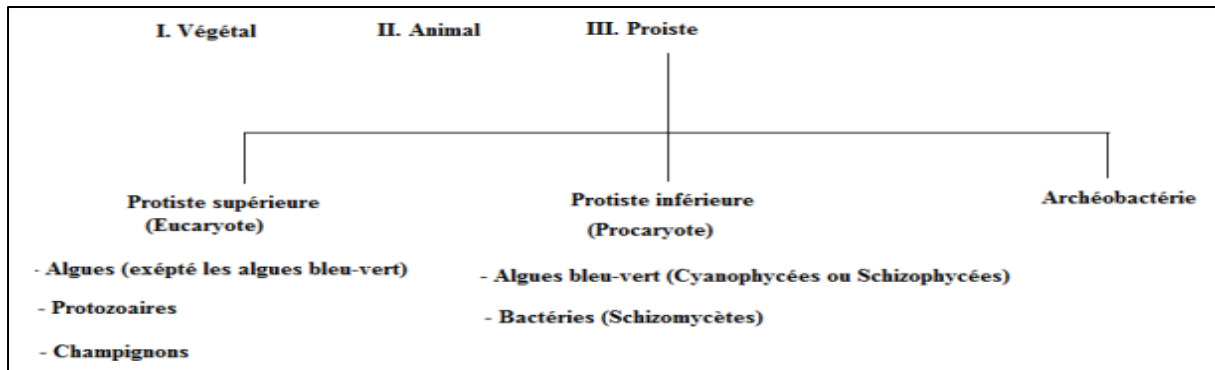


Figure 02 : Classification des organismes vivants (Fasquelle, 1970).

1.3. Les protistes

Les protistes sont définis par des propriétés communes et spécifiques : leur taille microscopique, leur organisation simple et unicellulaire pour la plus part. Si pluricellulaires, alors leurs cellules sont équivalentes, sans aucune différence morphologique, physiologique ou fonctionnelle. Les protistes se distinguent des animaux et des végétaux par leur structure, leur physiologie et leur écologie.

1.3.1. Structure et fonction

Une taille de loin plus réduites que celles des cellules animales et végétales. Les cellules animales et végétales sont incapables d'exister indépendamment de leur organisme. La taille réduite des protistes confère des avantages physiologiques. Un rapport surface/volume supérieur à celui de tous les autres organismes vivants. Ce qui permet des échanges et des interactions remarquables avec le milieu. Sans oublier une dissémination et une distribution dans la nature unique et impressionnante.

1.3.2. Reproduction

Les protistes et en particulier les bactéries ont des modes de reproduction simples, spécifiques et rapides (temps de génération courts). *Escherichia coli* par exemple, se reproduit par simple division binaire en 20 minutes. Cela se produit bien sûr en conditions optimales de culture en laboratoire. Ces taux de croissance exceptionnels induisent des rendements de croissances incomparables.

1.3.3. Métabolisme

Les microorganismes ont une propriété fondamentale qui est la diversité de leur métabolisme.

Chaque micro-organisme est spécifiquement adapté à la métabolisation d'un nombre plus ou moins limité de substrats. Ce qui explique leur distribution en fonction des caractéristiques nutritionnelles et physicochimiques du milieu.

Les microorganismes peuvent métaboliser toutes les substances organiques naturelles et même synthétiques. Ce processus constitue la minéralisation de la matière vivante et le recyclage des éléments chimiques qui forment la matière organique. Ceci permet de préserver l'environnement. La synthèse d'enzymes inductibles uniquement en présence de leurs substrats spécifiques.

1.3.4. Ecologie

Les micro-organismes sont ubiquitaires, ils sont présent dans tous les écosystèmes. On les retrouve **dans les mers et les océans**, ils constituent la biomasse (base du 1^{er} échelon de la chaîne alimentaire) qui nourrit l'ensemble de la faune marine.

Dans le sol, ils jouent un rôle dans la décomposition de la matière organique, la fourniture de l'azote assimilable aux plantes, la minéralisation de la matière organique. Les micro-organismes participent activement aux équilibres gazeux de l'atmosphère, en étant à la fois producteurs et consommateurs d'O₂, H₂, N₂, CO₂, et CH₄.

Dans le long de l'appareil digestif des animaux, ce dernier est tapissé de bactéries utiles à notre bien être digestif, elles nous procurent les enzymes nécessaires à la digestion de certains aliments. De plus, elles évitent que d'autres micro-organismes dangereux colonisent le tube digestif et nous rendent malades.

1.3.5. Organisation biologique des protistes

Les protistes se présentent selon trois types différents d'organisation biologique: Unicellulaires, pluricellulaires et coénocytiques.

a) Protistes unicellulaires

C'est le cas de la plus part des protistes, bactéries, protozoaires, levures et de nombreuses algues. Une cellule unique qui se suffit à elle-même et qui constitue un organisme complet et autonome, donc doué de toutes les fonctions de la vie : nutrition, croissance et reproduction (**Fig. 03**).

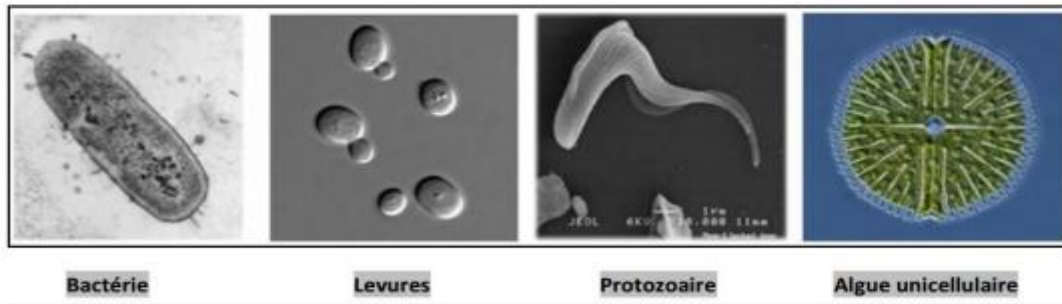


Figure 03 : Protistes unicellulaires (Golvan, 1969).

b) Protistes pluricellulaires

Ce sont principalement des champignons (Fungi) et des algues qui sont des organismes formés de plusieurs cellules (pluricellulaires ou multicellulaires). Mais dans un même organisme, leurs cellules sont équivalentes et ne montrent pas de différenciation fonctionnelle ou morphologique significative (Fig. 04).

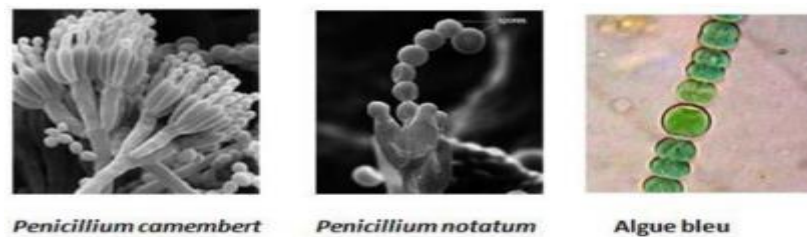


Figure 04 : Protistes pluricellulaire (Golvan, 1969).

c) Protistes coenocytiques

Des organismes de grande taille, se composent d'un cytoplasme important incluant de nombreux noyaux sans cloisonnement (septum) entre eux. Ils sont majoritairement aquatiques : C'est principalement le cas des champignons inférieurs et de quelques algues. Ce sont les seuls membres des champignons possédant le caractère de la mobilité (Fig. 05).

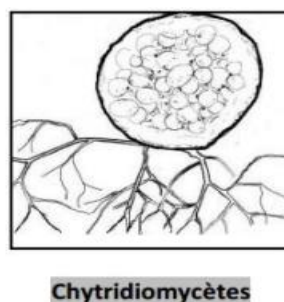


Figure 05 : Protistes coenocytiques (Golvan, 1969).

1.3.6. Types de protistes

1.3.6.1. Les protistes supérieurs (Eucaryotes)

Ce sont des micro-organismes qui possèdent de noyau. On distingue 3 groupes de protistes eucaryotes : les champignons, les algues et les protozoaires.

A. Les champignons : Les champignons ou mycètes sont des eucaryotes, et possèdent donc un noyau entouré d'une membrane nucléaire, ainsi que différents types d'organites cytoplasmiques limités par des membranes. Ils sont plus grands que les bactéries et peuvent constituer des assemblages de grande taille. Ils se reproduisent par scissiparité, et leur paroi cellulaire est constituée de chitine et non de peptidoglycane. On distingue deux catégories de mycètes : les moisissures et levure.

- **Les moisissures :** Sont des êtres pluricellulaires qu'on rencontre sur les fruits, le pain. Elles sont formées de filaments appelés hyphes qui, à leur tour vont donner des mycéliums (thalle). Les champignons ont une paroi rigide formée principalement de chitine (différents polysaccharides). Un grand nombre de champignons sont pathogènes pour les végétaux (phytopathogènes). D'autres sont des pathogènes de l'homme et des animaux mais ne causent pas de gros dégâts (Exemple : mycoses digestives).
- **Les levures :** sont des êtres unicellulaires (Exemple : *Saccharomyces cerevisiae*) ; c'est le microorganisme le plus utilisé dans le monde grâce son extraordinaire métabolisme. Ce sont des hétérotrophes qui possèdent une paroi rigide chitineuse.

B. Les algues : Les algues sont des êtres microscopiques (micro-algue, contrairement aux macro-algues), sont des organismes phototrophes. Elles réalisent la photosynthèse de types végétale (produisent de l'oxygène) et peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires, sont mobiles ou immobiles, ont une paroi de nature cellulosique et appartiennent à l'écosystème marin : eau douce, eau de mer.

C. Les protozoaires : Sont des protistes supérieurs, constitués d'une cellule similaire à celle de la cellule animale (eucaryote). Leur cellule ne présente donc pas de paroi. La plus part des protozoaires sont mobiles (cils, flagelle, pseudopodes : prolongements rétractiles du cytoplasme). La classification des protozoaires repose sur des caractères morphologiques et biologiques, mais il est aussi pratique de les séparer en pathogènes des muqueuses et pathogènes des tissus et du sang.

1.3.6.2. Les protistes inférieurs (Procaryotes)

Ce sont des micro-organismes qui ne possèdent pas de noyau. Ils ne possèdent pas, également, certains organites tels que l'appareil de Golgi.

A. Les bactéries :

Les bactéries sont des organismes unicellulaires relativement simples dont le matériel génétique, représenté par un seul chromosome circulaire, n'est pas contenu dans une enveloppe nucléaire (appelée aussi nucléoïde).

B. Les virus

Les virus sont les plus petits des microorganismes. Leur taille est de l'ordre de quelques nanomètres, ils ne sont observables qu'au microscope électronique. Ils ne sont pas des organismes vivants. Ce sont des parasites obligatoires de toutes cellules vivantes des animaux, des végétaux et des bactéries. Leur croissance et leur multiplication ne peuvent s'effectuer qu'à l'intérieur d'une cellule vivante, ce qui entraîne en générale, la destruction de la cellule hôte. Les virus parasites des bactéries sont appelés : bactériophages.

1.4. Caractéristiques générales de cellules procaryotes / cellules eucaryotes

On distingue en effet, la cellule eucaryote caractéristique des plantes et des animaux, des protistes supérieurs et la cellule procaryote caractéristique des protistes inférieurs et en particulier des bactéries.

- La cellule eucaryote comprend un « vrai » noyau entouré d'une enveloppe nucléaire, contenant deux jeux semblables de chromosomes (homologues) : elle est diploïde.
- La cellule procaryote ne possède pas un « vrai » noyau mais un appareil nucléaire diffus, non isolé par une membrane, avec un seul chromosome, porteur de la grande majorité des informations génétiques de la cellule : elle est haploïde.

Les principales différences entre les cellules eucaryotes et procaryotes sont retrouvées dans le tableau suivant :

Tableau I : Caractéristiques générales des cellules eucaryotes et cellules procaryotes (**Meyer et al., 2004**).

Caractéristique	Eucaryote	Procaryote
Taille moyenne de la cellule	10-100 µm	1-10 µm
Structure	Présence d'une membrane nucléaire qui régule les échanges avec le cytoplasme	Pas de membrane nucléaire, le noyau est diffus dans le cytoplasme : nucléoïde
Composition des chromosomes	ADN associé aux histones	ADN, pas d'histones, mais des protéines qui ressemblent aux histones (Histone-like proteins)
ARN/ Synthèse de protéines	Synthèse d'ARN dans le noyau Synthèse de protéines dans cytoplasme	Couplé au cytoplasme
Ribosomes	Très nombreux libres (80 S) ou sur les systèmes membranaires internes	Très nombreux, libres (70 S) uniquement
Autres organites	Présents (Réticulum endoplasmique, mitochondries, appareil de Golgi, lysosomes, etc.)	Absents
Organites spécialisés	Chloroplastes	Pas de chloroplastes, présence de chromatophores (chromatoblastes = cellule précurseur des chromatophores) ou de systèmes membranaires
Mouvement de la cellule	Flagelles et cils faits de tubuline	Flagelles faits de flagelline
Respiration	Par des organites spécialisés : mitochondries	Localisée au niveau de la membrane cytoplasmique
Photosynthèse présente chez	Algues et plantes	Cyanobactéries (ex. algues bleu-vert) et quelques bactéries photosynthétiques
Division cellulaire	Division binaire de la cellule (mitose)	Division binaire de la cellule (scissiparité)
Division nucléaire	Mitose (appareil mitotique)	Amitotique
Reproduction sexuée	Par fusion de 2 cellules reproductrices	Rare et très variée

Chapitre 2: La cellule bactérienne.

2.1. Définition

La cellule bactérienne est un microorganisme procaryote unicellulaire simple, de morphologie variable et de très petite taille, présentant des caractéristiques propres :

- L'absence de noyau : le matériel génétique (ADN) est libre dans le cytoplasme.
 - Sa taille varie entre 1 et 10 μm .
 - La présence d'un seul chromosome circulaire.
 - L'absence des organites sauf les ribosomes.
 - Son mode de reproduction : division simple par scissiparité (y'a pas de mitose et de méiose)
- (Fig. 05).

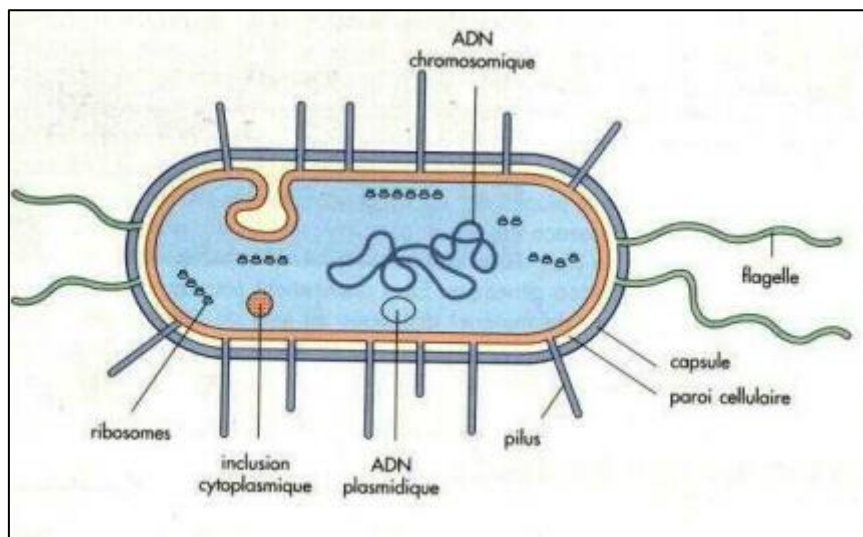


Figure 06 : Schéma d'une cellule bactérienne (Hart & Shears, 1997).

2.2. Techniques d'observation de la cellule bactérienne

Compte tenu de leur taille (de l'ordre du micron), les bactéries sont visualisées au microscope optique sans coloration (état frais) ou après coloration (état coloré).

a) Examen direct à l'état frais

Les méthodes fondées sur la technique de l'état frais correspondent à l'observation d'un matériel biologique ou d'une suspension bactérienne entre lame et lamelle à l'objectif 40, sans

fixation préalable du matériel par la chaleur ou l'alcool. C'est une méthode rapide consiste à observer principalement la forme et la mobilité des bactéries.

L'état frais est utilisé pour l'observation directe de cultures sur lame de moisissures permet la mise en évidence des caractères morphologiques particuliers (hyphes, mycélium, spores,...).

b) Coloration sur frottis

Observation des frottis séchés, fixés et colorés. Les frottis sont observés à l'immersion avec une goutte d'huile spéciale entre l'objectif et la préparation, cela permet d'obtenir une image plus nette.

Diverses techniques de coloration existent, mettant en évidence des affinités tinctoriales différentes telle la coloration **au bleu de méthylène** permettant de colorer toutes les bactéries (les ribosomes fixant le colorant).

Les colorations de **Gram et de Ziehl-Nielsen** permettent la reconnaissance des bactéries pathogènes. Il y'a d'autre coloration comme la coloration des inclusions de collagène et d'amidon, la coloration des cils, et la coloration des spores bactériennes, dans laquelle le colorant ne peut pénétrer qu'à après un traitement préalable destinier à perméabiliser les enveloppes (la coloration de MÖller).

2.3. Morphologie Bactérienne

Lorsqu'on observe des bactéries au microscope optique à partir de prélèvements pathologiques ou d'un milieu de culture, on reconnaît rapidement la forme des cellules, leurs dimensions, enfin les arrangements ou les groupements qu'elles constituent entre elles. Toutes ces informations définissent la morphologie bactérienne et constituent un des critères de reconnaissance et d'identification.

***La taille :** La taille des bactéries varie autant que leur forme. En moyenne, la taille se situe entre 1 et 10 μm . Les plus petits ont environ 0,3 μm de diamètre (quelques membres du genre *mycoplasma*), approximativement la taille des plus grands virus (les poxvirus). Les nanobactéries ont un diamètre de 0,2 μm de diamètre environ à moins 0,05 μm . certains bactéries sont vraiment grandes. Certains Spirochètes peuvent atteindre 500 μm de longueur.

***La forme :** Les formes des bactéries sont extrêmement diverses (**Fig. 07**). Nous en retiendrons trois principales :

- **La forme sphérique ou coccoïde** : Elle caractérise les cocci. Leur mode de division donne naissance à des groupements typiques, utiles à observer du point de vue diagnostique.

- **La forme cylindrique ou en bâtonnet** : On en distingue deux principales : Le bâtonnet droit ou bacille et le bâtonnet incurvé ou vibrion.

- **La première (bacille)** caractérise de nombreuses bactéries : les entérobactéries aux extrémités arrondies, les *Bacillus* beaucoup plus gros et nettement rectangulaires.
- **La deuxième forme cylindrique est celle du vibrion**, bacille incurvé, en virgule. Les vibrions ne constituent qu'un seul genre réunissant de nombreuses espèces aquatiques et quelques espèces pathogènes pour l'homme (*Vibrio cholerae*).

- **La forme spiralée ou hélicoïdale** : On la rencontre chez un petit groupe de microorganismes possédant une structure typique, un corps hélicoïdal et extrêmement allongé.

***L'Association cellulaire** : une espèce bactérienne peut apparaître sous forme de cellules isolées séparées ou en groupements caractéristiques variables selon les espèces : association par paires, en amas réguliers, en chaînette, par quatre (tétrades).

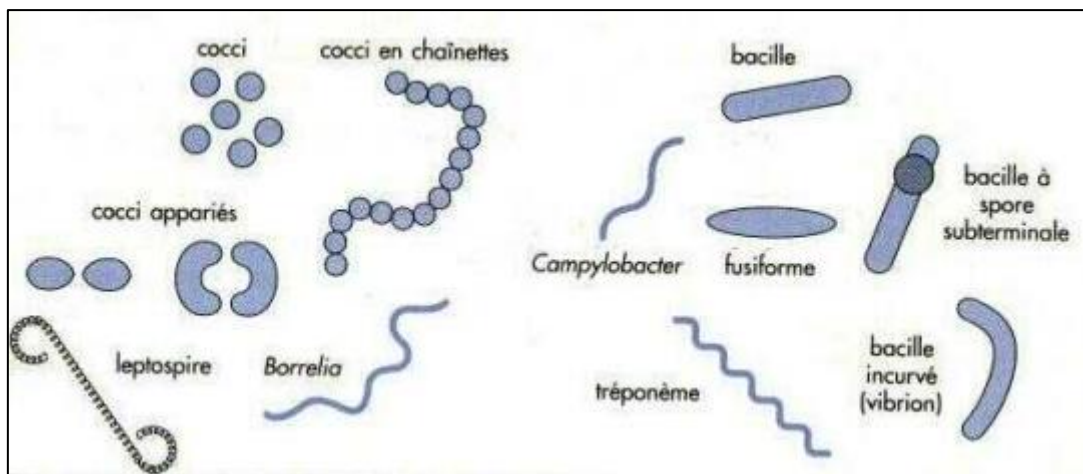


Figure 07 : Différentes formes et associations bactériennes (Hart & Shears, 1997).

2.4. Structure de la cellule bactérienne

Les bactéries sont des cellules procaryotes, leur ADN n'étant pas localisé dans un noyau. Beaucoup contiennent des structures circulaires d'ADN extra-chromosomique appelées plasmides. Il n'y a pas d'autre organelle dans le cytoplasme que les ribosomes, qui sont de plus petite taille que ceux des cellules eucaryotes. À l'exception des mycoplasmes, les bactéries sont entourées par une paroi complexe, différente selon que la bactérie est à Gram positif ou

négatif. De nombreuses bactéries possèdent des flagelles, des pili, ou une capsule à l'extérieur de la paroi.

Donc, Certaines structures sont présentes chez toutes les bactéries, ce sont les **éléments « constants »** ; d'autres sont retrouvés seulement chez certaines bactéries : ce sont les éléments **« inconstants »** ou **« facultatifs »** (Fig. 08).

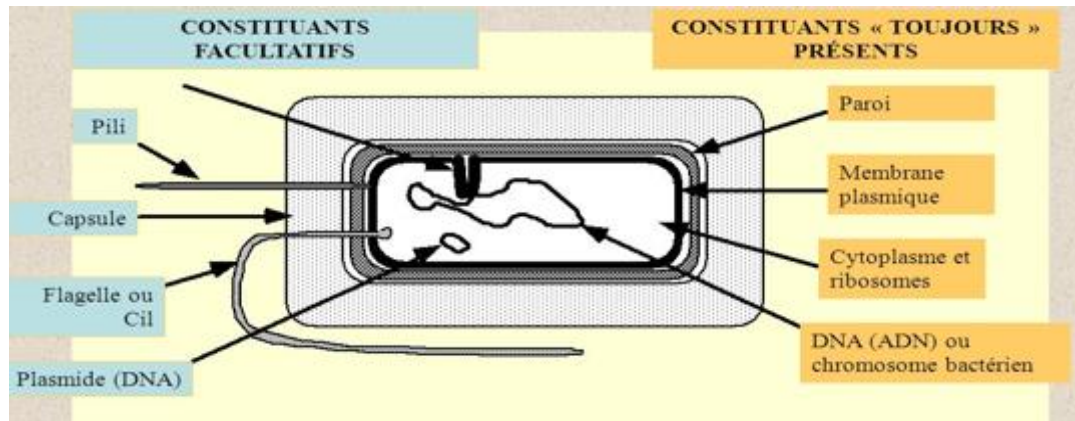


Figure 08 : Représentation schématique montrant les différentes structures bactériennes.

2.4.1. La paroi bactérienne

C'est une enveloppe caractéristique de la cellule procaryote. La paroi rigide est un véritable « exosquelette » qui confère à la cellule sa forme et assure l'intégrité de la bactérie. Elle représente environ 30 % du poids total de la bactérie. La partie commune de toutes les parois bactériennes est le peptidoglycane (ou muréine). Elle est mise en évidence par la coloration de Gram. Donc, la paroi permet la différenciation de deux grands types de bactéries : les bactéries **Gram positif** et **Gram négatif**.

2.4.1.1. Composition chimique de la paroi

L'un des constituants essentiels qui caractérisent les parois bactériennes est le peptidoglycane ou la muréine (mucopéptide). Il s'agit d'un hétéropolymère complexe formé de 3 éléments différents :

1. une structure composée d'une alternance de molécules de N-acétyl glucosamine et d'acide N-acétylmuramique.
2. des chaînes latérales peptidiques, composées de 4 acides aminés et attachées à l'acide N-acétylmuramique ;
3. un ensemble de ponts inter-peptidiques (Fig. 09).

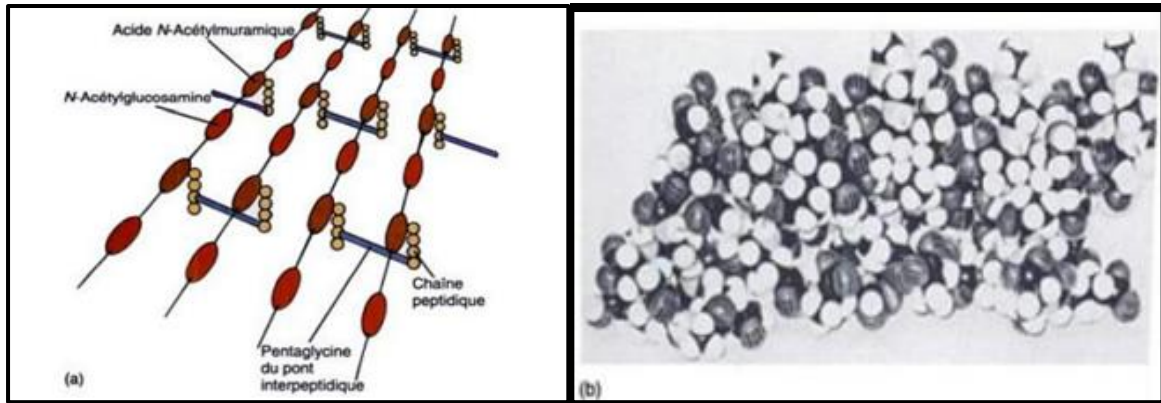


Figure 09 : a) La structure de peptidoglycane. b) un model dans l’espace de la muréine avec quatre sous-unités de peptidoglycane (Prescott *et al.*, 2003).

Chez les bactéries à Gram positif, la paroi est constituée presque exclusivement de la couche de peptidoglycane, à laquelle sont associés des polymères d'acide teichoïque. Les bactéries à Gram négatif ont une paroi plus complexe. La couche de peptidoglycane est plus fine que celle des Gram positif, et elle est entourée par une membrane externe composée de lipopolysaccharides et de lipoprotéines.

La partie lipopolysaccharidique de la paroi des Gram négatif comprend les molécules d'endotoxine (lipide A) qui contribuent au pouvoir pathogène bactérien (Fig. 10).

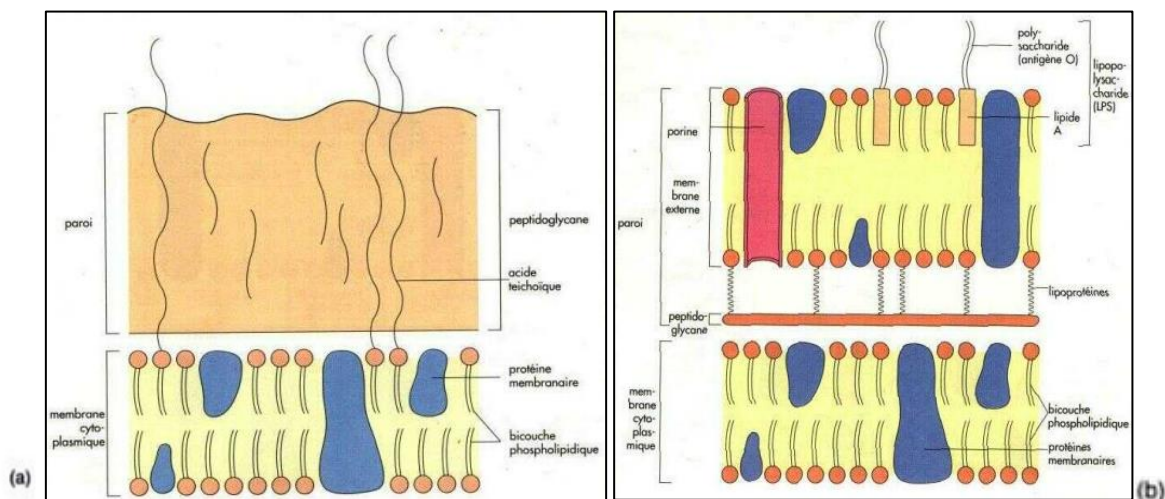


Figure 10 : a) Structure de la paroi des bactéries à Gram positif. b) Structure de la paroi des bactéries à Gram négatif (Hart & Shears, 1997).

2.4.1.2. La coloration de Gram

En 1884, le médecin danois, **Christian Gram** a fait la distinction entre deux types de bactéries: Les bactéries à Gram positif (Gram +) et les bactéries à Gram négatif (Gram -).

Ceci a été possible après avoir coloré un frottis bactérien comme suit :

- Recouvrir la lame de violet de gentiane : 1 minute puis rejeter le violet de gentiane ;
- Recouvrir de lugol : 1 minute puis rejeter le lugol;
- Décolorer à l'alcool, la lame étant tenue inclinée. La durée de décoloration à l'alcool est variable selon l'épaisseur du frottis. En pratique, la durée de décoloration est suffisante lorsque ce qui s'écoule en bas de la lame inclinée est devenu clair ;
- Stopper la décoloration par un nouveau lavage à l'eau ;
- Recouvrir la lame de fuchsine diluée, 30 secondes à 1 minute, puis laver à l'eau et sécher entre deux feuilles de papier filtre, puis à la chaleur ;
- Examiner à l'immersion. Les bactéries à Gram positif doivent apparaître colorées en violet et les bactéries à Gram négatif en rose (**Fig. 11**).

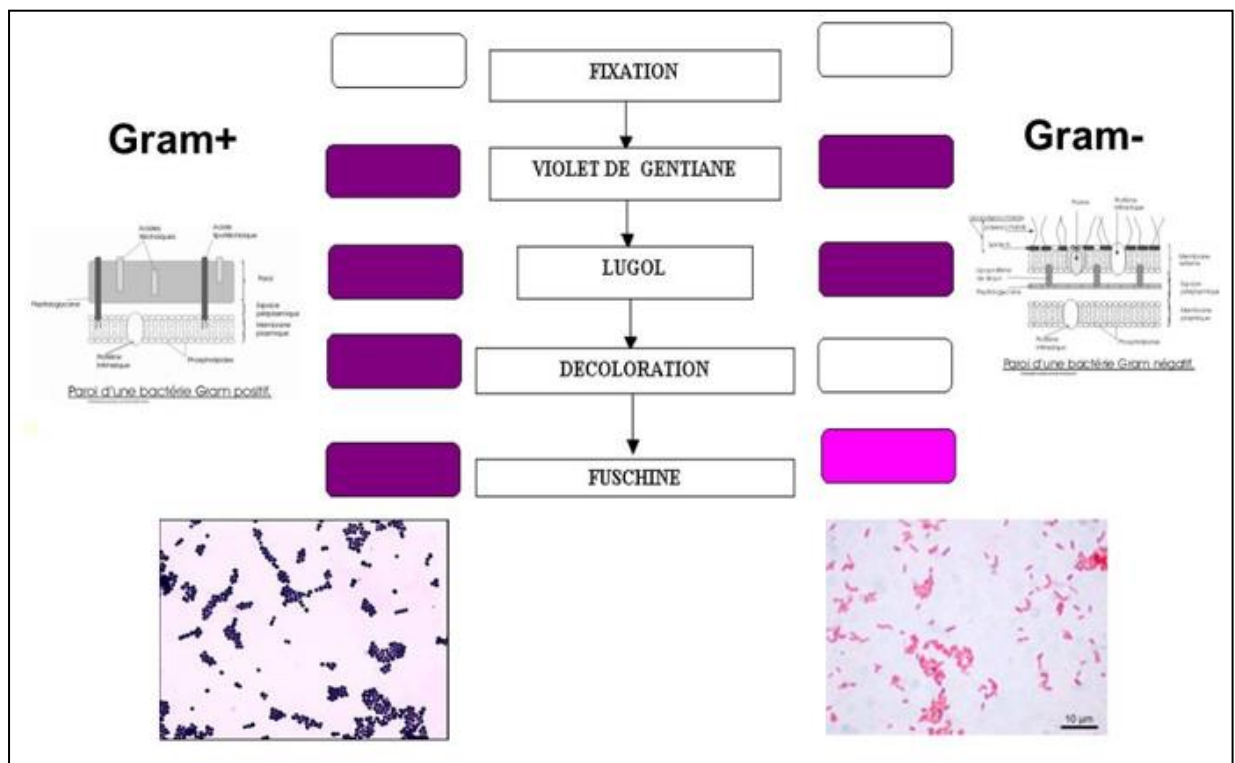


Figure 11 : Principe de la coloration de Gram, avec à gauche une bactérie à Gram positif et à droite une bactérie à Gram négatif (**Denis et al., 2011**).

2.4.1.3. Fonctions de la paroi

- * **La forme** : la paroi confère aux bactéries la forme, qui est un élément essentiel de leur identification. Sa rigidité et sa résistance sont dues à la présence du peptidoglycane.
- * **La protection** : la paroi cellulaire est nécessaire pour protéger la bactérie contre la destruction par la pression osmotique (car forte concentration en métabolites à l'intérieur de la cellule entraîne l'entrée de l'eau).
- * **Perméabilité** : La paroi laisse passer de petites molécules comme l'eau, les sels minéraux ou des métabolites simples. Par contre elle est plus ou moins perméable à certains solvants (exemple l'alcool).
- * **Un rôle immunologique** par ces propriétés antigéniques grâce au LPS et au peptidoglycane, qui jouent un rôle important dans la défense non spécifique contre l'infection (activation du complément).
- * **Permettre la fixation des bactériophages.** Ils reconnaissent des récepteurs localisés sur le peptidoglycane des Gram(+) ou la membrane externe des Gram(-). Cette propriété est utilisée pour l'identification de certaines bactéries : c'est la lysotypie.

2.4.2. La membrane cytoplasmique

La membrane plasmique entoure le cytoplasme de la cellule. Elle est le point principal de contact avec l'environnement cellulaire et est ainsi responsable des apports avec le monde extérieur.

2.4.2.1. Composition chimique et structure moléculaire

L'analyse chimique de la membrane plasmique révèle la présence de trois types de substances : les protéines, les lipides et les glucides avec des proportions de 60 à 70 % de protéines et 30 à 40 % de lipides.

La plupart des lipides de la membrane plasmique sont structurellement asymétriques avec un côté polaire et un côté non polaire (appelé Amphipathiques). Cette caractéristique permet aux lipides de former une double couche dont la surface externe est hydrophile tandis que les extrémités hydrophobes sont enfouies à l'intérieur, à l'abri de l'eau.

Les protéines existent sous de très nombreuses formes : protéines intrinsèques ou interne qui traversent complètement les deux feuilletts membranaires et les protéines extrinsèques ou périphériques qui apparaissent sur une de deux faces du double feuillet.

Les glucides (glucose, glucosamine,...etc), faiblement représentés, sont quantitativement des constituants mineurs.

La membrane plasmique bactérienne possède le même type de structure que celle d'une cellule eucaryote (bicouche phospholipidique) mais avec moins de glucides et dépourvue de stérols, comme le cholestérol, à l'exception des Mycoplasmes (**Fig. 12**).

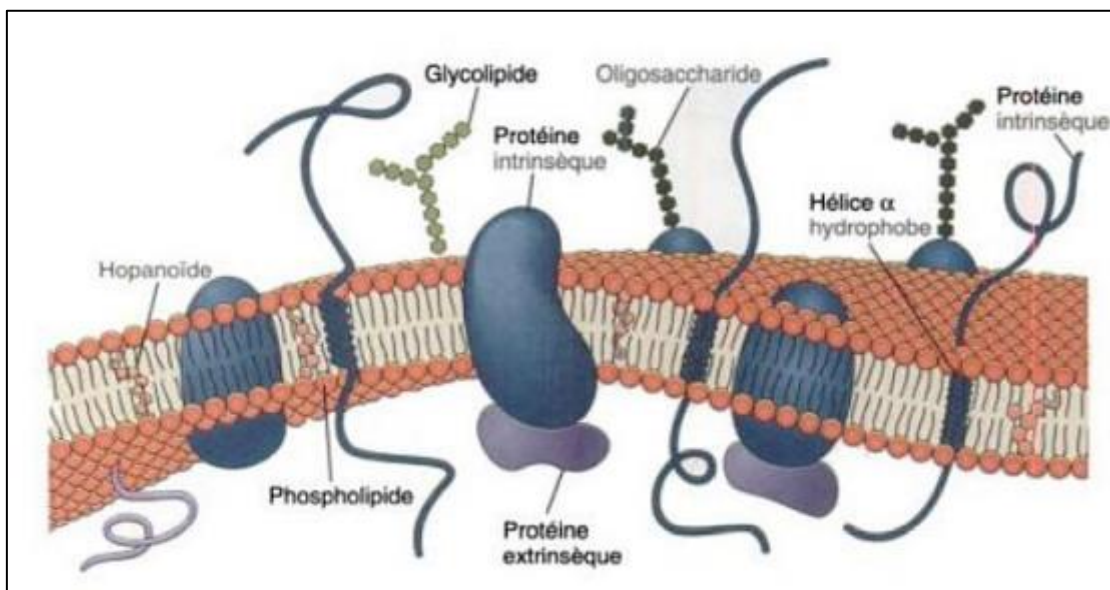


Figure 12 : La structure de la membrane plasmique d'une cellule bactérienne (**Prescott et al., 2003**).

2.4.2.2. Fonction de la membrane plasmique

La membrane plasmique assure plusieurs rôles dans la cellule bactérienne :

- Maintien le cytoplasme et le sépare du milieu extérieur.
- Sert de barrière perméable sélective (barrière semi-perméable) permettant le passage de molécules lipophiles et empêche le passage des molécules hydrophiles.
- Possède des systèmes de transport de beaucoup d'éléments incapables de traverser seuls la membrane (nutrition, rejet de déchets, sécrétion). On distingue 2 grands types de transport :

- **Le transport passif** : se fait dans le sens du gradient de concentration sans exigence d'énergie.
- **Le transport actif** : se fait en sens inverse du gradient de concentration des molécules, ce qui nécessite l'utilisation d'énergie généralement fournie sous forme d'ATP.

- Site de beaucoup de processus métaboliques (respiration, photosynthèse, synthèse lipidique et constituants de la paroi...)

- Site de fixation des flagelles.

2.4.3. Le cytoplasme

Le cytoplasme est un hydrogel colloïdal comprenant une phase dispersante constituée par une solution de sels minéraux et de composés solubles de natures lipoprotéiques, une phase dispersée formée de nucléoprotéines et des lipides. Son pH est situé entre 7 et 7,2. En dehors du matériel nucléaire, les principaux éléments constitutifs du cytoplasme sont : les ribosomes et les substances de réserves. Parfois, on trouve des vacuoles à gaz.

2.4.3.1. Les ribosomes

Les ribosomes sont de petites granulations sphériques, de 10 à 30nm de diamètre, présents en très grand nombre dans le cytoplasme bactérien (environ 18 000 chez *Escherichia coli*). Cependant, ce sont des éléments très complexes constitués de protéines et d'acide ribonucléique (ARN).

Les ribosomes bactériens comprennent deux sous-unités (30S, 50S). Ils interviennent dans la synthèse des protéines.

2.4.3.2. Les granulations ou substances de réserve

La bactérie peut accumuler des matériaux organiques ou inorganiques constituant généralement des réserves d'énergie. Lorsque ces substances atteignent une taille suffisante, elles forment des **granulations**, lesquelles sont visibles quelques fois au microscope.

En général, chaque groupe de bactéries synthétise une seule catégorie de substances de réserve qui forment des agrégats, parfois de grande taille. Cela peut être des glucides (amidon et glycogène), des lipides (poly-hydroxy-butyrates), du polyphosphate, et parfois des minéraux (fer, soufre) (**Fig. 13**).



Figure 13 : Substances de réserve (Meyer *et al.*, 2004).

2.4.3.3. Vacuoles à gaz

Ces vésicules remplies de gaz sont rencontrées chez les membres de trois principaux groupes procaryotes photosynthétiques : algues bleu-vert, bactéries pourpre et bactéries vertes.

En microscope électronique, elles apparaissent de forme cylindrique, entourées d'une membrane à un seul feuillet d'environ 5 nm d'épaisseur.

Les vacuoles à gaz permettent à ces microorganismes d'habitat aquatique de flotter et de remonter à la surface de l'eau.

2.4.4. Le chromosome bactérien

2.4.4.1. Morphologie et structure

Le chromosome bactérien est constitué d'un filament unique, continu et circulaire, formé d'une double chaîne d'ADN. Sa masse molaire est de l'ordre de $3 \cdot 10^9$ daltons et le nombre de paires de bases est de $5 \cdot 10^6$ environ échelonnés le long de double hélice.

La majorité des bactéries possèdent un chromosome unique, circulaire. Par contre, *Vibrio cholerae* en possède deux, un grand de 2,9 millions de bases et un petit de 1 million de bases. Celui d'*Escherichia coli* est empaqueté et se trouve dans une région qu'on appelle nucléoïde ou corps nucléaire. Il mesure $1400 \mu\text{m}$ et 300 \AA d'épaisseur.

2.4.4.2. Composition

L'ADN ou acide désoxyribonucléique est un polymère de poids moléculaire élevé, composé d'unités appelées nucléotides. Un nucléotide est composé d'un phosphate, d'un sucre pentose (désoxyribose) et d'une base purique (A ou G) ou pyrimidique (C, T) (**Fig. 14**). Il y a autant de « A que de T » et autant de « C que G » par contre le rapport (A+T)/G+C) mieux connu sous le nom de **coefficient de Chargaff** varie selon les espèces. On l'exprime en GC%. 50% chez *E.coli* 60% chez *Pseudomonas*, 25 à 45% chez *Clostridium*.

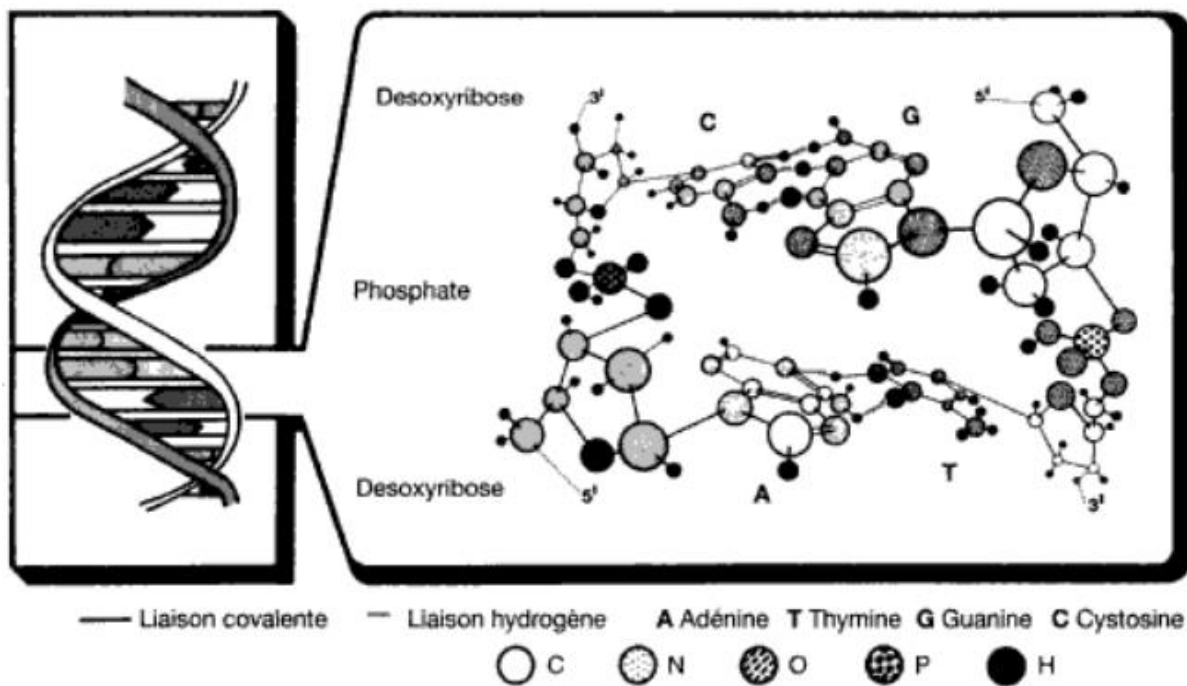


Figure 14 : Structure et composition de l'ADN (Meyer *et al.*, 2004).

2.4.4.3. Rôle de chromosome

Le chromosome bactérien est doué de propriétés génétiques fondamentales puisqu'il est le vecteur des caractères héréditaires de la bactérie. Le message génétique de l'ADN est transmis sous forme d'ARN messager (transcription) puis exprimé en séquences polypeptidiques (traduction) qui formeront les protéines de structure ou les enzymes.

2.4.4.4. Réplication chimique

L'ADN se réplique, c'est-à-dire qu'il se reproduit lui-même. La séquence sur une chaîne détermine automatiquement la séquence sur l'autre chaîne.

-La réplication est semi-conservative : Chaque chaîne parentale reste associée à la nouvelle chaîne pour qu'elle serve de matrice.

-La réplication est bidirectionnelle : Des expérimentations ont été conduites par **J. Cairns** avec des cellules d'*E. Coli* dont le DNA était rendu radioactif par incorporation de thymidine tritiée et visualisé par autoradiographie. Il est apparu que la réplication débutait toujours au niveau d'un point unique, dénommé origine, et qu'une région limitée, dénommée fourche de réplication en raison de sa forme en Y, se déplaçait sur la double hélice parentale, les deux brins séparés auxquels elle donnait naissance servant de matrice pour la synthèse du nouveau DNA. Cette dernière s'effectuait toujours dans la direction 5' à 3', la matrice étant lue dans la direction opposée 3' à 5'.

Dans ces conditions, il se posait alors la question de savoir comment les deux nouveaux brins pouvaient être formés simultanément. La réponse a été apportée par **Okazaki** qui a montré qu'un des nouveaux brins était synthétisé sous la forme de fragments de quelques centaines de nucléotides, dénommés depuis fragments d'Okazaki. Ainsi, un brin dit avancé ou direct (*leadingstrand*) était synthétisé de façon continue dans la même direction que le déplacement de la fourche, tandis que l'autre brin, dit retardé (*laggingstrand*), l'était de façon discontinue dans la direction opposée à celle du déplacement de la fourche. La fourche de réplication avait donc une structure asymétrique (**Fig. 15**).

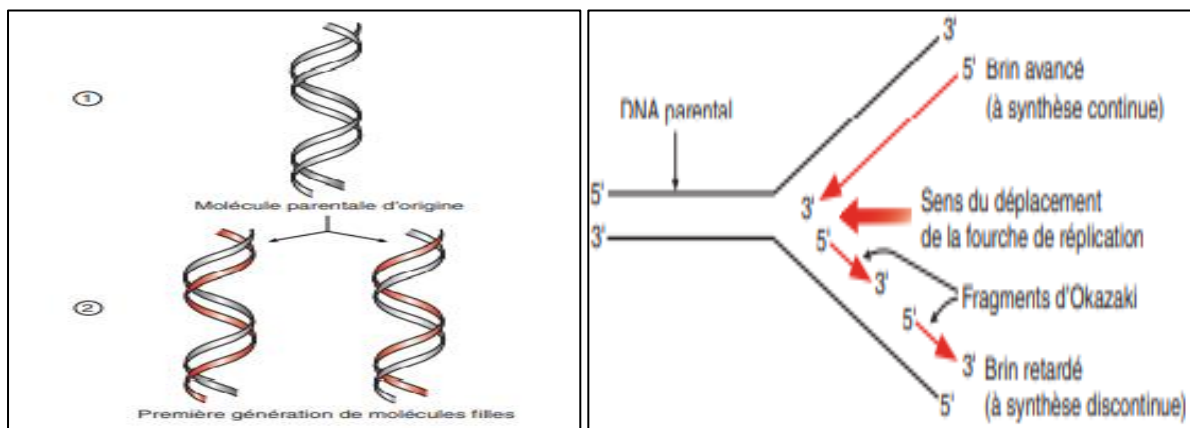


Figure 15 : la réplication d'ADN (Meyer *et al.*, 2004).

2.4.5. Les plasmides

La cellule bactérienne peut contenir des éléments génétiques extra-chromosomiques capables d'autoreproduction que **Lederberg** en 1952, proposa d'appeler les plasmides pour marquer leur caractère indépendant par rapport aux gènes porté par le chromosome. Les plasmides permettent à la bactérie une meilleure adaptation à son environnement.

2.4.5.1. Structure

Ce sont des molécules d'ADN bicaténaire, généralement circulaires, mais il en existe des linéaires. Parfois ils s'intègrent dans le chromosome et on les appelle des épisomes.

Les plasmides sont généralement de petite taille (1 kb à 400 kb), 1/100 du chromosome bactérien. Ils portent très peu de gènes, moins de 30 (4.2 MD présente chez *E. Coli*) (**Fig. 16**).



Figure 16 : plasmide (x10000) (Meyer *et al.*, 2004).

2.4.5.2. Réplication

Le plasmide peut se répliquer selon deux modèles : **La réplication de type Thêta θ** , uni ou bidirectionnelle, à partir d'une origine de réplication en utilisant l'équipement enzymatique de la bactérie hôte (**Fig. 17**).

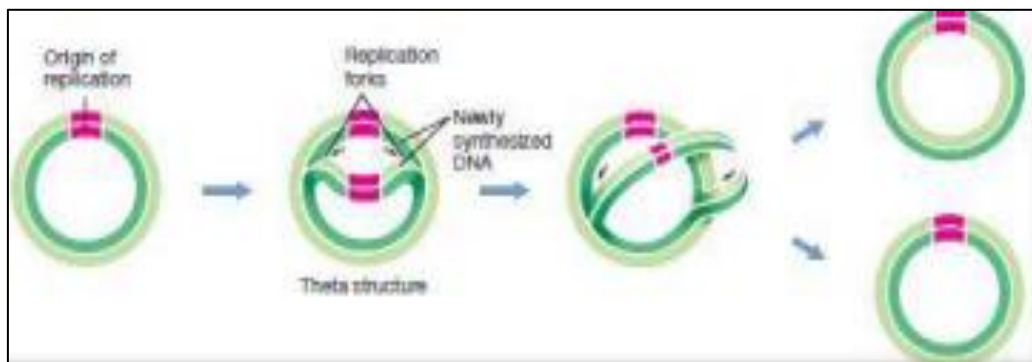


Figure 17 : Réplication de Type Thêta θ (Busch, 1971).

Une réplication de type « **Rolling cercle** » ou cercle déroulant. Un brin est coupé par une nucléase. Ce brin va se dérouler autour de l'autre brin dans le sens 5'P et la bactérie va synthétiser un brin complémentaire simultanément aux deux brins parents (**Fig. 18**).

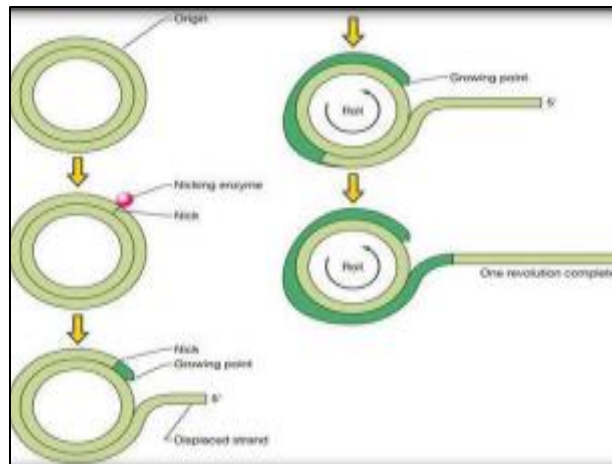


Figure 18 : Réplication de type « Rolling cercle » (Busch, 1971).

2.4.5.3. Le transfert plasmidique

Les bactéries possèdent la capacité d'acquérir de l'ADN d'autres bactéries par **le transfert génétique** qui s'effectue par trois mécanismes : **la transformation** dans laquelle la bactérie absorbe l'ADN libre présent dans l'environnement ; **la conjugaison** où l'ADN est transféré via les pili sexuels d'une bactérie et **la transduction** où un bactériophage emporte de l'ADN bactérien d'une cellule à une autre.

- A) La transformation** : La transformation est l'absorption par la cellule d'une molécule ou d'un fragment d'ADN nu, présent dans le milieu, et son incorporation dans le chromosome receveur sous une forme héréditairement stable. Dans la transformation naturelle, l'ADN vient d'une bactérie donneuse. Ce processus est aléatoire et toute portion du génome peut être transférée entre bactéries.
- B) La conjugaison** : La conjugaison c'est un mécanisme de transfert d'ADN par l'intermédiaire d'un plasmide. La majorité des plasmides, mais pas tous, sont transférables. Les bactéries qui contiennent ces plasmides transférables sont appelées bactéries donneuses et qui reçoivent le plasmide sont appelées réceptrices. Le transfert par la conjugaison décrit pour les plasmides F ou par les grands plasmides R nécessite que le plasmide contienne toute l'information nécessaire à son propre transfert on s'appelle plasmides auto-transférables, car ils se transmettent d'une cellule à l'autre en utilisant intégralement leur propre machinerie de transfert.
- C) La transduction** : La transduction est le transfert de gènes bactériens par l'intermédiaire de virus. Les gènes bactériens sont incorporés dans une capsid de

phage, suite à des erreurs commises durant le cycle biologique du virus. Le virus qui contient ces gènes les injecte alors dans une autre bactérie, complétant le transfert.

2.4.5.4. Propriétés

- a) **Résistance aux antibiotiques** (90% plasmidique) les 10% restant (chromosomique).
- b) **Résistance aux métaux lourds** (mercure, sels de cadmium, bismuth, de plomb, d'antimoine et arsénites).
- c) **Production de substances à rôle pathogène.** L'exemple le plus étudié est rencontré chez les *Escherichia coli*, responsables de diarrhées.
- d) **Le pouvoir pathogène** dans les trois cas est contrôlé par une information génétique portée par un plasmide, codant pour des entérotoxines et des facteurs de colonisation permettant l'attachement des bactéries à la surface de l'intestin (épithélium intestinal).
- e) **Production de bactériocines.**
- f) **Caractères métaboliques :** un grand nombre de caractères biochimiques des bactéries sont d'origines plasmidiques.

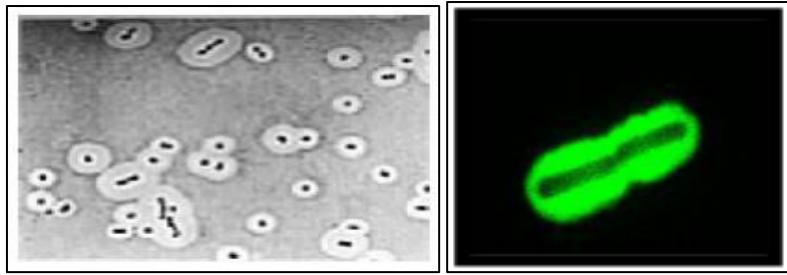
2.4.6. La capsule

2.4.6.1. Morphologie

De nombreuses bactéries élaborent des substances organiques visqueuses qui entourent leur paroi d'une couche plus ou moins compacte. Lorsque cette couche gélatino-musqueuse présente une surface externe libre et nettement définie, on a l'habitude, avec **Tomcsik**, de l'appeler **la capsule**.

Pour mettre en évidence la capsule chez les bactéries, on procède habituellement à **la coloration de l'encre de Chine** : sur le fond noir de la préparation constituée par un mélange d'encre de Chine et suspension microbienne, la capsule apparaît comme un halo brillant, entourant le corps bactérien.

Un deuxième type de technique est **la technique immunochimique**, dans lequel des anticorps anti-capsulaires se fixent sur les antigènes capsulaires. Le complexe Ag-Ac précipite et augmente l'épaisseur de la capsule qui devient visible au microscope. Cette réaction est appelée : Réaction de gonflement de la capsule de Neufeld (**Fig. 19**).



Coloration à l'encre de chine Techniques immunochimiques

Figure 19 : Mise en évidence de la capsule (**Carpenter, 1967**).

2.4.6.2. Composition chimique

La nature de constituants capsulaires est fréquemment polyholosidique chez de nombreuses bactéries à Gram négatif : *K.pneumoneae*, *E.Coli* type A, *H.influenzaeae*. Pour quelques bacilles à Gram positif : *B. anthracis*, *B. megatherium* et *B. subtilis*, les substances capsulaires sont des polypeptides constitués d'un seule type d'acide aminé et d'acide D-glutamique.

2.4.6.3. Fonctions de la capsule

Les bactéries peuvent vivre sans la capsule, mais cette dernière lui confère des avantages grâce à ses rôles :

- **De protection** : contre les ultraviolets, la dessiccation, les agents physiques et chimiques.
- **De virulence (la pathogénicité)** : Elle s'oppose à la phagocytose en diminuant l'adhésion de bactéries aux macrophages. Elle exerce un chimiotactisme négatif sur les leucocytes.
- **Antigéniques** : les Ag capsulaires sont responsables de la spécificité sérologique (Ag K). A partir de cette propriété, une classification peut être établie (exemple : 70 types sérologiques différents chez *Streptococcus pneumoniae*).

2.4.7. Les cils et flagelles

La plupart des bactéries mobiles se déplacent grâce à **des flagelles**, appendices locomoteurs qui s'étendent à l'extérieur de la membrane plasmique et de la paroi cellulaire. Ce sont des structures minces, d'environ 20 nm de diamètre et 15 à 20 µm de long.

Les flagelles sont tellement fins qu'ils ne peuvent pas être observés au microscope à fond noir, mais peuvent être colorés par des techniques spéciales qui augmentent leur épaisseur (coloration de Rhodes).

-Technique de la coloration de Rhodes : Préparation du frottis (utiliser une lame neuve) : laisse couler, sur lame inclinée à 45° au-dessus de la cuve à coloration (mettre de l'eau de Javel dans la cuve), 2 gouttes d'une culture en bouillon (culture jeune : 6 à 12 heures) de la souche à étudier. Laisser sécher. Recouvrir la préparation de mordant de Rhodes (préparé extemporanément) pendant 3 mn. Laver soigneusement à l'eau distillée. Recouvrir de nitrate d'argent ammoniacal (préparé extemporanément), chauffé presque à ébullition, et laisser agir 3 à 5 mn. Rincer à l'eau distillée. Sécher et observer à l'immersion.

2.4.7.1. Structure

La microscopie électronique à transmission a permis de montrer que le flagelle bactérien est composé de trois parties à savoir ; la partie la plus longue et la plus évidente, **le filament** qui s'étend depuis la surface cellulaire, **un corps basal** enfoui dans la cellule, et un segment court et courbe, **le crochet** qui relie le filament au corps basal. Le filament est un cylindre creux constitué d'une seule protéine appelé **flagelline** (fig. 20).

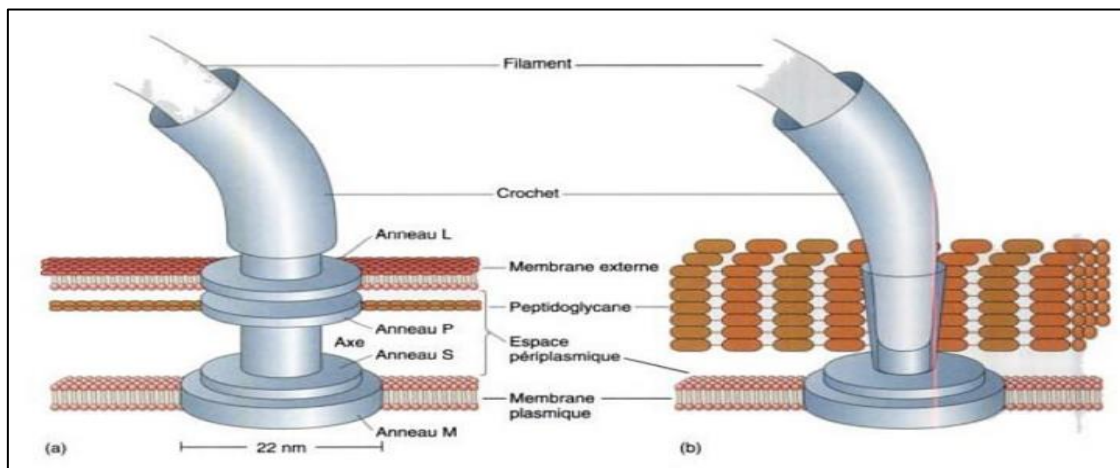


Figure 20 : L'ultra structure d'un flagelle bactérien **a)** Gram négatif **b)** Gram positif (Prescott *et al.*, 2003).

Dans **le système polaire**, le ou les cils sont insérés à une ou aux deux extrémités de la cellule. La cellule est :

- **Monotriche** si l'on ne rencontre qu'un seul flagelle à l'une de ses extrémités

- **Amphitriche** lorsqu'un flagelle émerge à chacun des pôles.

- **Lophotriche** lorsqu'une touffe de cils apparaît à l'une ou aux deux extrémités.

Dans le **système péritriche**, la bactérie porte de très nombreux cils insérés sur tout le pourtour de la cellule.

2.4.7.2. Fonctions du flagelle

-Le rôle principal des flagelles est **la mobilité**.

-Les flagelles possèdent d'autres rôles autres que la mobilité, tel que **le chimiotactisme**. Le système du chimiotactisme permet à la bactérie de sentir le milieu environnemental (attractif ou répulsif).

-Enfin, **un rôle antigénique** est attribué aux flagelles grâce aux flagellines qui sont antigéniques. Les antigènes flagellaires (Ag H) déterminent différents sérotypes (exemple : sérotypage des *Salmonella*). En présence de l'anticorps correspondant à leur Ag H, les bactéries agglutinent et les bactéries s'immobilisent. La spécificité antigénique repose sur le nombre et la séquence des acides aminés de la flagelline.

-**Fixation des bactériophages** : Les flagelles sont le lieu de fixation de certains bactériophages.

2.4.8. Pili ou Fimbriae

Beaucoup de bactéries Gram négatives possèdent de courts appendices fins comme des cheveux, qui ne sont pas impliqués dans le mouvement et plus minces que les flagelles. On les appelle **Pili ou fimbriae**.

2.4.8.1. Structure

Bien qu'une cellule puisse être couverte de 1000 fimbriae, on ne les voit qu'au microscope électronique à cause de leurs petites tailles. Ils apparaissent comme de minces tubes composés de sous unités protéiques arrangés en hélices et ils ont à peu près 3 à 10 nm de diamètre sur plusieurs μm de long. Il s'agit de la polymérisation d'une sous-unité polypeptidique (piline) assemblée à des polypeptides mineurs comme l'adhésine.

2.4.8.2. Fonction

On en distingue deux catégories, de morphologie et de fonction distincts : Pili communs et Pili sexuels.

-Pili communs : Ils sont ténues, courts, rigides et donc cassants et sont distribués autour de la bactérie (jusqu'à plusieurs centaines). Leur présence est en rapport avec les propriétés hémagglutinantes de la bactérie.

Ils peuvent attacher spécifiquement des bactéries à la surface de cellules eucaryotes, phase essentielle dans certains pouvoirs pathogènes (*Escherichia coli* au cours de certaines infections urinaires, *Vibrio cholerae* sur les entérocytes).

-Pili sexuel : sont des appendices similaires qui se terminent par un renflement. Ils sont souvent plus épais que les fimbriae (peuvent atteindre 20 μm de diamètre) mais leur nombre est plus faible (varie de 1 à 4). Ils jouent un rôle essentiel dans **la conjugaison bactérienne** en intervenant dans la reconnaissance entre bactéries mâles qui sont les seules à posséder et bactéries femelles. Ainsi, grâce à l'extrémité renflée de ces pili sexuels, ils peuvent fixer certains phages qui injectent leur matériel génétique par le canal de pili.

2.4.9. La spore

Certaines bactéries ont le pouvoir de se transformer en petites unités ovales ou sphériques douées d'une résistance extraordinairement élevée lorsque le milieu s'épuise en éléments nutritifs ou lorsque les conditions physico-chimiques extérieures changent. On les appelle **spore** ou **endospore** puisque leur formation est intracellulaire.

Les endospores se développent dans les cellules végétatives de quelques genres bactériens notamment *Bacillus* et *Clostridium*. Ce sont toutes des bactéries Gram (+). D'autres genres sont capables également de sporuler.

2.4.9.1. Morphologie

Les spores sont de petites unités **ovales** ou **sphériques**. Elles peuvent déformer ou non le corps bactérien. Leur position dans la cellule est variable : centrale, terminale, subterminales (**Fig. 21**). Elles servent également dans l'identification bactérienne. La spore peut-être libre ou non. La recherche de tous ces caractères se fait dans un but taxonomique.

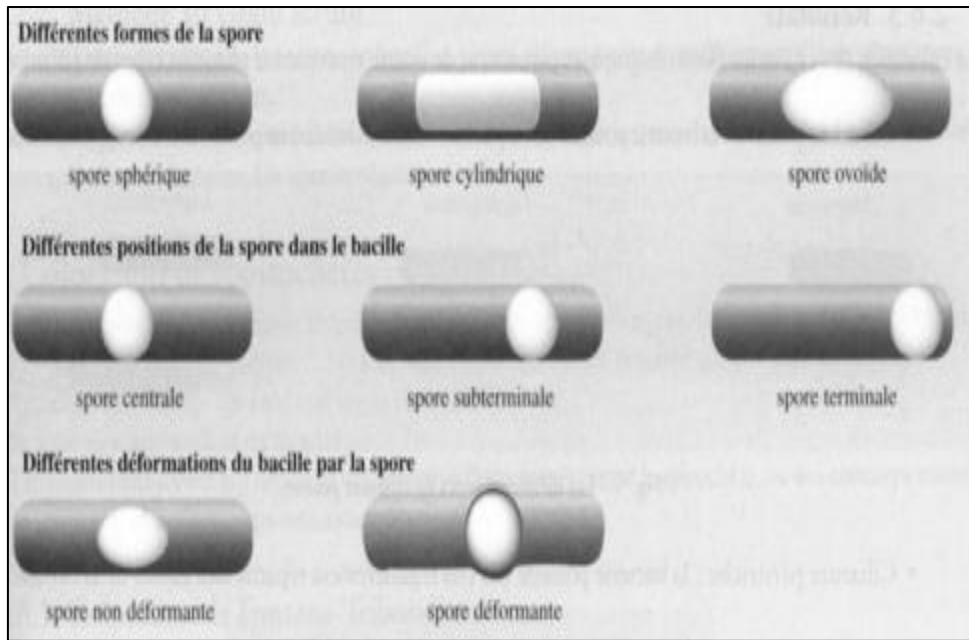


Figure 21 : Les différentes formes et positions de la spore bactérienne (Frobisher, 1969).

2.4.9.2. Structure de la spore

La spore possède une paroi et une membrane plasmique identiques à celle de la cellule végétative. L'enveloppe la plus externe est mince, appelée **exosporium**. Sous l'exosporium, on trouve le manteau ou **la tunique**, composée de plusieurs feuillets protéiques. **Le cortex** est localisé juste sous la tunique. Enfin **le protoplaste** (cytoplasme) ou cœur de la spore, contient les ribosomes, le nucléoïde et des enzymes inactives (Fig. 22).

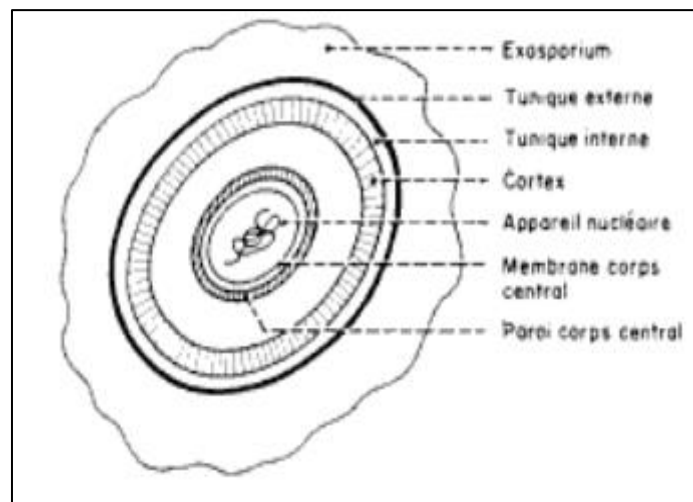


Figure 22 : Structure de la spore bactérienne (Meyer *et al.*, 2004).

2.4.9.3. Phénomène de sporulation

Le phénomène de sporulation est déclenché par l'épuisement des ressources nutritives dans un contexte physico-chimiques qui peut être variable selon les espèces : absence d'oxygène pour les *Clostridium*, présence d'oxygène au contraire pour *B. anthracis*. Le processus de sporulation débute à la fin de la phase exponentielle et se déroule en six étapes :

-Stade I : formation du filament axial ; la division nucléaire n'étant pas suivie d'une division cellulaire, les deux génomes fusionnent donnant un filament chromatique axial.

-Stade II : les deux génomes se séparent et en même temps la membrane cytoplasmique s'invagine près d'un pôle de la cellule pour former un septum de sporulation qui partage la cellule en deux parties inégales. Ce septum va envelopper le cytoplasme de la plus petite partie pour former une pré-spore caractéristique.

-Stade III : Engloutissement de pré-spore.

-Stade IV : Entre les deux membranes limitant le pré-spore, se forme la paroi sporale puis apparaît rapidement le cortex.

-Stades V and VI : Apparition des tunique et développement de l'exosporium.

-Stade VII : la cellule végétative se lyse et libère la spore.

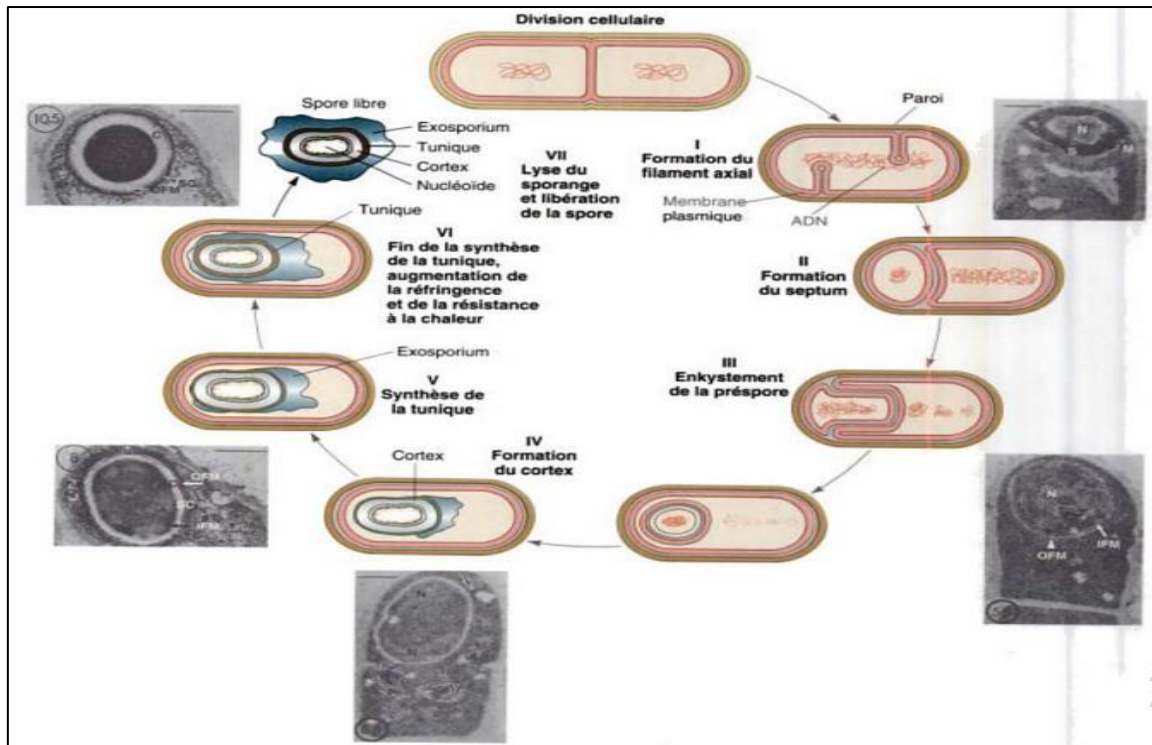


Figure 23 : Le cycle sporale (Prescott *et al.*, 2003).

2.4.9.4. Propriétés

La spore possède de nouvelles propriétés par rapport à la cellule végétative :

-La thermo résistance : La spore résiste en général à des températures de 70-80°C pendant 10 minutes, parfois plus. Cette propriété est due à la présence de l'acide dipicolinique, la déshydratation de la spore et aux protéines « SASP » (petites protéines acides et solubles) pouvant se fixer à l'ADN.

-Résistance aux agents physiques et chimiques : La spore résiste aux rayons Ultraviolets, aux rayons gamma (Calcium, et SASP). Aux antiseptiques, désinfectants, antibiotiques (la tunique).

-Synthèse d'antibiotiques : Certaines bactéries synthétisent des antibiotiques au début de la phase de sporulation. Exemple : *Bacillus licheniformis* synthétise ainsi la Bacitracin ; *Bacillus polymyxa* la polymyxine. Mais aussi des toxines (entérotoxines de *Clostridium perfringens*) ou des substances à activité bio-pesticide (toxines qui tue des insectes).

2.4.9.5. Germination

Lorsque la spore est placée dans des conditions favorables de croissance, elle subit une série de transformations progressives et devient finalement une cellule végétative. Ce processus appelé : **la germination**. Elle comprend trois stades :

a) L'Activation

Correspondant à une lésion des enveloppes sporales par des agents physiques (choc thermique) ou chimiques (acides, lysozyme) ou mécaniques (abrasion, choc). L'activation thermique est particulièrement bien connue au cours de la tyndallisation qui consiste à chauffer 3 fois le produit à stériliser : 30 min à 60°C (destruction des formes végétatives et induction de la germination d'éventuelles spores), le deuxième chauffage à 60°C et pendant 30 minutes, tue les spores issues de la germination et induit la germination des spores résiduelles. Le troisième chauffage dans les mêmes conditions, détruit les dernières formes végétatives.

b) L'initiation

Début en présence de conditions favorables d'hydratation et de métabolites effecteurs (alanine, magnésium, adénosine) qui pénètrent à travers les enveloppes endommagées. Des enzymes hydrolytiques dégradent les constituants de la spore ; il y a libération du dipicolinate de calcium. Le cortex ainsi détruit, la spore s'imbibe d'eau et gonfle.

c) L'excroissance

C'est un gonflement visible qui résulte de la réhydratation, par osmose, de la spore et de la synthèse de nouvelles molécules de protéines, d'ADN, d'ARN et autres. La cellule végétative peut s'engager dans un processus de croissance, si les conditions nutritionnelles et physico chimiques du milieu sont favorables.

Chapitre 3: Classification bactérienne.

- Introduction

La systématique est la science des classifications des organismes vivants, en classes et en groupes distincts au travers de leurs ressemblances, de leurs différences et des relations qui existent entre eux. Elle regroupe trois disciplines différentes : la classification, la nomenclature et l'identification.

- La classification

La science des lois de la classification, et en particulier de la classification des formes de vie, s'appelle **taxinomie** (*taxi*= arrangement, ordre ; *nomis* = lois). On dit également taxonomie.

La classification ou taxonomie a pour objet de classer les êtres vivants de façon hiérarchisée au sein de groupes appelés taxons ou phylons.

La taxinomie microbienne est **en perpétuelle évolution**. Chaque année, de nouvelles espèces sont découvertes. A l'heure actuelle, on connaît à peine 10 à 15% des micro-organismes existant. Le reste est à découvrir. Ce constat est dû à notre incapacité de les isoler et de les cultiver. L'obtention d'une culture pure est nécessaire pour toute étude taxinomique au sens large, ou plus simplement pour toute identification d'un agent infectieux.

La classification microbienne est l'étude de la diversité des micro-organismes et des relations susceptibles d'exister entre eux. Elle est généralement prise comme synonyme de systématique ou du biosystématique. Donc toute étude de la nature des organismes, quand le gain de connaissance est utilisé en taxinomie, fait partie de la systématique. Ainsi, la systématique englobe des disciplines comme la morphologie, l'écologie, l'épidémiologie, la biochimie, la biologie moléculaire et la physiologie.

-La nomenclature : est l'ensemble des règles qui permettent de donner un nom stable à chaque taxon et de réglementer la façon de faire (code international de nomenclature des bactéries). On distingue deux catégories de noms : **Les noms informels, noms spécialisés et les noms scientifiques des taxons**.

Par exemple : **Colibacille** = nom informel - *E.coli* O157, nom spécialisé. On parlera de l'espèce *E. coli* du genre *Escherichia* de la famille des Enterobacteriaceae. Les noms scientifiques sont des mots latins.

Règles de formation des noms : On utilise le **système binomial** du botaniste suédois **Carl Von Linné**.

La première partie du nom est le nom du Genre, la seconde partie est celui de l'espèce.

Le genre : écrit en Italique. Avec sa première lettre en majuscule. Après sa citation le nom du genre est abrégé à sa première lettre.

L'espèce : écrite en Italique (ou souligné dans les livres et manuscrits). Avec sa première lettre en minuscule.

La famille : Le nom est fondé sur un genre valide, il est féminin, pluriel et se termine par –aceae.

Les principaux taxons par ordre décroissant (hiérarchie taxinomique)

Domaine : Bacteria

Règne : non défini

Phylum : Proteobacteria

Classe : Gammaproteobacteria

Ordre : Enterobacteriales

Famille : Enterobacteriaceae

Genre : *Escherichia* (ensemble d'espèces)

Espèce : *Escherichia coli*, *E. coli* (ensemble de souches).

-**L'identification** permet d'intégrer des souches bactériennes inconnues à l'un des taxons, préalablement définis sur la base de la comparaison de leurs caractères spécifiques respectifs. Ceci pour mieux les utiliser ou les exploiter (espèces bénéfiques) ou bien pour mieux s'en protéger et de les contrôler (espèces pathogènes).

« Il ne faut pas confondre classification et identification des micro-organismes. Une étude de classification permet de sélectionner une liste de caractéristique et une approche qui facilitera l'identification. Les techniques d'identification sont plus simples et rapide à faire au laboratoire, comparées aux méthodes de classification ». Plusieurs méthodes ont été développées pour la classification et l'identification des micro-organismes. On distingue, les méthodes phénotypiques et les méthodes génotypiques.

3.1. Classification phénotypique

Depuis la classification proposée par **Cohn** en 1872 et jusqu'au début des années soixante, toute la taxonomie bactérienne reposait sur une classification phénétique.

La classification phénétique (ou phénotypique) utilise un nombre de caractères considérés comme importants : Observations macroscopiques, microscopiques et caractères tinctoriaux : Descriptions des colonies (forme, taille, couleur, odeur) ; la morphologie des cellules (bacille, coque) ; leurs arrangements. Les colorations (Gram, bleu méthylène, acido-alcool-résistante). Observation de la mobilité à l'état frais. On peut également rechercher la présence d'endospores, la croissance aérobie, anaérobie.

Les caractères morphologiques sont utiles pour l'identification, mais ne peuvent pas démontrer à eux seuls les relations phylogénétiques. A cet effet, plusieurs tests sont préconisés :

-Les Tests métaboliques : Très importants, ils peuvent distinguer des bactéries très apparentées. On cherche la présence d'enzymes (oxydase, catalase), la dégradation de l'urée, de l'esculine. La transformation du lactose et la production de gaz, l'utilisation de différents sucres comme source de carbone, l'utilisation du citrate, la production d'acétoïne.

Ces techniques ont été miniaturisées dans des galeries spécialisées (API), on peut faire 20 tests sur une même galerie spécifique des entérobactéries (**Fig. 24**).



Figure 24 : Tests métaboliques en mini galerie API (**Guyon, 1961**).

-La méthode sérologique : Le sérodiagnostic et le stéréotypage est basé sur la réaction spécifique antigène – anticorps. Cette méthode permet de différencier des espèces et même des souches au sein d'une même espèce. Les antigènes ciblés sont les Ag O chez les Gram négatives, les Ag H flagellaires et les Ag K capsulaires.

-Les tests d'inhibition : On évalue la croissance des micro-organismes sur des milieux sélectifs, en présence d'antibiotiques (antibiogramme).

-La chimio-taxonomie : On détermine le profil des acides gras des parois. Le Profil des protéines totales par électrophorèse (séparation selon le pHi et le poids moléculaire).

-La Lysotypie : Infection par des bactériophages et formation de plages de lyses.

3.2. Classification génétique ou phylogénique

L'information génétique de la bactérie est portée par des génophores nucléaires et plasmidiques que nous désignons sous le nom de génome. Ces dernières années la classification des bactéries est basée sur la structure de l'ADN qui s'exprime par le *coefficient de Chargaff* qui représente le pourcentage de Guanine et Cytosine en mole dans la molécule d'ADN.

Les critères recherchés sont :

1. La taille du génome.
2. La composition des bases d'ADN sous la forme de pourcentage de G+C (GC%).
3. Le taux d'hybridation ADN/ADN.
4. La séquence de l'ADN qui code pour l'ARN ribosomal 16 S.

3.2.1. La taille du génome

Selon les espèces, la taille du génome est variable. Par exemple chez les bactéries phototrophes, le génome est très réduit.

3.2.2. Composition en base d'ADN (*Coefficient de Chargaff*)

Quel que soit l'espèce d'origine, l'ADN contient toujours autant de purine que de pyrimidine soit :

$$(A + G) = (C + T) \text{ ou } (A+G) / (C+T) = 1$$

De plus, il y a autant de thymine que d'adénine $A/T = 1$, autant de guanine que de cytosine $G/C = 1$

Par contre, le rapport $(A+T)/(C+G)$ varie beaucoup : il est caractéristique de l'espèce.

Ce coefficient est appelé *Coefficient de Chargaff*. Il peut être calculé suite à un séquençage par la formule suivante $((G+C)/(A+T+G+C)) \times 100$.

Ou bien par une méthode de spectrométrie ultra-violet.

3.2.3. Hybridation ADN/ADN

Les hybridations ADN-ADN se sont révélées essentielles pour la définition d'une espèce bactérienne. Les hybridations ADN-ADN, utilisées en bactériologie, sont réalisées à partir d'un mélange de deux ADN dénaturés provenant de deux bactéries différentes. Dans ces conditions, on obtient d'autant plus de duplex hétérologues que les séquences d'ADN des microorganismes sont proches. Dans les techniques classiques l'un des ADN est généralement marqué par un isotope radioactif ou par une enzyme afin de reconnaître la provenance de chaque brin d'ADN dans les hybrides (**Fig. 25**).

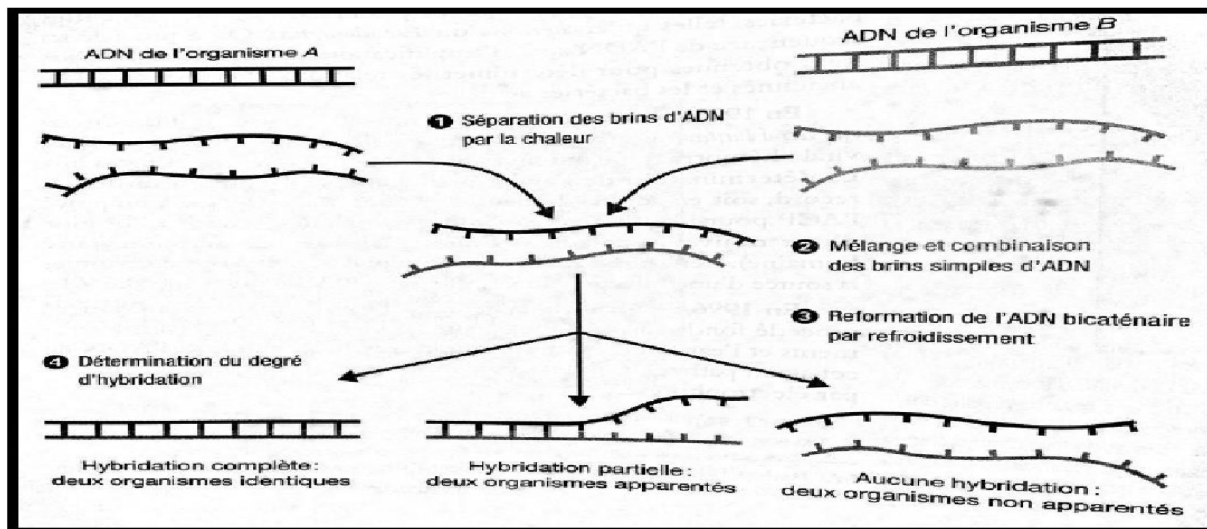


Figure 25 : Schéma explicative du phénomène de l'hybridation (Lehninger, 1973)

3.2.4. Le séquençage des ARN ribosomiaux (ARNr)

Lorsque **Carl Woese** et **George Fox** proposèrent d'utiliser les séquences nucléotidiques de la petite sous unité de l'ARNr pour évaluer les relations évolutives entre les microorganismes, ils ont ouvert la porte à la résolution de question posée de longue date sur l'origine et l'évolution des formes de vie majoritaires sur la terre : les microorganismes.

La validité de cette approche est maintenant largement admise et il y a actuellement plus de 500 000 séquences d'ARNr 16S et 18S dans les bases de données internationales GenBank et dans le Ribosomal data base Project (RDP II).

3.3. La classification selon le manuel de Bergey

On trouve un modèle de classification taxonomique des procaryotes dans la deuxième édition de bergey (*Bergey's manuals of systematic bacteriology*). Dans cette édition, les procaryotes sont divisés en deux domaines : Les bactéries (Bacteria) et les Archéobactéries (Archaea) et chaque domaine est divisé en embranchements, chaque embranchement en classe, les classes en ordres, les ordres en familles, les familles en genres et les genres en espèces.

3.3.1. Le domaine des Bacteria

On imagine généralement les bactéries comme de petites créatures invisibles et potentiellement dangereuses. Mais en réalité, peu d'espèces de bactéries causent des maladies chez les humains, les animaux, les plantes ou quelque organisme que ce soit.

Le domaine des Bacteria comprend tous les procaryotes pathogènes, beaucoup de non pathogènes présents dans le sol et l'eau, ainsi que les photo-autotrophes. Tous ces procaryotes possèdent du peptidoglycane dans leur paroi cellulaire. Les lipides membranaires sont composés de chaînes de carbone droites unies à du glycérol par des liaisons ester. Les Bacteria sont sensibles aux antibiotiques et le codon d'initiation de la synthèse des protéines contient la formyl méthionine.

3.3.2. Le domaine des Archeae

Le domaine des archéobactéries regroupe les procaryotes dont la paroi cellulaire ne contient pas de peptidoglycane. Ces organismes vivent souvent dans des conditions environnementales extrêmes et ils sont le siège de processus métaboliques exceptionnels.

L'analyse du génome des archéobactéries a montré que même si ces dernières ont des gènes qu'on trouve chez les bactéries, plus de la moitié de leurs gènes sont propres.

Les archéobactéries présentent une grande diversité. La morphologie de la plupart de ces microorganismes est ordinaire : sphérique, hélicoïdale ou en forme de bâtonnet mais dans quelques cas elle est tout à fait exceptionnelle. Certaines archéobactéries sont à Gram positif et d'autre à Gram négatif ; certaines se divisent par scissiparité et d'autre par fragmentation ou par bourgeonnement ; quelques une n'ont pas de paroi cellulaire. Les archéobactéries présentent également une grande diversité physiologique, depuis les aérobies jusqu'aux anaérobies stricts en passant par les anaérobies facultatifs. Du point de vue nutritionnel, ce domaine comprend des chimio-autotrophes et des photo-autotrophes et des chimio-hétérotrophes.

Chapitre 4: Nutrition bactérienne.

Les micro-organismes se multiplient à partir des aliments ou nutriments présents dans le milieu de culture. Ils ont tous un certain nombre de besoins communs : nécessite d'eau, de source d'énergie, de source de carbone, de source d'azote et d'éléments minéraux. Ces besoins de base sont appelés **besoins élémentaires**.

Beaucoup d'entre eux, dans ces conditions, peuvent croître et se multiplier. Certains d'autres, pourtant, en sont incapables : un ou plusieurs constituants essentiels, nécessaires à la synthèse d'un composant indispensable à la vie cellulaire, leur font défaut. Ces constituants ou métabolites essentiels doivent leur être fournis pour assurer leur développement. Ces besoins spécifiques sont appelés **facteurs de croissance**.

Selon la nature de ces besoins, on sera amené à définir des catégories de micro-organismes que l'on appelle **des types trophiques**.

4.1. Les besoins élémentaires

Sont des besoins communs chez toutes les bactéries : Eau, source d'énergie, source de carbone, source d'azote et d'éléments minéraux.

4.1.1. Eau

L'eau représente 80 à 90% du poids cellulaire. Elle joue un rôle fondamental en solubilisant les nutriments, en assurant leur transport et en assurant les réactions d'hydrolyse. Un paramètre appelé **Aw (activity of water, activité de l'eau)** quantifie la disponibilité de l'eau. Dans un nutriment, une partie de l'eau est plus ou moins liée aux composants (sels, protéines) et elle n'est pas disponible pour les micro-organismes qui ont besoin d'eau libre pour se développer. L'activité de l'eau se définit comme le rapport de la pression de vapeur saturante du milieu à la pression de vapeur saturante de l'eau pure à la même température. Ce rapport, inférieur ou égal à 1, peut être assimilé à **l'humidité relative du milieu**. Les bactéries exigent un certain seuil d'humidité et pour des Aw faibles, leur croissance est ralentie.

4.1.2. Source d'énergie

L'énergie nécessaire à la synthèse des macromolécules, est fournie comme pour les cellules humaines par l'adénosine triphosphates (ATP) synthétisé par la bactérie.

Selon la source d'énergie, les bactéries se divisent en phototrophes et chimiotrophes :

- La source d'énergie **des bactéries phototrophes** est la lumière transformée en ATP grâce à des pigments (chlorophylles, bactériochlorophylles, carotènes...). Si la source d'électrons est minérale, les bactéries sont qualifiées de photo-lithotrophes et si la source d'électrons est organique, les bactéries sont photo-organotrophes.
- **Les bactéries chimiotrophes** puisent leur énergie chimique à partir de l'oxydation des composés minéraux ou organiques. Si le donneur d'électrons est minéral, les bactéries sont **chimio-lithotrophes** et si le donneur d'électrons est organique, les bactéries sont **chimio-organotrophes**.

4.1.3. Source de carbone

Tous les organismes ont besoin de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'une source d'électrons. Le carbone est nécessaire à la formation du squelette de toutes les molécules organiques dont sont constitués les organismes.

Le carbone est l'élément constitutif le plus abondant chez les bactéries. Les exigences nutritionnelles en carbone conduisent au classement des micro-organismes en deux grandes catégories :

- **Les autotrophes** : sont capables de se développer en milieu minéral (inorganique) en utilisant le dioxyde de carbone (CO_2) ou les ions hydrogénocarbonates (HCO_3^-) comme seule source de carbone pour synthétiser leurs constituants carbonés ;
- **Les hétérotrophes**, exigent des molécules organiques (sucres et dérivés, acides organiques, peptides et acides aminés...) pour leur croissance.

Certains micro-organismes sont capables d'assimiler de nombreuses substances organiques différentes, tandis que d'autres ont des capacités métaboliques restreintes à quelques substrats (voir un seul).

4.1.4. Source d'azote

Pour synthétiser leurs protéines qui représentent environ 10% de leur poids sec, les bactéries ont toujours besoin de substances azotées. Quelques bactéries seulement sont capables de fixer l'azote sous sa forme moléculaire. Tel est le cas des *Rhizobium* qui vivent en symbiose avec certaines légumineuses en leur permettant de fixer l'azote atmosphérique. La fixation d'azote moléculaire peut également être le fait de bactéries libres tels les *Azobacter* et certains *Clostridium* qui, de ce fait, contribuent à fertiliser le sol.

D'autres composés inorganiques peuvent être utilisés :

- Les nitrites avec les *Nitrobacter*,

- Les nitrates par de nombreux groupes bactériens (ils sont alors réduits en nitrites puis en ammoniums)

- L'ammoniac par certaines espèces sous forme de sels ammonium.

La source d'azote peut être enfin organique : avec un groupement amines des composés organiques (R-NH₂), c'est soit l'ammoniac qui est incorporé après désamination, soit le radical libre NH₂ par transamination.

4.1.5. Source de soufre et phosphore

Le soufre et le phosphore sont particulièrement importants.

-Le soufre est retrouvé au niveau des acides aminés soufrés (cystéine, méthionine) peuvent fournir le soufre aux micro-organismes. Il intervient dans les structures complexes des protéines. Il est également utilisé dans la synthèse des vitamines (Biotine, coenzyme A). Dans de nombreux milieux de culture, le soufre est fourni sous forme d'ions sulfates (SO₄²⁻), réduits en sulfites (SO₃²⁻) puis en sulfures (H₂S). H₂S est ensuite incorporé à la sérine pour former la cystéine.

- Le phosphore est nécessaire comme composé de l'ATP, des acides nucléiques et des coenzymes tels que NAD, NADP et les flavines. Le phosphore est toujours absorbé dans la cellule comme phosphate libre inorganique (PO₄²⁻).

➤ Autres éléments minéraux

- Le potassium joue un rôle comme cofacteur enzymatique, le magnésium aussi, qui, en plus a une fonction de stabilisateur de structures cellulaires.

- Le calcium joue un rôle important dans la résistance à la chaleur des endospores (chez *Bacillus*, *Clostridium*). Il stabilise également la paroi des bactéries.

- Le sodium est important pour la croissance des bactéries halophiles (du grec *halo* : sel et *philein* : aimer). Enfin le Fer, qui intervient dans la chaîne respiratoire (bactéries aérobies), élément des cytochromes au niveau de la membrane plasmique. Les bactéries possèdent des sidérophores qui capturent le fer insoluble et le transportent à l'intérieur des cellules bactériennes.

4.2. Besoins en facteurs de croissance

Les microorganismes, en particulier la plupart **des autotrophes photolithotrophes**, se développent souvent en présence de minéraux et de sources d'énergie, de carbone, d'azote, de phosphore et de soufre. Ces organismes ont les enzymes et les voies métaboliques nécessaires à la synthèse de tous les composants cellulaires.

D'un autre côté, de nombreux micro-organismes sont dépourvus d'une ou de plusieurs enzymes essentielles et par conséquent ne peuvent pas fabriquer tous les constituants indispensables, ils doivent les obtenir de leur environnement. Ces constituants cellulaires essentiels ou leurs précurseurs qui ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme, sont appelés **des facteurs de croissance**. Il y a trois classes principales de facteurs de croissance : Les acides aminés, les purines et les pyrimidines, et les vitamines.

Les acides aminés sont nécessaires à la synthèse protéique, les purines et les pyrimidines à celle des acides nucléiques. Les vitamines sont de petites molécules organiques qui généralement forment les cofacteurs ou une partie de ceux-ci. Les vitamines sont nécessaires en très faible quantité pour la croissance (**Tableau II**).

Tableau II : Exemples de vitamines utilisées par les bactéries (**Prescott *et al.*, 2003**).

Vitamine	Forme du coenzyme	Fonction
Biotine	Biotine	Réactions de biosynthèse qui demandent la fixation du CO ₂
Acide nicotinique	NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) et NADP	Transporteurs d'e ⁻ dans les réactions de déshydrogénation
Pyridoxine (B6)	Pyridoxal phosphate	Transamination, désamination, décarboxylation des aminoacides
Riboflavine (B2)	FMN (flavine mononucléotide) et FAD (flavine adénine dinucléotide)	Réactions d'oxydoréduction
Vitamine K	Quinones et naphthoquinones	Processus de transport d'électrons

4.3. Les différents types nutritionnels ou trophiques

Comme le besoin en carbone, en énergie et en électrons est tellement important, les biologistes utilisent des termes spécifiques pour définir la façon dont ces besoins sont satisfaits. Les différents types trophiques sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau III : Les principaux types nutritionnels chez les micro-organismes (**Prescott *et al.*, 2003**).

Classe du besoin	Type trophique	Nature de besoins
Sources de carbone	Autotrophes	CO ₂ seule ou principale source de carbone biosynthétique
	Hétérotrophes	Molécules organiques préformées, réduites provenant d'autres organismes
Sources d'énergie	Phototrophes	Lumière
	Chimiotrophes	Oxydation de composés organiques et inorganiques
Sources d'électrons	Lithotrophes	Molécules inorganiques réduites
	Organotrophes	Molécules organiques
Facteurs de croissance	Auxotrophes	Nécessaires
	Prototrophes	Non nécessaires

-Les photo-autotrophes sont photosynthétiques. On peut citer les cyanobactéries, les bactéries vertes, les bactéries pourpres non sulfureuses. La photosynthèse bactérienne est différente de celle des végétaux supérieurs. Elle ne conduit jamais à la libération d'oxygène libre. Les pigments et les donneurs d'électrons sont également différents (hydrogène, soufre, jamais l'eau comme chez les plantes).

-**Les photo-hétérotrophes** sont photosynthétiques et puisent le carbone de composés organiques.

-**Les chimio-autotrophes**, n'ont besoin ni de matière organique, ni de lumière du soleil. Ils puisent leur énergie de substance inorganique et transforme le CO₂ en matière organique. Comme exemples, les bactéries des sources chaudes hydrothermales profondes (fumeurs noirs). Elles nourrissent tout un écosystème.

-**Les chimio-hétérotrophes**, puisent leur énergie et leur carbone des substances organiques. C'est le cas de la majorité des bactéries d'intérêt médical (pathogènes). La synthèse des protéines et des acides nucléiques nécessite des substances azotées. L'azote représente 12% du poids sec des bactéries et 80% de l'air qu'on respire.

4.4. Paramètres physico-chimiques

Les éléments énergétiques et constitutifs nécessaires à la croissance bactérienne doivent être fournis dans certaines conditions physico-chimiques, de température, de pH, de pression osmotique, ... etc. Ces facteurs peuvent favoriser ou inhiber la croissance bactérienne.

4.4.1. Température

Une bactérie est en général capable de croître dans un intervalle plus ou moins important (selon les espèces) de température. Il est limité par une valeur minimale en dessous de laquelle il n'y a plus de développement et une valeur maximale au-dessus de laquelle la croissance s'arrête. La croissance est meilleure dans un intervalle de température optimale.

Selon leurs températures optimales, les microorganismes sont divisent en :

- **Les psychotropes** : Peuvent se cultiver à 0°C. Température optimale de multiplication entre 20 à 25 °C.
- **Les bactéries psychrophiles** : Température maximale 20°C. Température optimale de croissance inférieure à 15 °C.
- **Les cryophiles** : peuvent se développer à des températures négatives. Elles sont souvent isolées des matières fécales d'animaux polaires. Température optimale de croissance (- 5 °C).
- **Les mésophiles** : croissance entre 25 et 40 °C. Optimum à 37°C. la majorité des bactéries pathogènes.

- **Les thermophiles** : température optimale entre 50 et 60 °C.
- **Les hyper thermophiles** ont une température optimale de croissance entre 70 °C et 110°C.

4.4.2. pH

Le potentiel Hydrogène (pH) traduit la concentration en H^+ dans un milieu. C'est un facteur très important qui influence beaucoup la croissance des bactéries. Comme pour la température, une bactérie est capable de croître dans un intervalle plus ou moins important (selon les espèces) de pH. Il est limité par une valeur minimale en dessous de laquelle il n'y a plus de développement et une valeur maximale au-dessus de laquelle la croissance s'arrête. La croissance est meilleure quand le pH est optimum.

En fonction du pH optimum, on distingue trois groupes bactériens :

- **Acidophiles** : pH optimum acide.
- **Neutrophiles** : pH optimum proche de la neutralité.
- **Basophiles (alcalophiles)**: pH optimum basique.

4.4.3. Pression osmotique

La pression osmotique d'un milieu traduit la concentration totale des ions et molécules en solution dans ce milieu. L'activité de l'eau (A_w : Activity of water) est inversement proportionnelle à la pression osmotique d'un milieu. Ainsi, elle est affectée par la concentration plus ou moins importante de sels ou de sucres dissous dans l'eau. Les bactéries peuvent se développer dans des milieux ayant une A_w comprise entre 1 et 0,7. L' A_w de l'eau pure est de 1 ; celle du sang humain est de 0,99 ; l'eau de mer = 0,98 ; celle des sols est située entre 0,9 et 1,0.

Selon leur sensibilité à la pression osmotique, on distingue trois catégories de bactéries.

- Les bactéries non-halophiles**: NaCl est inférieure à 0,2 M.
- Les espèces halophiles**: NaCl supérieure à 0,2 M pour les moins halophiles (*Cobetia marina*) à 5,2 M pour les plus halophiles *Halobacterium salinarum*.
- **Les espèces halotolérantes** comme les *Staphylococcus*, les *Listeria* ou les *Lactobacillus*. Ils tolèrent 7.5 à 15% de NaCl.

Les anciens conservent les aliments en rajoutant du sel ou du sucre ce qui entraîne une augmentation de la pression osmotique. La croissance des bactéries est limitée.

- **Les bactéries osmophiles** se multiplient en présence de grandes concentrations de sucre.

4.4.4. Besoins en oxygène

L'oxygène est en réalité un gaz très toxique s'il n'est pas neutralisé par les cellules qui en ont besoin.

Plusieurs groupes bactériens peuvent être distingués en fonction de leurs besoins en Oxygène:

- **Les bactéries aérobies strictes**, ne se développent qu'en présence d'oxygène. Leur source principale d'énergie est la respiration aérobie où l'oxygène moléculaire est accepteur final d'électrons.
- **Les microaérophiles**, peuvent se croître lorsque la pression partielle d'oxygène est faible.
- **Les aéro-anaérobies facultatives**, peuvent se développer en présence d'oxygène, en utilisant la respiration aérobie et en anaérobiose, la fermentation ou la respiration anaérobie.
- **Les anaérobies aéro-tolérantes**, se développent en présence et en absence d'oxygène mais sans l'utiliser. Elles empruntent exclusivement des voies fermentaires pour leur métabolisme.
- **Les anaérobies stricts** : sont incapables de croître en présence d'oxygène ; il leur est toxique. Pour leur métabolisme, elles utilisent la fermentation, la respiration anaérobie ou la photosynthèse.

Chapitre 5: Croissance bactérienne.

La croissance peut être définie comme une augmentation des constituants cellulaires, elle aboutit à un accroissement du nombre de cellules quand les micro-organismes se multiplient par scissiparité (**Fig. 26**) ou par bourgeonnement. Dans ce cas, les cellules s'élargissent et se divisent pour donner deux cellules filles de taille plus ou moins égale. Il y a aussi croissance si les cellules deviennent simplement plus longues ou plus grandes.

Si le microorganisme est coenocytique, c'est-à-dire multinucléé, il y a division nucléaire sans division cellulaire et la croissance conduit à une augmentation de la taille de la cellule et non du nombre de cellules.

Il n'est pas facile d'analyser la croissance et la division de micro-organismes pris individuellement à cause de leur petite taille. Les microbiologistes suivent donc normalement des variations numériques sur la totalité de la population.

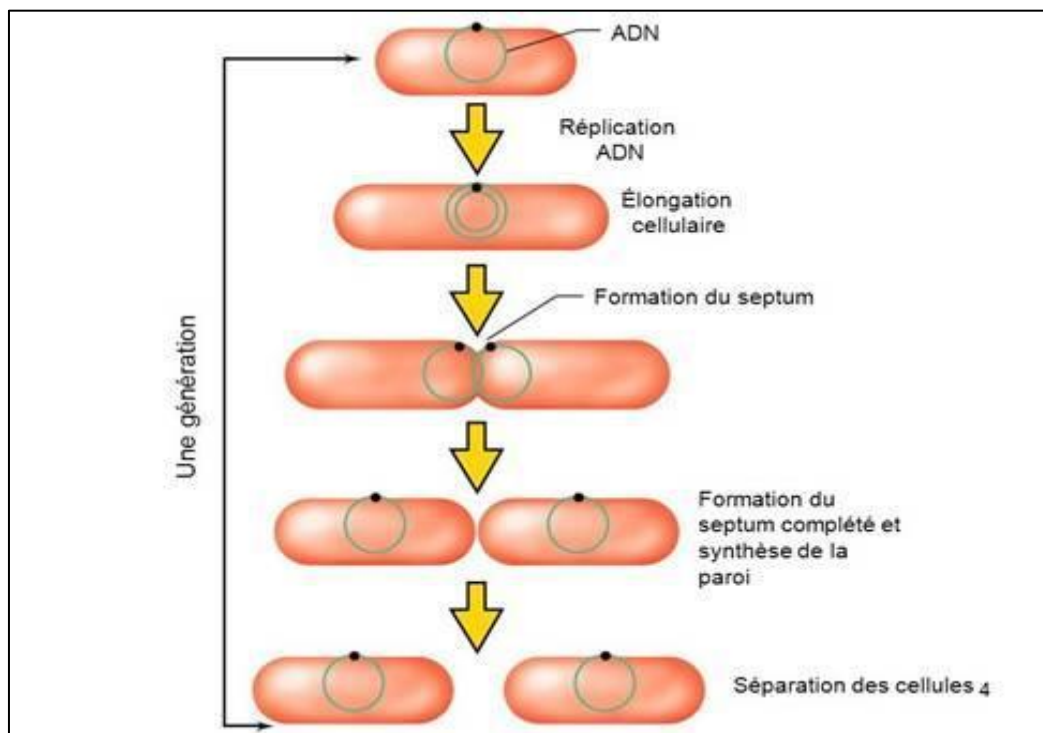


Figure 26 : La division par scissiparité (Prevot, 1961).

5.1. Mesure de la croissance

Il existe plusieurs moyens de mesurer la croissance microbienne pour déterminer le temps de génération et la vitesse de croissance. Le nombre ou la masse cellulaire de la population peut être suivi puisqu'ils augmentent tous deux au cours de la croissance.

5.1.1. Mesure du nombre de cellules

5.1.1.1. Numération directe au microscope

C'est une méthode facile à utiliser, peu coûteuse et relativement rapide. Elle donne aussi des informations quant à la taille et à la morphologie des organismes.

La méthode est pratiquée couramment pour les cellules de taille grande comme les levures grâce à un hématimètre (cellule de Thoma, Malassez, ...etc). Ces lames spécialement conçues ont des chambres de profondeur connue dont le fond est muni d'une grille (**Fig. 27**).

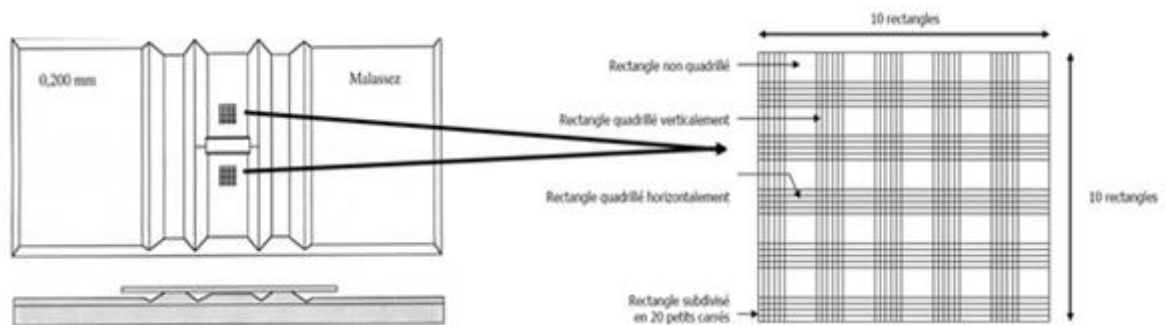


Figure 27 : Exemple d'un hématimètre (**Gaden, 1969**).

Pour les bactéries (petites tailles), le dénombrement peut se faire grâce à la cellule de Petroff-Hausser dont la profondeur de la cuvette est dix fois plus faible que l'hématimètre (**Fig. 28**).

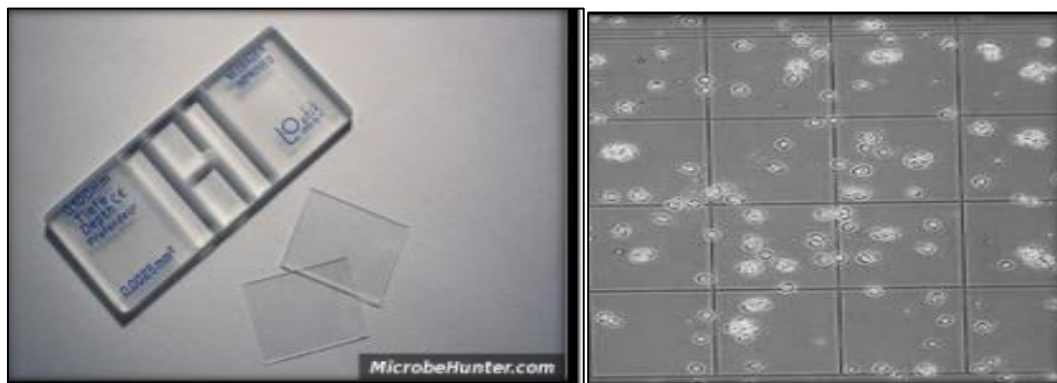


Figure 28 : Utilisation de la chambre de comptage de Petroff-Hausser (**Prescott et al., 2003**).

Le nombre de microorganismes dans un échantillon est calculé en tenant compte du volume de la chambre et de la dilution de l'échantillon.

Cette technique présente quelques désavantages. Il faut que la population microbienne soit suffisamment dense parce que les échantillons sont dans de petits volumes.

5.1.1.2. Compteur de particules

Cet appareil réalise automatiquement le dénombrement des particules ou les micro-organismes plus grands, comme les levures.

La suspension microbienne doit passer dans le compteur au travers d'un orifice. Un courant électrique circule au travers de cet orifice et des électrodes placées de part et d'autre de l'ouverture mesurent la résistance électrique. Chaque fois qu'une cellule microbienne passe, la résistance électrique augmente (ou la conductivité diminue) et la cellule est comptée (**Fig. 29**). Ce compteur présente l'inconvénient de compter les cellules ainsi que les autres particules inertes de même taille.

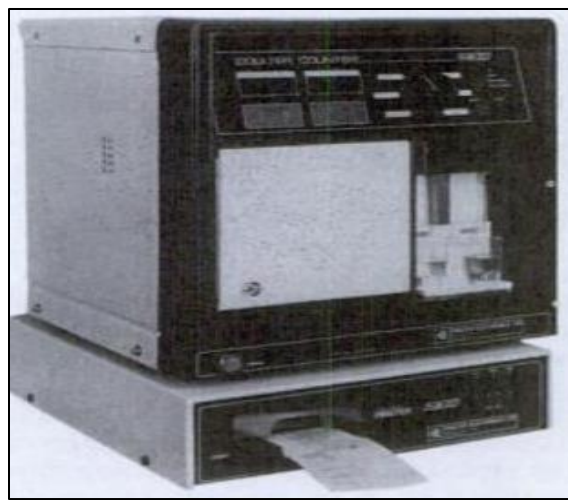


Figure 29 : Compteur de particules (Meyer *et al.*, 2004).

5.1.1.3. Épifluorescence

Cette méthode permet en théorie de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes. Elle utilise l'acridine orange ou d'autres **fluorochromes** qui se fixent sur l'ADN. Au microscope à lumière ultraviolette, la fixation de l'acridine orange sur un ADN bicaténaire donne une fluorescence verte (**les bactéries vivantes apparaissent en vert**), alors que sa fixation sur un ADN monocaténaire donne une fluorescence rouge (**les bactéries mortes en rouge**). Plusieurs inconvénients sont attribués à cette technique :

- Chez les bactéries vivantes en multiplication, l'ouverture de la double chaîne d'ADN lors de sa réplication induit une fluorescence rouge.
- Les populations inférieures à 10^5 cellules/ml pour les levures et 10^6 cellules/ml pour les bactéries ne peuvent être évaluées.

- Chez les bactéries formant des chainettes ou des mycéliums, ce procédé est inadéquat.

5.1.1.4. Dénombrement après culture

Plusieurs procédés sont suivis pour ce genre de dénombrement de cellules. Ces méthodes de culture ne comptent que les cellules vivantes et capables de se reproduire. Les deux techniques habituellement utilisées sont celle de **l'étalement en surface** et celle de **l'étalement en profondeur**.

Dans les deux méthodes, un échantillon dilué de bactéries ou d'autres microorganismes est étalé sur une surface solide. Chaque micro-organisme ou groupe de micro-organismes se développe en une colonie distincte, et comme on n'est pas absolument certain que chaque colonie provienne d'une cellule isolée, les résultats sont souvent exprimés en termes d'unités formatrices de colonies (UFC) plutôt qu'en nombre de micro-organismes. Pour obtenir les meilleurs résultats, les échantillons doivent contenir entre 30 et 300 colonies (**Fig.30**).

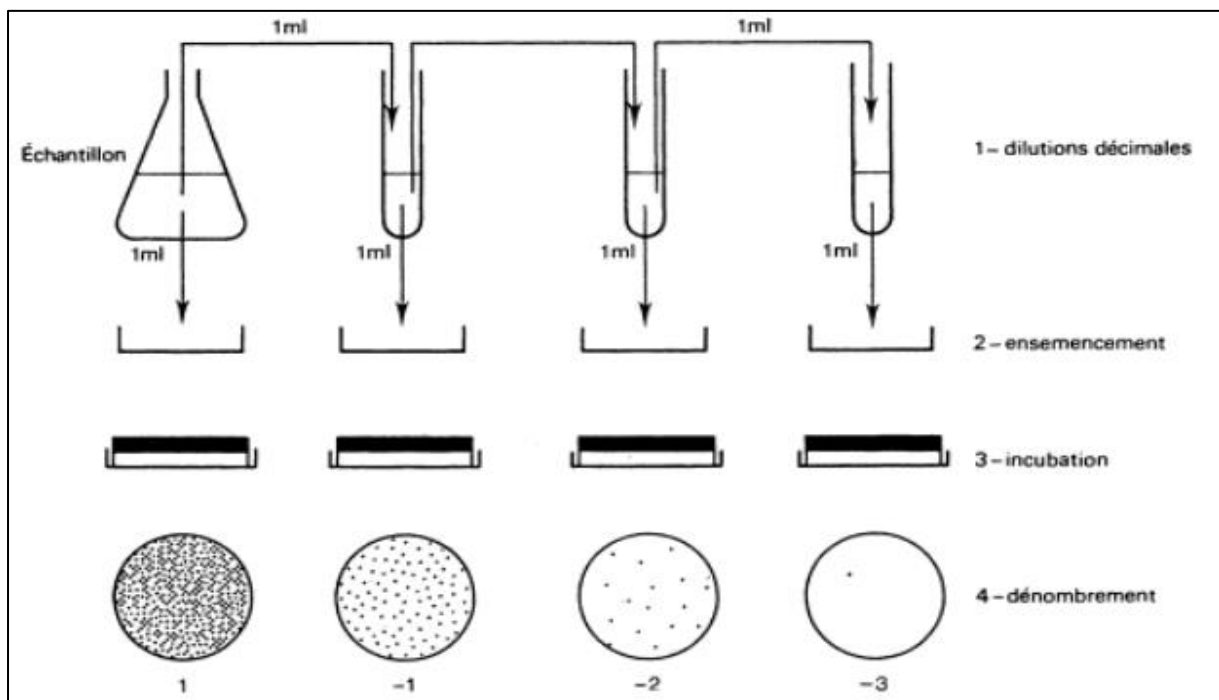


Figure 30 : Dénombrement des bactéries par ta méthode des dilutions (**Prescott et al., 2003**).

- **Technique de filtration sur membrane :** Une méthode de culture sur boîte habituellement employée retient les bactéries d'échantillons aqueux sur une membrane filtrante. Le filtre est ensuite déposé sur un milieu gélosé ou sur un buvard imprégné de milieu liquide et incubé jusqu'à ce que chaque cellule forme une colonie séparée (**Fig. 31**).

Le nombre de colonies comptées donne le nombre de micro-organismes dans l'échantillon filtré. Un milieu spécial permet de sélectionner des micro-organismes particuliers. Cette technique est particulièrement utile à l'analyse de la pureté de l'eau.

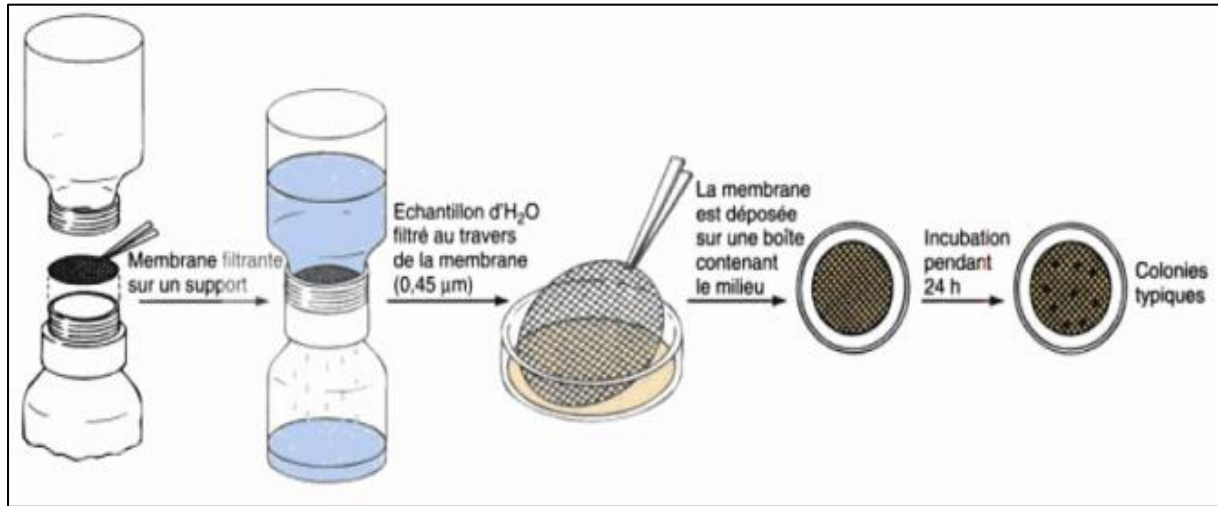


Figure 31 : Le procédé de filtration sur membrane (Prescott *et al.*, 2003).

5.1.2. Mesure de la biomasse

La biomasse peut être quantifiée en mesurant soit :

-**Le poids sec de la culture microbienne**, qui consiste à récolter les cellules par centrifugation puis au lavage à l'eau physiologique avant de les passer au séchage à 100-110°C. Le culot est ensuite pesé. Le résultat est exprimé en g de matières sèches par litre. Cette technique est délicate et particulièrement longue.

-**Le trouble de la suspension** : C'est une technique plus simple, elle est largement utilisée pour dénombrer les cellules microbiennes ; cette technique est basée sur la mesure l'absorbance de la lumière par une suspension bactérienne à l'aide d'un spectrophotomètre.

5.1.3. Mesure des constituants cellulaire

Si la quantité d'une substance dans chaque cellule est constante, la quantité totale de ce constituant cellulaire est en relation directe avec la masse cellulaire microbienne totale.

On peut analyser le contenu total en protéines ou en azote d'un échantillon de cellules lavées et collectées à partir d'un volume connu de milieu. Une augmentation de la population microbienne se traduira par une augmentation des protéines totales. De même, la quantité de chlorophylle permet de mesurer les populations d'algues et de cyanobactéries et la quantité d'ATP est une indication de la masse microbienne vivante.

5.2. Les paramètres de croissance

La croissance d'une bactérie est définie par deux paramètres :

-Le temps de génération (G) : correspond au temps nécessaire au doublement d'une population ou une division cellulaire. Il dépend de l'espèce, voire même des conditions environnementales (favorables ou défavorables).

Dans les conditions optimales de culture, le temps de génération ou **G** est de 13 minutes pour *Vibrio parahaemolyticus*, de 20 minutes pour *Escherichia coli*.

$$G = t/n, t : \text{temps en minutes, } n : \text{le nombre de division.}$$

-Taux de croissance (μ) : désigne le nombre de division par unité de temps (heure). Par exemple *E.Coli* se divise 3 fois en une heure, son taux de croissance est 3.

$$\mu = n/t, n = \mu/t, \text{ donc } \mu = 1/G$$

5.3. Courbe de croissance (culture discontinue)

On étudie la croissance d'une population en analysant la courbe de croissance d'une culture microbienne. Lorsque des micro-organismes sont cultivés en milieu liquide, ils se développent habituellement dans un système fermé, **culture en « batch » ou discontinue**. Ils sont incubés dans un flacon fermé contenant un seul lot de milieu. Comme il n'y a pas d'apport de milieu frais au cours de l'incubation, la quantité d'éléments nutritifs diminue et la concentration de déchets augmente.

La courbe de croissance est obtenue en traçant l'évolution du nombre de cellules ou de biomasse en fonction du temps. Cette évolution est la vitesse volumique de croissance par unité de temps, $X = f(t)$ (**Fig. 32**).

Cette courbe résultante comprend quatre phases distinctes :

- La phase de latence
- La phase exponentielle
- La phase stationnaire
- La phase de déclin

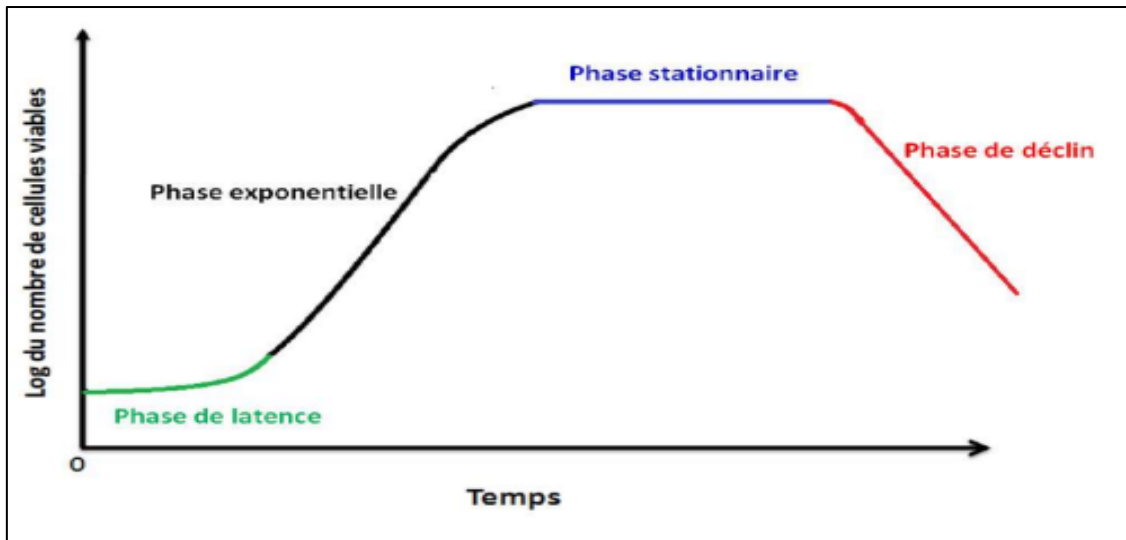


Figure 32 : La courbe de croissance microbienne dans un système fermé (Gebhardt & Anderson, 1965).

a) La phase de latence

C'est une phase de courte durée, elle varie d'une espèce à l'autre. Durant cette phase, Les bactéries ne se divisent pas, mais s'adaptent aux conditions de leur milieu environnemental. Elles synthétisent les enzymes nécessaires et spécifiques des substrats (nutriments) présents.

Le nombre de bactéries reste inchangé et égale au nombre initial. Ainsi, le taux de croissance (μ) est égal **zéro**. Cette phase est influencée par plusieurs facteurs. Plus la concentration de l'inoculum de départ est importante, moins la phase de latence est longue.

b) La phase exponentielle

Pendant la phase exponentielle ou logarithmique, les micro-organismes se développent et se divisent à la vitesse maximale possible étant donné leur potentiel génétique, la nature du milieu et les conditions de culture. La vitesse de croissance est constante pendant la phase exponentielle, les organismes se divisent et doublent leur nombre à intervalles de temps réguliers. Le taux de croissance (μ) est **maximal**. Durant cette phase, certains métabolites primaires sont synthétisés, comme les antibiotiques et les toxines.

c) La phase stationnaire

La croissance de la population finit par s'arrêter et la courbe de croissance devient horizontale suite à de multiples facteurs qui agissent seuls ou ensemble comme la limitation en éléments nutritifs et l'accumulation de déchets toxiques qui peuvent arrêter la croissance.

Pendant la phase stationnaire, le nombre total de micro-organismes viables reste constant. Ceci peut résulter d'un équilibre entre la division et mort cellulaire, ou bien la population peut simplement cesser de se diviser et rester métaboliquement active.

d) La phase de déclin

A ce stade de croissance, le taux de mortalité est plus important que la division cellulaire et le nombre de cellules diminue considérablement, induisant un taux de croissance (μ) **négatif**. Ceci est due en grande partie à l'épuisement des nutriments du milieu de culture et à l'accumulation des déchets parfois toxiques pour les microorganismes, de plus, le changement de pH peut être limitant.

5.3.1. Autres modes de croissance

5.3.1.1. Phénomène de diauxie

Le phénomène de diauxie, est une croissance qui se traduit par une courbe bi phasique. Cette croissance est observée lorsqu'on utilise un milieu synthétique contenant deux sources de carbone. Dans un milieu contenant du glucose et du lactose, les bactéries vont utiliser en premier le glucose grâce à des enzymes constitutives. La dégradation du lactose est sous la dépendance d'enzymes inductibles dont l'induction est réprimée en présence de glucose. Lorsque le glucose est consommé, les bactéries utiliseront le lactose et initieront une nouvelle phase de croissance exponentielle après un temps de latence adaptatif (**Fig. 33**).

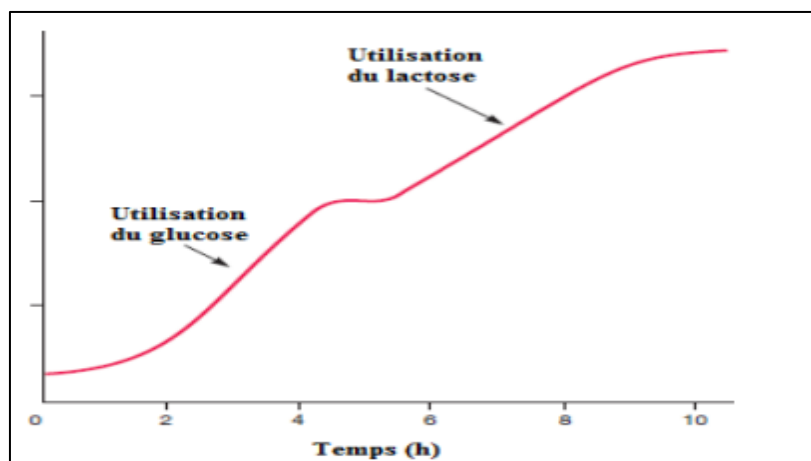


Figure 33 : Phénomène de diauxie chez les bactéries cultivées en présence du glucose et du lactose comme source de carbone (Meyer *et al.*, 2004).

5.3.1.2. Croissance continue

Il est possible de cultiver des micro-organismes dans un système ouvert dans lequel les conditions de culture sont gardées constantes par l'apport continu de nutriments et l'élimination régulière des déchets. Ces conditions sont réalisées en laboratoire dans des systèmes de culture continue où une population microbienne peut être maintenue longtemps en phase exponentielle de croissance et à une concentration constante de la biomasse. On utilise généralement deux types de système de culture continue : **les chémostats et les turbidostats**.

a) Le chémostat

Un chémostat est construit de façon telle que le milieu stérile est introduit dans la chambre de culture à la même vitesse que le milieu contenant les micro-organismes en est éliminé (**Fig.34**). Le milieu de culture d'un chémostat contient un élément nutritif essentiel en quantité limitante (par exemple : un acide aminé).

Ce nutriment étant limité, la vitesse de croissance est déterminée par la vitesse à laquelle le milieu frais est ajouté dans la chambre de culture et la densité cellulaire finale dépend de la concentration en nutriment limitant.



Figure 34 : Un système de culture continue : le chémostat (Prescott *et al.*, 2003).

b) Le turbidostat

Le second type de système de culture continue, le turbidostat, est équipé d'une cellule photoélectrique qui mesure l'absorbance ou la turbidité dans la chambre de culture.

La vitesse d'écoulement du milieu dans la cuve est réglée automatiquement pour maintenir une turbidité ou densité cellulaire prédéterminée (**Fig. 35**).

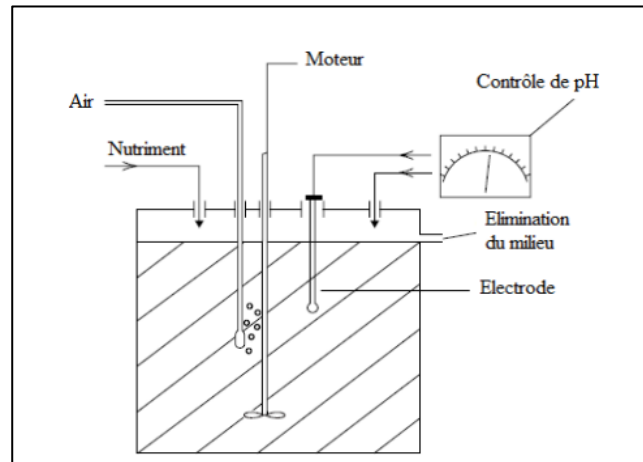


Figure 35 : Schéma du turbidostat (Meyer *et al.*, 2004).

Le turbidostat diffère du chémostat de plusieurs façons. La vitesse de dilution dans un turbidostat varie au lieu de rester constante et le milieu de culture ne contient pas de nutriment limitant. Le turbidostat fonctionne mieux à des vitesses de dilution élevées, alors que le chémostat est plus stable et plus efficace à des vitesses de dilution réduites.

5.4. Culture bactérienne

La microbiologie dépend en grande partie de la croissance et du maintien des micro-organismes en laboratoire : ceci n'est possible que si des milieux de culture adéquats sont disponibles. Un milieu de culture est une préparation solide ou liquide, utilisé pour faire croître, pour transporter et conserver les micro-organismes.

Un milieu de culture doit contenir tous les éléments nécessaires à la survie et à la multiplication des micro-organismes, et doivent posséder les propriétés physicochimiques convenant à cette culture (pH en particulier).

5.4.1. Classification des milieux de culture

Les milieux de culture sont de différents types. Il s'agit soit de milieux de base, permettant la croissance d'espèces non ou peu exigeantes, soit de milieux enrichis par l'addition de diverses substances (sérum, œuf, sang, vitamines,...etc.) qui autorisent la croissance de bactéries plus exigeantes. Il peut s'agir également de milieux rendus sélectifs par addition d'antibiotiques, d'antiseptiques ou de colorants qui vont inhiber les bactéries sensibles à ces composés.

5.4.1.1. Classification des milieux selon la consistance

Selon les analyses et les expériences à effectuer, on peut cultiver des bactéries sur **des milieux liquides** qu'on appelle bouillons de culture. Les micro-organismes se développent sous forme d'un trouble ou voile en suspension.

Si on rajoute de l'agar-agar (polysaccharides isolés des algues), on obtient **des milieux solides**. Selon la quantité d'agar rajoutée, on a **des géloses solides (1,5%)** et **des géloses molles (0,75%)**. Il est déconseillé de dépasser 1,5% car cela pourrait inhiber la croissance de certaines bactéries à cause d'une forte pression osmotique.

Les milieux solides peuvent être préparés sur boîte de Pétri ou en tube (gélose inclinée, gélose profonde). L'agar fond lorsqu'on la réchauffe à 100°C et se solidifie lorsqu'elle se refroidit (dès 40°C). Généralement, on prépare les boîtes de Pétri avec une gélose stabilisée à 50°C.

Les bactéries se développent sous forme de colonies, dont la forme, la couleur, l'odeur, dépendent à la fois de l'espèce et du milieu utilisé. La colonie s'agrandit radialement avant de pousser verticalement à une taille et une hauteur limites.

5.4.1.2. Classification des milieux selon la composition

On distingue deux types de milieux :

a) Les milieux complexes ou empiriques : De composition complexe, mal définie. Ce sont les plus appropriés. Employés pour la culture des chimio-hétérotrophes. Ils sont constitués d'extrait de soja, de viande, de levure, digérés par des enzymes. Ils fournissent une source de carbone, d'azote, vitamines B. Leur composition varie d'un lot à l'autre.

Ils sont préparés par macération ou par décoction. Exemple : bouillon nutritif (Peptone (5g), extrait de bœuf (3g), NaCl (8g), Eau distillée (1 litre)).

b) Les milieux synthétiques ou définis : dans lesquels tous les composants sont connus qualitativement et quantitativement. Ces milieux sont surtout utilisés pour l'étude des bactéries autotrophes (non exigeantes) ou pour étudier les besoins nutritifs d'un germe. Ils sont rarement utilisés en routine à l'exception de quelques-uns. Exemple : Citrate de Simons, Citrate de Christensen, Urée-Tryptophane.

5.4.1.3. Classification des milieux selon l'utilisation

a) Milieu de base

Le milieu liquide de base est représenté par le bouillon nutritif ordinaire qui est composé de trois composants principaux, les peptones, les extraits de viande et les extraits de levure. Les peptones sont des hydrolysats enzymatiques de protéines animales ou végétales riches en acides aminés et en petits peptides. Les extraits de viande apportent des sels minéraux, des vitamines, des protéines peu dégradées et des glucides. Les extraits de levure, quant à eux, représentent une source d'acides aminés et de vitamines hydrosolubles. Du chlorure de sodium est habituellement ajouté à la concentration de 5 g/l.

b) Milieux d'isolement

Les milieux d'isolement, contrairement aux précédents, sont des milieux solides qui permettent d'obtenir des colonies isolées permettant d'effectuer les tests d'identification ou d'étudier la sensibilité aux antibiotiques des bactéries. Ces milieux peuvent être :

➤ Les milieux sélectifs

Ces milieux inhibent la croissance de la majorité des micro-organismes et stimulent celles des bactéries qu'on cherche à isoler. On fait intervenir un pH acide, une concentration de sel élevée.

➤ Les milieux différentiels

Contiennent un indicateur (colorant) qui permet de différencier deux types bactériens qui poussent sur le même milieu, mais ne dégradent pas tous les deux un substrat particulier. Exemple : La gélose Hektoën, qui différencie la fermentation de trois glucides (lactose, saccharose et salicine) ainsi que la production de sulfure d'hydrogène

➤ Les milieux d'enrichissement

Ils contiennent, outre les composants de base, des composants indispensables aux bactéries, que celles-ci ne peuvent pas synthétiser.

Il s'agit en général de milieux liquides riches permettant le développement d'un maximum de bactéries, y compris des milieux permettant le développement de bactéries anaérobies strictes. Parmi les plus utilisés, on trouve le bouillon nutritif, le milieu de Schaedler, le milieu cœur-cerveau.

- **Les milieux d'identification** : Utilisés dans la mise en évidence des caractères biochimiques des bactéries dans l'identification différentielle.
- **Les milieux de conservation** : Ce sont des milieux pauvres au sein desquels les bactéries survivent dans un état de vie ralentie.

5.5. Les agents antimicrobiens

5.5.1. Définition

La croissance bactérienne doit être contrôlée pour mieux diriger son usage à des fins expérimentales ou industrielles par multiples agents physiques et chimiques s'appellent : **agents antimicrobiens**. Ce sont des substances dont le contact, dans des conditions définies avec les micro-organismes, entraîne, soit l'arrêt de leur multiplication, soit leur mort selon plusieurs procédés:

- **La stérilisation** : C'est une opération qui a pour objet de tuer tous les micro-organismes d'une préparation. Le matériel traité est dit stérile quand le résultat est acquis, c'est-à-dire qu'aucun micro-organisme n'est capable de se développer.
- **La désinfection** : Opération, au résultat momentané, permettant de tuer des micro-organismes et/ ou d'inactiver des virus sur un support inerte.
- **La décontamination** : Opération, au résultat momentané, permettant de tuer, ou d'inhiber, des micro-organismes indésirables en fonction des objectifs fixés, sur un support inerte ou sur un support vivant.
- **L'asepsie** : Ensemble des mesures pour empêcher tout apport exogène de micro-organismes ou virus.
- **L'antisepsie** : Opération, au résultat momentané, permettant, au niveau de support vivant, dans la limite de leur tolérance, d'éliminer, ou de tuer, les micro-organismes, et/ou d'inactiver les virus. Le résultat est limité aux micro-organismes et virus présents, au moment de l'opération.

5.5.2. Classification

On distingue trois classes d'agents antimicrobiens :

- Les agents physiques.
- Les agents chimiques.
- Les agents chimio-thérapeutiques.

5.5.2.1. Les agents physiques

a) La température

Elle peut être utilisée pour la conservation des aliments soit par le froid (réfrigération, congélation) soit par la chaleur (la pasteurisation). Dans les deux cas, le nombre de micro-organismes est stabilisé par le ralentissement de la croissance.

La température permet également de détruire les micro-organismes (stérilisation, appertisation). Son action dépend du milieu, de la physiologie et du nombre de cellules. Les destructions thermiques utilisent la chaleur humide ou la chaleur sèche.

***Chaleur humide :** Les formes végétatives bactériennes et fongiques et les virus sont détruits à la température de l'eau bouillante, mais ce n'est pas le cas des spores (surtout les endospores bactériennes).

-L'appertisation : c'est une méthode fiable, efficace et simple, développé par **Nicolas Appert** en 1785 et confirmé par **Pasteur** en 1801. Elle consiste à plonger des légumes enfermés hermétiquement dans des bouteilles, dans de l'eau bouillante. Cette approche est très utilisée dans l'industrie des conserves.

-L'autoclave : est une enceinte métallique hermétiquement close dans laquelle on chauffe de l'eau sous pression (120°C à 1 atm) pour faire agir la vapeur d'eau pressurisé, pendant 15 à 20 minutes. La stérilisation est obtenue par dénaturation des protéines. Il y'a plusieurs modèles d'autoclaves de tailles et de formes différentes.

-La tyndallisation : Il est possible d'arriver à stériliser les matières fragiles, très altérables par la chaleur, en leur faisant subir une série de chauffages à température moins élevée (60°C), séparées par des périodes de repos à la température ordinaire. C'est la tyndallisation. Elle est utilisée pour éliminer les endospores qui ont réactivées en cellules végétatives, éliminées à chaque cycle de chauffage.

-La pasteurisation : Développée par **Pasteur** entre 1866 et 1876. Un chauffage pas très élevé (60°C) permet de détruire la flore pathogène (*Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia*...) et ralentie la croissance des germes d'altération. Elle préserve les qualités nutritives de l'aliment (lait), l'équilibre chimique et les vitamines.

La pasteurisation ne peut être considérée comme une stérilisation, on l'applique à des produits pour préserver les caractères organoleptiques (gout, couleur, odeur, saveur) et en permettant leur conservation pendant une période. On distingue :

-La pasteurisation haute température : Le lait est porté à 90°C pendant 30 secondes puis refroidi à 10°C.

-La pasteurisation basse température : Chauffage à 60 à 70°C pendant des temps plus longs.

***Chaleur sèche :** Elle est utilisée pour certains matériels, ou objets, qu'il n'est pas possible, ou souhaitable, de mettre en contact avec de la chaleur humide. Elle est fournie par des fours électriques, ou à gaz, à circulation d'air. La stérilisation sera effective en maintenant une température de 160 à 180 °C.

b) Les radiations

On a **les rayonnements ionisants** comme les rayons gamma, les rayons X et les faisceaux d'électrons. Ils ont une longueur d'onde très petite et ils transportent plus d'énergie. L'énergie agit sur l'eau des cellules qui sera ionisée avec formation d'ions hydroxyles qui agissent sur l'ADN en le modifiant chimiquement ou en le coupant.

Les rayonnements non ionisants comme les ultraviolets, surtout ceux dont la longueur d'onde est de 270 nm. Ils provoquent la formation de liaisons anormales entre des bases de thymine proches dans l'ADN. Ceci, va induire des problèmes au niveau de la réplication de l'ADN. Les UV du soleil sont moins puissantes et certaines bactéries utilisent des pigments pour s'en protéger.

c) La Filtration

Utilisée pour stériliser des solutions renfermant des substances thermolabiles. Ce système est également appelé stérilisation à froid. Actuellement, les matériaux filtrants utilisés sont des membranes filtrantes d'acétate de cellulose. Ces derniers sont également utilisés pour le dénombrement des microbes dans un liquide.

5.5.2.2. Les agents chimiques

Les agents antimicrobiens chimiques ne peuvent pas tous servir comme désinfectants ou d'antiseptiques. Certains sont très actifs mais toxiques pour les tissus, donc utilisables pour les objets inanimés. D'autres ont un pouvoir de pénétration élevé, solubles mais instables. D'autres encore sont rapidement inactivés au contact des matières organiques.

* Modes d'action

L'activité des agents chimiques vis-à-vis des micro-organismes peut s'exercer selon des modalités extrêmement diverses. On distingue :

-Oxydation et dénaturation des protéines : L'eau oxygénée oxyde les SH libre des enzymes, les sels de métaux lourds se combinent aux SH et inactivent les protéines. L'alcool agit comme la chaleur et coagule les protéines.

-Altération de la membrane cytoplasmique : les agents liposolubles (phénoliques, savons, et surtout détergents) détruisent la membrane plasmique et laissent s'échapper le cytoplasme et ses composants.

-Action sur le métabolisme : Les cyanures et les fluorures attaquent la chaîne respiratoire. Les colorants basiques (bleu de méthylène, violet de gentiane), réagissent avec les acides ribonucléiques. D'autres agents sont mutagènes, comme l'acridine, ou chélateurs comme la quinoléine et ses dérivés.

*Classification

Il est possible de définir un certain nombre de groupes d'agents désinfectants ou antiseptiques sur la base de leur structure chimique et de leur mode d'action précédemment définis. Comme exemples :

-Oxydants : Eau oxygénée, l'eau de javel, l'alcool iodé.

-Alcool : Ethanol dilué à 70% (l'alcool diluée et plus efficace que l'alcool pur)

-Métaux lourds et leurs sels : Les sels d'argent en ophtalmologie, en ORL. Les sels de mercure comme antiseptique de la peau et des muqueuses (Mercurochrome Mercryl, Merseptyl). Le sulfate de cuivre comme antifongique. Ils tuent la cellule en précipitant les enzymes ou en se combinant aux groupements thiols SH.

Ils ont très toxiques pour l'homme. Phénol et Aldéhydes très toxiques pour l'homme, ils ont bactéricides, fongicides et virucides. Ils dénaturent la membrane, l'ADN et les protéines.

-Les savons : leur action est mécanique. Ils augmentent le pouvoir mouillant de l'eau et emprisonnent les germes dans la mousse et les éliminent avec le rinçage. D'autres composés à pouvoir mouillant, très bactéricides ont été synthétisés. Ce sont les détergents ou surfactants.

-Les colorants : Ce sont des antiseptiques à usage local, quelques-uns sont utilisés par voie digestif. Le vert de malachite et le vert brillant pour le traitement des plaies superficielles, le violet de méthyle comme antiseptique urinaire, le violet de gentiane comme désinfectant. On les utilise dans la préparation des milieux de culture pour leurs actions sélectives. Ils sont souvent plus actifs sur les Gram (+) en sélectionnant du coup les Gram (-).

-Stérilisation par les gaz : on les utilise pour stériliser les produits instables à la chaleur, la désinfection des locaux (hôpitaux), ou la stérilisation des objets en plastique comme les boîtes de Pétri et tubes.

5.5.2.3. Les agents chimio-thérapeutiques antimicrobiens

La chimiothérapie c'est-à-dire l'utilisation d'agents chimiques en thérapeutique, pris son véritable essor en 1909 lorsque **Ehrlich** formula le principe de base : pour être utilisable par voie générale dans le traitement des maladies infectieuses, une substance doit être nuisible pour les micro-organismes parasite mais inoffensive pour les cellules hôtes.

Puis en 1929, **Fleming** observe sur une boîte de Pétriensemencée avec des Staphylocoques, des colonies d'une moisissure du genre *Penicillium*, contaminant provoquant une inhibition de la croissance des bactéries en culture. Il mit alors en évidence une substance bactériostatique utilisable en thérapeutique, c'est la pénicilline.

➤ Définition des antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances produites par des champignons ou des bactéries, et qui sont capables de tuer les micro-organismes sensibles (effet bactéricide) ou d'inhiber leur croissance (effet bactériostatique).

On compte aujourd'hui plus de deux mille sortes d'antibiotiques, pour la plupart encore fabriqués à partir de micro-organismes. Certains antibiotiques semi-synthétiques correspondent à la modification chimique d'antibiotiques naturels. D'autres enfin sont produits synthétiques.

Depuis leur découverte, les antibiotiques ont radicalement modifié le pronostic des maladies bactériennes et permis de guérir des maladies mortelles, telles les endocardites bactériennes, la syphilis et les méningites tuberculeuses.

➤ **Classification des antibiotiques**

Selon leurs actions antimicrobiennes, deux catégories d'agents antimicrobiens sont rencontrées:

- **Les antibiotiques statiques** : Agents qui inhibent la croissance, tels que : Bactériostatique et fongistatique.

- **Les antibiotiques germicides** qui détruisent totalement les germes pathogènes mais pas nécessairement les endospores, tels que : Bactéricides, fongicides, algicides et virucides.

La classification des antibiotiques peut être fondée aussi sur le spectre d'activité, deux groupes d'antibiotiques sont alors distingués ; **les antibiotiques à large spectre** et ceux à **spectre étroit**.

La classification chimique est la plus souvent utilisée, elle repose sur la composition chimique de chaque antibiotique (**Tableau IV**).

Tableau IV : Principales familles d'antibiotiques et leurs modes d'actions (**Meyer et al., 2004**).

Familles	Mode d'action	Effets secondaires	Action sur bactéries à Gram + et/ou -
Les BETALACTAMINES	Action bactéricide	Diarrhée, allergie, toxicité digestive, rénal...	GRAM +/-
Les AMINOSIDES	Action bactéricide	Toxicité au niveau de l'audition et rénale.	GRAM +/-
Les MACROLIDES	Action bactériostatique	Allergie, troubles digestifs, toxicité hépatique...	GRAM +
Les LINCOSAMIDES	Action bactériostatique	Allergie, troubles digestifs, toxicité hépatique...	GRAM +/-
Les SYNERGISTINES	Action bactériostatique	Allergie, troubles digestifs, toxicité hépatique...	GRAM +/-
Les TETRACYCLINES	Action bactériostatique	Allergie, toxicité digestive, rénale, au niveau neuronal...	GRAM +/-
Les QUINOLONES	Action bactéricide	Réaction allergique, toxicité auditive, tendinite ...	GRAM -
Les SULFAMIDES	Action bactériostatique	Allergie, toxicité sanguine, rénale...	GRAM -
Les GLYCOPEPTIDES	Action bactéricide	Réaction allergique	GRAM +
Les CHLORAMPHENICOL	Action bactériostatique	Réaction allergique	GRAM +/-
Les IMIDAZOLES	Action bactéricide	Réaction allergique	GRAM +/-
Les POLYMYXINES	Action bactéricide	Réaction allergique	GRAM -
AUTRES	En fonction de l'antibiotique	Divers en fonction de l'antibiotique.	GRAM +/-

➤ **Mode d'action**

Les cibles habituellement visées par l'action des antibiotiques sont celles qui constituent un élément indispensable et constant pour la survie de la cellule bactérienne. La paroi bactérienne, la membrane, l'ADN et les ribosomes sont des sites d'action des antibiotiques (Fig. 35).

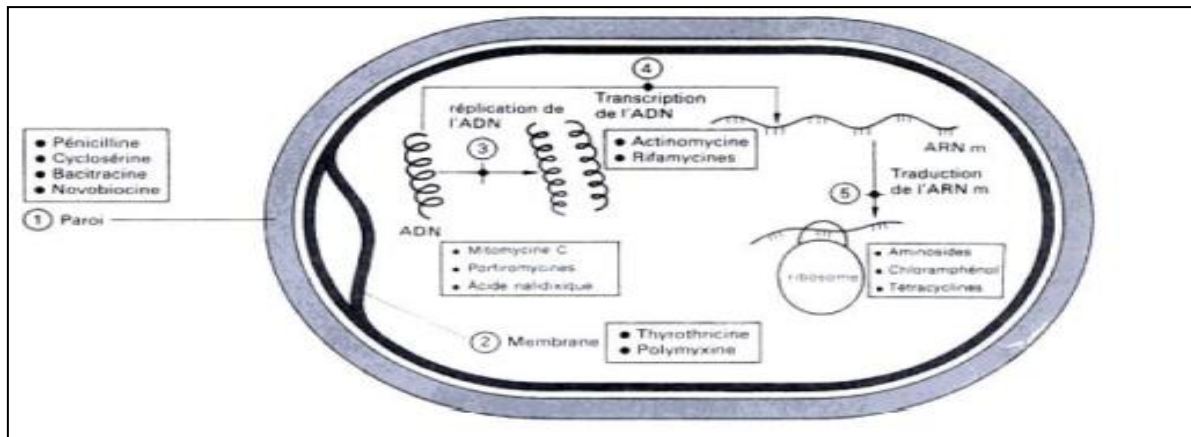


Figure 36 : Schéma des sites d'action des antibiotiques (Meyer *et al.*, 2004).

a) L'Action des antibiotiques sur la paroi bactérienne comprend :

- La fixation sur des enzymes responsables de la synthèse de la paroi (B-lactamines, Exemple: pénicilline)
- Le blocage de la synthèse du peptidoglycane en se fixant sur un précurseur (Glycopeptides)
- L'inhibition de la synthèse intra-cytoplasmique du peptidoglycane (Fosfomycine)

b) Lésion de la membrane cytoplasmique : Exemple : Polymyxines qui est actif exclusivement sur les bactéries Gram négatives.

c) L'action sur l'ADN qui se traduit par :

- Inhibition de l'ADN topoisomérases dont l'ADN gyrase. Exemple : Quinolones et fluoroquinolones
- Action sur l'hydrofolate réductase et inhiber la synthèse de purine. Exemple: Sulfamides, triméthoprime
- Fragmentation de la double hélice d'ADN. Exemple: Imidazolés

- Fixation à l'ARN polymérase ce qui bloque la transcription de l'ADN en ARN. Exemple : Rifamycines

d) Interruption de la synthèse des protéines : Ex : Aminoside et tetracycline interviennent au niveau de la sous unité 30S du ribosome, l'acide fucidique et phénicol se fixent sur la sous unité 50S.

➤ **Résistance aux antibiotiques**

Une bactérie est dite résistante à un antibiotique, lorsqu'elle est capable de se développer en présence d'un taux d'antibiotique plus élevé que le taux habituel maximum utilisé en thérapeutique.

L'usage abusif des antibiotiques a permis l'apparition et l'évolution progressive de la résistance microbienne aux différents antibiotiques. Deux types de résistance aux antibiotiques sont connus, la résistance bactérienne naturelle et la résistance acquise.

a. Résistance naturelle

Les bactéries naturellement résistantes aux antibiotiques possèdent un arsenal génétique sur le chromosome bactérien. Suite aux divisions cellulaires, les gènes de résistance sont transmis d'une génération à l'autre. Donc, la résistance naturelle est présente chez tous les individus de la même espèce par exemple : les Entérobactéries et *Pseudomonas* résistent naturellement aux macrolides.

b. Résistance acquise

Pour les bactéries ayant des résistances acquises, l'information génétique est localisée dans le chromosome bactérien et/ou supportée par les plasmides de résistances. La transmission de ce type de résistance est assurée par trois mécanismes, la transduction qui nécessite l'intervention d'un vecteur viral (phage), la transformation d'ADN exogène nu et son incorporation au génome de la bactérie en phase de compétence et la conjugaison entre une bactérie donatrice et une bactérie réceptrice.

Chapitre 6: Notions de mycologie et de virologie.

6.1. Mycologie

La **mycologie** est la science qui étudie les champignons microscopiques ou mycètes.

Les **champignons** ou mycètes constituent un règne très important, dont seul un petit nombre de représentants sont pathogènes pour l'homme. Ce sont des protistes supérieurs, immobiles, unicellulaire (levures) ou pluricellulaires (moisissures). Le type respiratoire des champignons est **aérobie**, à l'exception de ceux que l'on trouve dans le tube digestif des mammifères. Les levures sont **anaérobies facultatives**. Du point de vue des facteurs physicochimiques, les mycètes sont mésophiles, température optimale de croissance entre 25 et 35°C. Le maximum observé est de 62°C. Ils tolèrent des milieux acides.

Ce sont des **hétérotrophes**, ils utilisent la matière organique comme source d'énergie, d'électrons et de carbone. Ils oxydent la matière organique pour puiser l'énergie nécessaire à leur développement et croissance. Les molécules simples sont absorbées directement (acides aminés, monosaccharides). Les molécules plus complexes sont hydrolysées à l'extérieur par un équipement enzymatique sécrété ou associé à la paroi.

6.1.1. Morphologie et structure

L'organisation cellulaire des champignons est appelée **thalle**. Chez les champignons microscopiques, le thalle peut être unicellulaire (levures) qui sont des organismes souvent associés en agrégats de plusieurs cellules, ou filamenteux (moisissures) qui sont des organismes filamenteux enchevêtrés, sous forme mycéliennes (**Fig. 36**). Les champignons dimorphes : peuvent exister sous forme de levures ou de moisissures, selon les conditions du milieu.

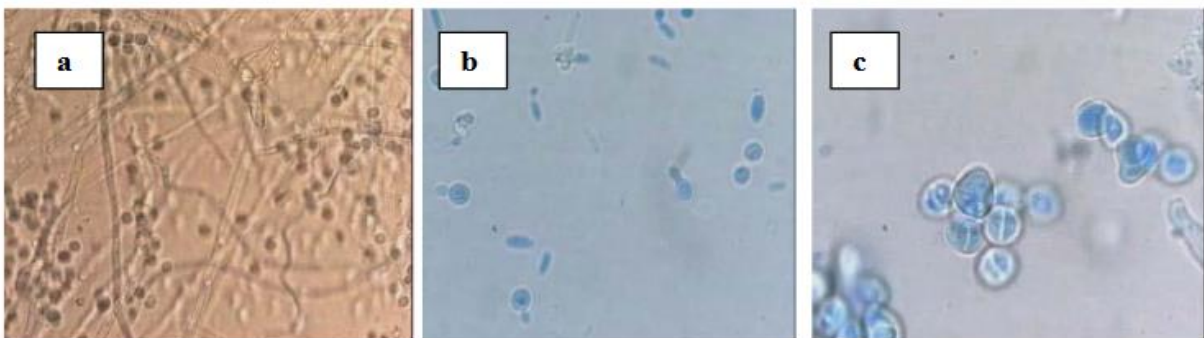


Figure 37 : a/Moisissure (thalle filamenteux), b et c/Levures (thalle unicellulaire)
(Schaechter, 1999)

6.1.1.1. Levures

Champignons unicellulaires, possède un noyau. Les levures ont des formes sphériques, allongées, cylindriques ou ovoïdes (caractéristique de *Saccharomyces cerevisiae*) et sont dites levuriforme.

Les levures ont une taille généralement comprise entre 10 et 50µm. Certaines levures sont toutefois capables de former des structures filamenteuses (pseudomycélium) dans certaines conditions (**Fig. 38**).

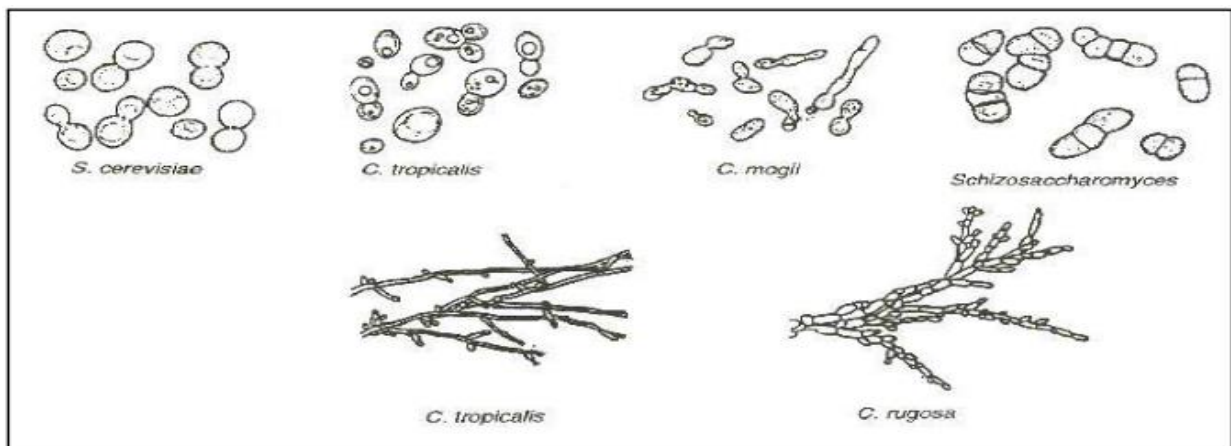


Figure 38 : Morphologie des levures (S : *Saccharomyces*, C : *Candida*) (Meyer *et al.*, 2004).

Les levures possèdent une paroi rigide responsable de leurs formes et constituée principalement de polysaccharides (80% dont principalement la chitine, polymère de N-acétyl glucosamine) et de protéines (10 à 20%). La membrane plasmique est composée de stérols (riche en ergostérol et zymostérol), Le cytoplasme, de pH égal à 5, contient de nombreuses enzymes, des réserves (glycogène) et des organites intracellulaires caractéristiques des cellules eucaryotes : réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, mitochondries, vacuoles et ribosomes. Le noyau contient 16 chromosomes chez *Saccharomyces cerevisiae*. Des plasmides sont présents chez la plupart des levures.

6.1.1.2. Les moisissures

Les moisissures sont pluricellulaires sous forme d'un amas de filaments enchevêtrés et ramifiés, appelés **hyphes**. L'ensemble des hyphes constituent le mycélium ou thalle (les champignons sont aussi appelés **thallophytes**).

L'hyphe a un diamètre moyen de $5\mu\text{m}$, il constitue la structure de base du mycélium, et se compose d'une paroi rigide composée de chitine associée à des protéines, des lipides, de polyphosphates et des ions inorganiques.

Les thalles filamenteux peuvent être siphonnés (Les cellules ne sont pas séparées par des cloisons transversales) ou cloisonnés (le thalle est cloisonné par des séparations transversales appelées septa (septa : pluriel de septum) (**Fig. 39**).

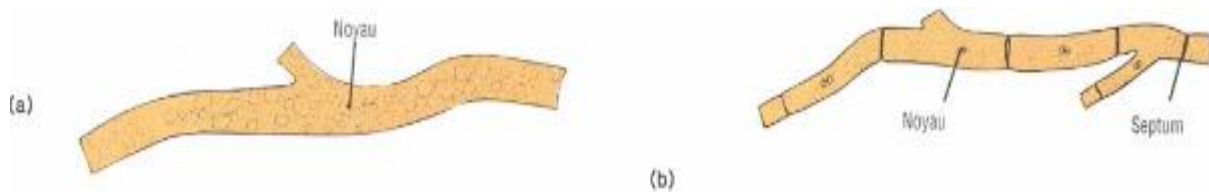


Figure 39 : a) thalle siphonné b) thalle cloisonné (Prescott *et al.*, 2003).

6.1.2. Taxonomie

Les quatre principaux embranchements des champignons vrais (eumycètes) se distinguent par leur mode de reproduction :

-Les zygomycètes peuvent avoir une reproduction sexuée, les zygotes se formant par fusion des extrémités des filaments (gamétanges). On trouve parmi eux les genres pathogènes *Mucor* et *Absidia*.

-Les basidiomycètes possèdent des spores sexuées externes produites par des cellules en forme de massue appelées basides (*Oyptococcus neoformans* est la forme levure d'un champignon basidiomycète).

-Les ascomycètes forment des spores sexuées à l'intérieur d'un asque; *Piedraiahortae* est un pathogène appartenant à cet embranchement. Les principaux pathogènes humains appartiennent à l'embranchement des deutéromycètes, aussi appelés champignons imparfaits (*Fungi imperfecti*), car on n'a pas pu mettre en évidence chez eux de reproduction sexuée. En revanche, ils forment des spores ou conidies. Les *Fungi imperfecti* comprennent les genres *Epiderinophyton*, *Candida* et *Pityrosporum*.

Cependant, on utilise une classification plus pratique basée sur l'association à des maladies : mycoses superficielles, sous-cutanées ou systémiques. Bien que les genres *Actinomyces* et *Nocardia* soient formés de bactéries ramifiées, ils ont été placés ici par commodité.

6.1.3. Reproduction

La reproduction des champignons est complexe, reflétant ainsi l'hétérogénéité de leur mode de vie. Elle peut être sexuée ou asexuée, bien que certains champignons alternent entre les deux types de reproduction.

6.1.3.1. La reproduction asexuée

Elle s'effectue avec des cellules à $2n$ chromosomes donnant des individus identiques aux premiers. Ces cellules peuvent être produites par le thalle et dites « spores asexuées » ou « conidies », ou formées par différenciation d'un élément préexistant du thalle (ex : les hyphes) ; elles sont qualifiées alors de « thallospores ». Les spores sont produites directement sur les filaments mycéliens (section des Sporotrichés), sur des sporophores (section des Sporophorés) ou par des phialides (section des Phialidés).

La majorité des champignons produisent des spores asexuées immobiles, mais certains sont capables de produire des spores flagellées dites « zoospores », comme les Chytridiomycètes et les Oomycètes. Selon le type de différenciation, les mycètes forment quatre types de thallospores (**Fig. 40**) :

- Les arthrospores : formées par fragmentation (désarticulation, amputation) du thalle. Exemple : *Geotrichum*.
- Les blastospores : formées par bourgeonnement du thalle. Exemple: *Blastomyces*.
- Les chlamydo-spores : sont des cellules de résistance, formées quand les conditions sont défavorables. Elles ont un contenu lipidique dense et une paroi épaisse. Les chlamydo-spores peuvent être intercalaires ou terminales. Exemple : *Fusarium*, *Candida*.
- Les dictyospores : formées par plusieurs divisions successives d'un élément préexistant. Exemple : *Alternaria*.

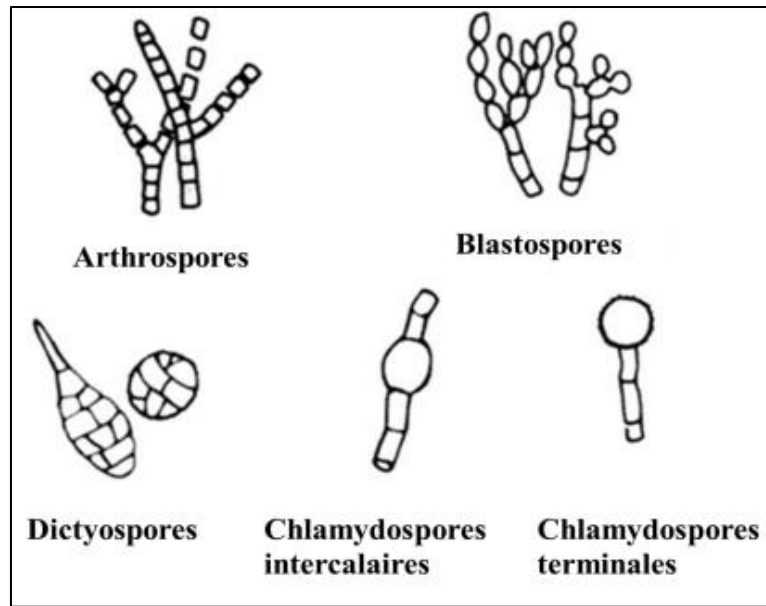


Figure 40 : Les types de thallospores (Bennett & Ciegler., 1983).

6.1.3.2. La reproduction sexuée

Elle joue un rôle très important dans la classification des champignons. Quatre types de cellules de reproduction sexuée sont connus (**Fig. 41**) :

- **Les ascospores** : Elles sont formées dans des structures spécialisées dites « asques ». Une fois mûres, les ascospores se placent à l'extrémité des asques et sont libérées à l'extérieur par contraction de ces derniers. Ce mode de reproduction est caractéristique des Ascomycètes.
- **Les basidiospores** : Ce sont des cellules formées à l'extérieur des « basides » et portées par des filaments fins dits « stérigmates ». Après maturité, les stérigmates se brisent (par la pluie, le gel, le vent, le poids des spores, etc.) et libèrent les basidiospores. Ces cellules sont caractéristiques des Basidiomycètes.
- **Les oospores** : Elles sont formées chez les thalles plasmodiaux par la fusion de deux sporocystes de sexes opposés (l'oogone et le spermatocyste). La fécondation se fait à l'intérieur de l'oospore. Cette forme de reproduction est rencontrée chez les Oomycètes.
- **Les zygosporés** : Elles sont formées aussi par la fusion de deux sporocystes de sexes opposés. Elles sont rencontrées chez les moisissures à thalle siphonné : les Zygomycètes. Les 5 zygosporés sont portées par des sporophores qui se différencient en « suspenseurs ». Comme pour l'oospore, la fusion se fait à l'intérieur.

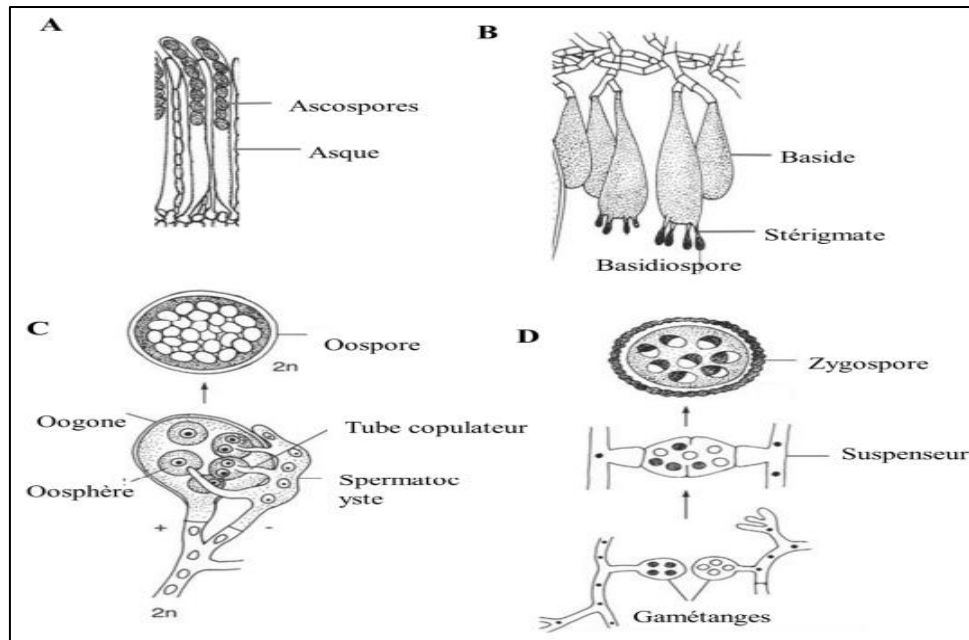


Figure 41 : Les cellules de reproduction sexuée. **A** : Ascospores, **B** : Basidiospores, **C** : Formation de l'oospore, **D** : Formation de la zygosporangium (**Ripert, 2013**).

6.2. Virologie

La virologie a une très courte histoire, de moins d'un siècle, au cours de laquelle le concept de virus a progressivement évolué, au fur et à mesure du développement des techniques d'étude. Si la virologie a eu, au début, partie liée avec la bactériologie, elle s'en est individualisée progressivement, pour devenir, assez récemment, une discipline autonome.

Le terme de virus, qui en latin signifie « poison, écoulement, puanteur », fut employé par les premiers microbiologistes, tel **Pasteur**, avec un sens large d'agent de maladie infectieuse. De lui sont dérivés d'ailleurs les termes de virulent (en latin : virulentus) et de virulence (virulentia). Pendant longtemps, le nom de « virus » fut donné au produit invisible d'une sécrétion morbide, ayant ordinairement pour véhicule le pus, le mucus, une matière séreuse ou le sang.

6.2.1. Définition

Les virus sont les plus petits et les plus primitifs des agents infectieux conventionnels. Ils diffèrent de la plupart des bactéries, champignons et protozoaires par le fait qu'ils sont des parasites intracellulaires obligés. Les virus ne disposent pas de l'équipement enzymatique nécessaire pour leur répllication.

Pour se reproduire, ils doivent donc « pirater » les réserves énergétiques de la cellule hôte, ses nucléotides, ses acides aminés, ses lipides, ainsi que ses voies métaboliques de biosynthèse. En fait, la plupart des virus possèdent des facteurs qui détournent les processus métaboliques des cellules hôtes, au profit de la production de nouvelles particules virales. Ceci est en partie responsable de la mort des cellules infectées, et contribue aux manifestations cliniques infectieuses.

6.2.2. Morphologie et structure

Les virus sont le plus souvent de petite taille entre 10 et 400nm. 100 fois plus petits qu'une bactérie, non visibles en microscopie optique.

La plupart des virus ont une structure générale **hélicoïdale** ou icosaédrique, d'autre comme les bactériophages ont des symétries plus complexes. Ces derniers possèdent une structure de tête qui est un icosaèdre allongé. Un collier relie cette tête à un tube creux avec une symétrie hélicoïdale se terminant par une plaque de base complexe, avec des fibres. Certains virus à enveloppe, comme celui de la grippe, sont polymorphes et n'ont pas de symétrie particulière (Fig. 42).

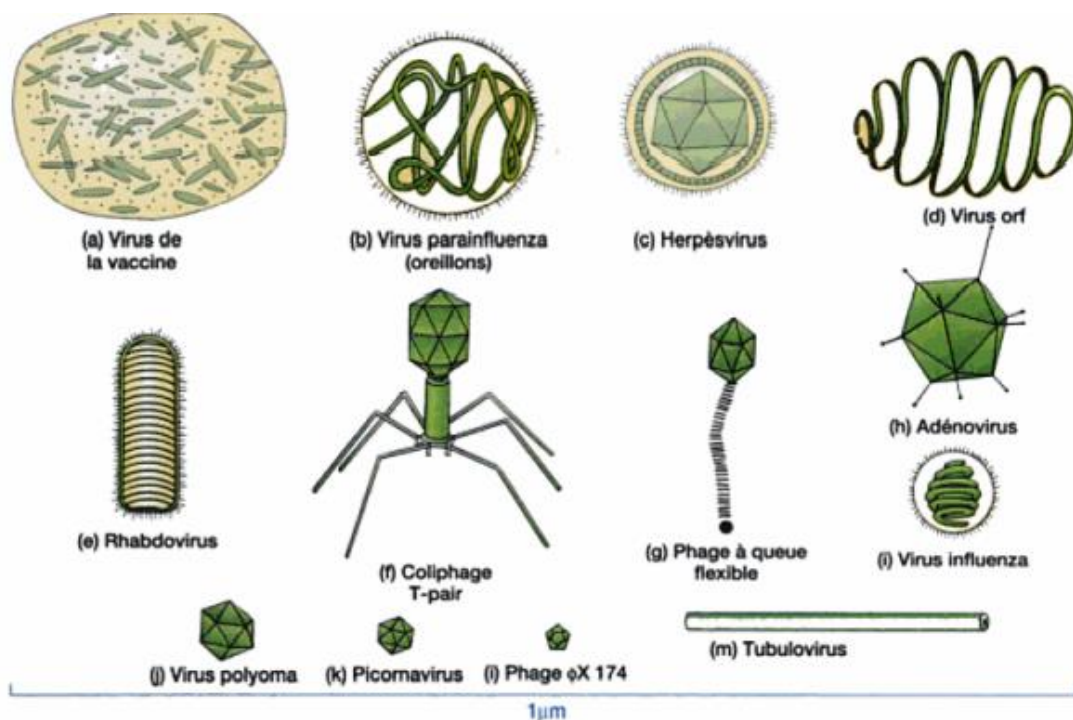


Figure 42 : Structure et morphologie des principaux virus (Prescott *et al.*, 2003).

Le virus est composé de :

6.2.2.1. Génome

a) Les virus à ADN

Les virus à ADN sont génétiquement stables et possèdent (comme par exemple les Herpes virus et le virus de la variole) souvent de grands génomes comprenant une quantité considérable d'informations génétiques.

La majorité des virus à ADN sont à double brin et se présentent sous une forme de filament linéaire avec des extrémités définies, ou sous forme d'anneau (circulaire).

b) Les virus à ARN

Les virus à ARN possèdent, en règle générale, un génome à un brin (ss, pour single strand), sujet à une fréquence de mutation élevée car les ARN polymérases n'ont pas les fonctions de correction d'erreurs des ADN polymérases. La taille du génome et son équipement génétique sont ainsi limités. Par contre, les virus à ARN, grâce à la mutation et à la sélection, ont une grande capacité d'adaptation.

Des virus à ARN double brin existent mais restent des exceptions. Les virus à ARN simple brin sont divisés en deux classes, en fonction de la polarité de leur génome. Les virus à ARN simple brin positif [virus (+) ssARN] possèdent un génome ARN à polarité positive, contenant les séquences codantes et servant directement d'ARN messager (ARNm). Les virus à ARN simple brin négatif [virus (-) ssARN] portent un ARN non codant, de polarité négative.

6.2.2.2. Capside

La capsid est constituée de protéines virales et englobe l'acide nucléique génomique. La capsid se compose de sous-unités appelées capsomères. Les capsomères pour leur part sont constitués d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques codées par le virus. La capsid et l'acide nucléique sont en relation plus ou moins étroite. Chez beaucoup de virus, la capsid entoure le génome comme un manteau de protéine. Chez d'autres virus, il existe une liaison intime entre l'acide nucléique et les protéines de la capsid. Dans ce cas, les deux entités sont regroupées sous le nom de nucléocapsid. Les capsides de nucléocapsides sont organisées selon des plans de construction stricts.

La capsid virale remplit des fonctions essentielles. Parmi celles-ci, on trouve la protection de l'acide nucléique génomique contre les influences de l'environnement, et des étapes importantes dans l'infection de la cellule hôte. Les protéines de la capsid déterminent, chez les virus sans enveloppe, la spécificité de l'hôte et le tropisme cellulaire.

6.2.2.3. Enveloppe

La capsid de certains virus est entourée d'une enveloppe. Elle provient soit de la membrane plasmique de la cellule hôte, soit de membranes intracellulaires, essentiellement de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique.

L'enveloppe porte des glycoprotéines virales qui, lors de l'infection, sont sélectivement incorporées dans les membranes cellulaires correspondantes et qui sont responsables, par la suite, de l'amarrage du virus à sa cellule cible et de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire de l'hôte. Les glycoprotéines membranaires de l'enveloppe virale servent de point d'attaque aux anticorps neutralisants et sont soumises à une forte pression de sélection de la part du système immunitaire. Les virus enveloppés sont sensibles aux influences extérieures comme la dessiccation et la chaleur. Ceci a une influence sur les voies de transmissions. Les virus nus sont, en règle générale, plus résistants que les virus enveloppés.

6.2.3. Classification des virus

Bien qu'il existe plusieurs paramètres qui permettent de différencier et classer les virus, le Comité International de la Taxonomie des Virus (CITV) en a déterminé seulement trois principaux et a divisé les virus en familles (Tableau 6). Chaque famille contenait différents genres et espèces. Par la suite, les familles qui avaient des similitudes entre elles ont été regroupées en ordres.

Les caractéristiques principales sur lesquelles s'est basé le CITV pour classer les virus étaient:

- Le type d'acide nucléique : sa nature (ADN ou ARN), sa structure (bicaténaire ou monocaténaire, de polarité positive ou négative) et sa forme (linéaire ou circulaire, segmentée ou non segmentée)
- Le mode de réplication
- La morphologie de la capsid et la présence ou absence de l'enveloppe.

Tableau V : Les principales classes des virus (Nicklin *et al.*, 2000).

Familles	Caractéristiques	Agents représentants
Poxviridae	ADN double brin, particules en forme de briques. (Ce sont les plus grands virus).	Virus vaccinal Virus de la variole
Herpesviridae	ADN double brin, capsidie icosaédrique, virus enveloppés.	Virus herpès simplex Virus varicelle-zona <i>Cytomegalovirus</i> Epstein-Barr virus
Adenoviridae	ADN double brin, capsidie icosaédrique avec structure fibreuse, sans enveloppe.	Les Adénovirus
Papovaviridae	ADN double brin circulaire, 72 capsomères dans la capsidie, sans enveloppe.	<i>Papillomavirus</i> humains
Hepadnaviridae	ADN complet à brin négatif avec une protéine 5' terminale, ADN rendu circulaire par un brin positif incomplet, particules enveloppées.	Virus de l'hépatite B
Orthomyxoviridae	Huit segments d'ARN simple brin, capsidie hélicoïdale, particules enveloppées avec des épines.	Virus influenza
Retroviridae	ARN simple brin, capsidie icosaèdre, virus enveloppés, avec une rétro-transcriptase.	HTLV-1 (Human Lympho-Trophic Virus) HIV (Virus de l'Immunodéficience Humaine)
Rhabdoviridae	ARN simple brin, capsidie en forme de balle, particules enveloppées.	Virus de la rage
Togaviridae	ARN simple brin, capsidie icosaèdre, sans enveloppe.	Virus de la rubéole <i>Arbovirus</i>
Reoviridae	ARN double brin formé de 10 à 20 segments, virus icosaèdes, sans enveloppe.	<i>Rotavirus</i>

6.2.4. Multiplication des virus

Un virus est incapable par lui-même de synthétiser un autre virus. Pour se multiplier, il n'a que son génome et doit l'introduire dans une cellule hôte et il détourne à son profit le métabolisme énergétique, les structures et les systèmes enzymatiques de synthèse des protéines et des acides nucléiques. C'est donc la cellule infectée qui va fabriquer de nouveaux virus, selon un procédé de biosynthèse et de réplication. Le cycle général d'évolution d'infection virale se déroule en plusieurs étapes chronologiques (**Fig. 43**).

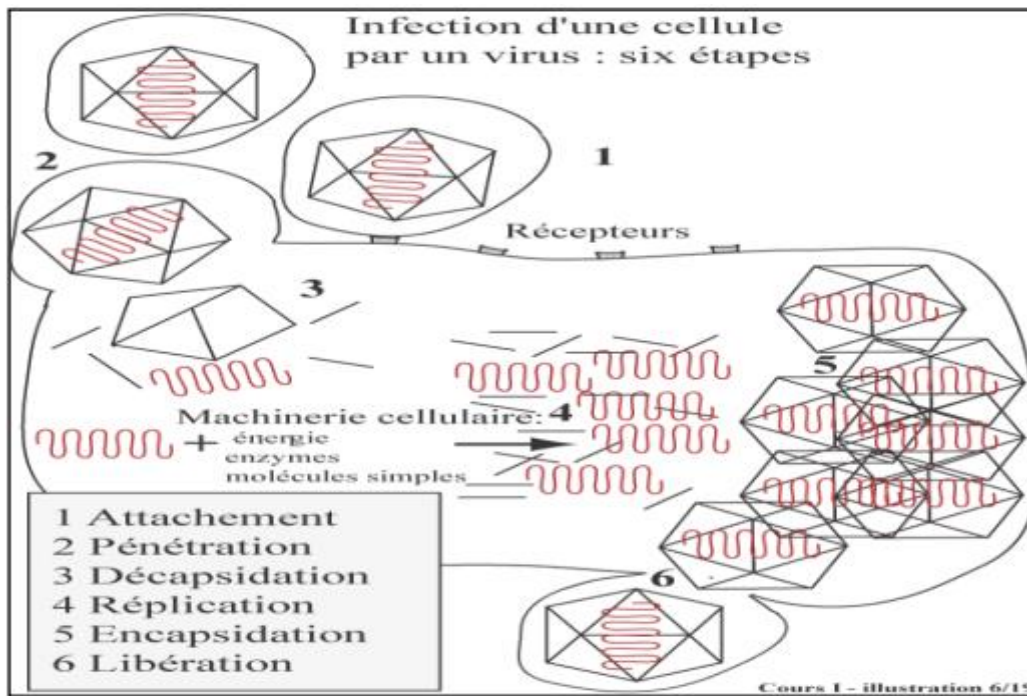


Figure 43 : Schéma du cycle viral.

a) Attachement ou adsorption

Le cycle viral commence par l'attachement de la surface virale à la surface cellulaire. Il se fait par des protéines de la capsid pour les virus nus, par des glycoprotéines de l'enveloppe pour les virus enveloppés. Ces protéines ou glycoprotéines s'attachent à des récepteurs spécifiques situés sur la membrane cytoplasmique de la cellule hôte. L'adsorption résulte de la complémentarité spécifique des sites de fixation du virus et des récepteurs de la cellule hôte.

b) Pénétration

Le virus pénètre à l'intérieur de la cellule. Pour les virus nus, cela survient essentiellement par un processus d'endocytose. Pour les virus enveloppés, cela s'effectue par endocytose ou directement par fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cytoplasmique, processus dénommé fusion-lyse. Les virus infectant les animaux sont incorporés à travers la membrane cellulaire, dans le cytoplasme intervient leur décapsidation. Quand aux virus des végétaux et aux bactériophages, ils doivent traverser la paroi avant d'atteindre la membrane cytoplasmique.

c) Décapsidation

Les structures virales sont ensuite dégradées, à l'exception du génome qui, débarrassé de la capsidite, se trouve libéré dans la cellule. Il est nécessaire que la capsidite soit détruite, pour que le génome puisse interagir avec la machinerie cellulaire.

d) Réplication

La multiplication des virus se fait, selon sa localisation, dans le cytoplasme ou à l'intérieur du noyau. La réplication du génome viral se fait par des mécanismes différents selon sa nature (ADN ou ARN) et synthèse des protéines de la capsidite par les structures enzymatiques de la cellule infectée et indépendamment de son ADN.

e) Encapsidation

La réplication des virus aboutit à la multiplication séparée des différents composants de la particule virale (acide nucléique et éléments de la capsidite). Les nouveaux génomes fabriqués par la cellule s'entourent de nouvelles protéines virales elles-aussi fabriquées par la cellule. Cet emballage est l'encapsidation (l'inverse de la décapsidation) des génomes donnant ainsi de nouvelles particules virales identiques au virus infectant.

f) Libération

Les nouveaux virus sont libérés par la cellule par éclatement (lyse et donc la mort de la cellule hôte) cellulaire pour les virus nus, par bourgeonnement au niveau de certaines zones de la membrane nucléaire ou cytoplasmique, pour les virus enveloppés. C'est lors du bourgeonnement que les virus enveloppés reçoivent leur enveloppe formée de la membrane de la cellule hôte mais cette dernière est modifiée par l'incorporation de protéines codées par l'acide nucléique viral.

Les références bibliographiques

Baudry S., Brezellek H., (2006). Microbiologie-immunologie : exercices d'application. 4ème Edition. Cahiers du préparateur en pharmacie. France.

Bennett JW, Ciegler A. (1983). Secondary metabolism and differentiation in Fungi. Editions CRC Press. Pages : 1-170.

Botton B, Breton A, Fevre M, Gauthier S, Guy Ph, Larpent JP, Reymond P, Sanglier JJ, Vayssier Y, Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. 2e Edition Masson. Pages : 16-400.

Brock T.D. (1970). Biology of Microorganisms. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

Burdon K.L., & Williams R.P. (1968). Microbiology. The Macmillan Co., New York.

Burrows W., Moulder J.W., Lewert R.M., & Rippon, J.W. (1968). Textbook of Microbiology. W.B. Saunders Co., Philadelphia.

Busch A.W. (1971). Aerobic Biological Treatment of Waste Waters. Oligodynamics Press, Houston, Texas.

Carpenter P .L. (1967). Microbiology. W. B. Saunders Co., Philadelphia.

Cruickshank R. (1972). Medical Microbiology : A Guide to the Laboratory Diagnosis and Control of Infection. Churchill; Livingstone, Edinburgh & London.

Dedet J.P., (2007). La microbiologie, de ses origines aux maladies émergentes. Préface de Luc Montagnier. Dunod. Paris.

Denis F, Ploy M.C, Martin C, Bengen E, Quentin R. (2011). Bactériologie médicale Techniques usuelles, 2ème édition, , Elsevier Masson SAS, Paris.

Fasquelle R. (1970). Eléments de bactériologie medicale. Flammarion, Paris.

Fasquelle R. (1971). Eléments de virologie medicale. Flammarion, Paris.

Frobisher M. (1969). Fundamentals of Microbiology. W. B. Saunders Co., Philadelphia.

Frobisher M., Sommermeyer, L., & Fuerst, R. (1969). Microbiology in Health and Disease. W.B. Saunders Co., Philadelphia.

Gaden E.L. (1969). Global Impacts of Applied Microbiology. Biotechnology and Bioengineering Symposium, Interscience Publishers, New York.

Gebhardt L.P., & Anderson D.A. (1965). Microbiology. The C.V. Mosby Co., Saint Louis.

Golvan Y.J. (1969). Eléments de parasitologie medicale. Flammarion, Paris.

Guyon, R. (1961). Précis de bactériologie. G. Doin & Cie, Paris.

Hart T., Shears P. (1997). Atlas de microbiologie. 1^{er} édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris.

Javillier M., et al. (1972). Traite de biochimie générale. Tome III, fasc. III, Masson & Cie, Paris.

Jawetz E., Melnick J.L. & Adelberg E.A. (1972). Review of Medical Microbiology. Lange Medical Publications, Los Altos, California.

Lamanna C., & Mallette F. (1965). Basic Bacteriology. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Lambin S., & Germain A. (1969). Précis de microbiologie. Masson & Cie, Paris.

Larpent J.P., & Larpent-Gourgaud, M. (1970). Microbiologie pratique. Hermann, Paris.

Laskin A.I., & Lechevalier H.A. (1973). Handbook of Microbiology. Press Division of Chemical Rubber Co., Cleveland.

Leclerc H. (1969). Microbiologie. Doin, Deren & Cie, Paris.

Lehninger A.L. (1973). Biochimie. Flammarion, Paris.

Meyer A., Deiana, J. & Leclerc, H. (2004). Cours de microbiologie générale : avec problèmes et exercices corrigés. Paris: Doin.

Nicklin J, Graeme Cook K, Paget T, Killington R. (2000). L'essentiel en microbiologie. Editions Berti. P : 213-353.

Polonovski M. et al. (1972). Biochimie médicale. Masson & Cie, Paris.

Prescott L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A. (2003). Microbiologie. De Boeck.

Prescott L.M., Willey J.M., Sherwood L., Woolverton, C.J. & Prescott, L.M. (2013). Microbiologie. De Boeck, 4ème édition.

Prevot A.R. (1961). Traite de systématique bactérienne. Tomes I et 11, Dunod, Paris.

Ripert C. (2013). Mycologie médicale. 2e Editions Technique & Documentation Lavoisier. Pages : 1-48.

Schaechter M, (1999). Microbiologie et pathologie infectieuse, 2ème édition, De Boeck & larcier. Paris.

Schapira G. (1970). Eléments de biochimie générale. Flammarion, Paris.

Senez J .E. (1968). Microbiologie générale. Doin, Deren & Cie, Paris.

Stanier R.Y., Doudoroff M., & Adelberg, E.A. (1966). Microbiologie générale. Masson & Cie, Paris.

Tortora J., Funk B.F. and Case Ch.I. (2003). Introduction à la microbiologie. ISBN.Canada.

Weinmen S, Méhul P. (2004). Toute la biochimie : Cours ; Licence, PCEM, Pharmacie. Dunod, Paris.