الجمهوريةالجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
—
Université
Yahia FARES de MEDEA

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
—
جامعةيحي فارس بالمدية

Faculté des Sciences

كليــة العلــوم

N°:……/CSF/2018

POLYCOPIE DE COURS

«MICROBIOLOGIE GÉNÉRALE»

Auteur :

Dr. ARBIA Wassila

Destiné aux étudiants de

Discipline : Chimie

Spécialité : Chimie pharmaceutique

Niveau : 1ère année master

Année : 2019- 2020

Approuvé par le Conseil Scientifique de la Faculté en date du :

Liste des figures

Chapitre I Le monde microbien

Figure 1 : Le microscope découvert par *Antony Van Leeuwenhoek*……. 2
Figure 2 : expériences sur la théorie microbienne (concept de la génération spontanée)……. 3
Figure 3 : Principe de la vaccination…… 3
Figure 4 : La répartition des microorganismes parmi les êtres vivants…… 5
Figure 5 : La structure d'une cellule eucaryote…… 6
Figure 6 : La structure d'une cellule procaryote…….. 6

Chapitre II Morphologie et structure des microorganismes

Figure 1 : Microscope optique simple…….. 10
Figure 2 : Microscope à fond noir…… 11
Figure 3 : Microscope à contraste de phase……. 11
Figure 4 : Construction de l'image (a) claire (b) foncée…….. 12
Figure 5 : Microscope à fluorescence…….. 12
Figure 6 : Microscope confocale à balayage laser……... 13
Figure 7 : Principe du microscope électronique à transmission……... 14
Figure 8 : Observation des coupes fines de cellule bactérienne par microscope électronique à transmission…….. 15
Figure 9 : Microscope électronique à balayage……... 15
Figure 10 : Séparation des constituants cellulaires par ultracentrifugation……. 16
Figure 11 : Exemples de taille chez les bactéries……. 17
Figure 12 : Les bactéries sous forme de coques……... 18
Figure 13 : Les bactéries sous forme de bâtonnets…….. 18
Figure 14 : Les actinomycètes……. 18
Figure 15 : Les spirilles…… 19
Figure 16 : La cellule procaryote……. 19
Figure 17 : Les structures de l'ADN chez la cellule bactérienne……. 20
Figure 18 : Les constituants d'un nucléotide de l'ADN…….. 21
Figure 19 : La réplication semi-conservative des nucléotides de l'ADN…… 22
Figure 20 : La réplication bidirectionnelle des nucléotides de l'ADN…… 22
Figure 21 : La structure en θ de la réplication bidirectionnelle des nucléotides de l'ADN…… 22

Figure 22 : Le mécanisme de la réplication de l'ADN : principe de la restriction…….. 24
Figure 23 : La synthèse d'une nouvelle chaîne d'ADN par une amorce nucléotidique ARN……... 24
Figure 24 : L'origine de la réplication de l'ADN chez les procaryotes…… 25
Figure 25 : L'action des hélicases dans le déroulement de la double hélice à l'avant de la fourche de réplication de l'ADN……... 25
Figure 26 : L'action de la protéine de liaison dans la stabilisation de l'ADN formé…… 26
Figure 27 : Mécanisme de synthèse et d'élimination de l'amorce ARN et le remplacement par l'ADN…….. 27
Figure 28 : Synthèse des protéines par le mécanisme de traduction chez les ribosomes.. 27
Figure 29 : Rôles de la membrane plasmique……... 28
Figure 30 : Composition chimique de la membrane plasmique…… 29
Figure 31 : Répartition des groupements hydrophiles et hydrophobes à travers la membrane plasmique……. 29
Figure 32 : Composition de la paroi des bactéries Gram positif……... 30
Figure 33 : Composition de la paroi des bactéries Gram négatif…….. 31
Figure 34 : La structure du peptidoglycane dans la paroi des bactéries Gram négatif et Gram positif……... 32
Figure 35 : La structure du bactoprénol dans la paroi des bactéries Gram négatif et Gram positif……..... 32
Figure 36 : L'action du bactoprénol dans la synthèse du peptidoglycane……. 33
Figure 37 : La transpeptidation dans la synthèse du peptidoglycane…… 33
Figure 38 : Les différents flagelles…… 36
Figure 39 : Le pili…….. 37
Figure 40 : Un plasmide…… 37
Figure 41 : Les endospores…… 38
Figure 42 : La sporulation : la production des endospores…… 39
Figure 43 : Les différentes positions des spores dans la cellule végétative…….. 40

Chapitre III La taxonomie microbienne

Figure 1 : La classification phylogénétique des organismes vivants…… 42
Figure 2 : La classification par hybridation ADN/ADN……... 43
Figure 3 : Classification par analyse des esters méthylés d'acides gras……... 43
Figure 4 : Les rangs taxonomiques…… 46

Chapitre IV Nutrition, culture et croissance des microorganismes

Figure 1 : La scissiparité…… 53
Figure 2 : La courbe de croissance microbienne……. 54
Figure 3 : La turbidité et la mesure de la masse……. 57
Figure 4 : Principe de comptage direct au moyen d'une chambre de comptage…….. 58
Figure 5 : La méthode de préparation des séries de dilutions de l'échantillon…… 59
Figure 6 : Dénombrement des cellules viables……... 60
Figure 7 : Exemple d'application de la méthode NPP…… 61
Figure 8 : Le procédé de filtration sur membrane……... 62
Figure 9 : Courbe LnX = f (t) pour différentes concentrations en glucose (S_1, S_2…)…….. 62
Figure 10 : Effet de la température sur le taux de croissance et conséquences au niveau moléculaire pour la cellule……. 63
Figure 11 : Réaction vis-à-vis de la température d'organismes psychrophiles, mésophiles, thermophiles et de différents hyperthermophiles……... 64
Figure 12 : Croissance en fonction de la concentration en oxygène……... 66

Chapitre V Contrôle de la croissance des microorganismes

Figure 1 : Les méthodes de contrôle microbiologique…….. 68
Figure 2 : Poste de sécurité biologique (Le poste est présenté avec une source de radiations ultraviolettes UV (lampe à vapeur de mercure) utilisée pour décontaminer les surfaces internes……... 69
Figure 3 : Stérilisation par une membrane filtrante……... 70
Figure 4 : Effet de l'agent bactériostatique sur la croissance cellulaire…… 70
Figure 5 : Effet de l'agent bactéricide sur la croissance cellulaire…… 71
Figure 6 : Effet de l'agent bactériolytique sur la croissance cellulaire……. 71
Figure 7 : Détermination de la sensibilité aux antibiotiques par la méthode des dilutions……. 72
Figure 8 : Mesure de l'activité des antibiotiques par la méthode de diffusion en milieu gélosé……. 72
Figure 9 : Mode d'action des agents chimiothérapeutiques antimicrobiens……. 74

Chapitre VI Introduction à la mycologie

Figure 1 : La cellule de levure……... 77
Figure 2 : Les hyphes. Dessins (a) d'hyphes coenocytiques (non septés) et (b) d'hyphes divisés en cellules par des septums……. 77

Figure 3 : Un carpophore…….. 78
Figure 4 : La reproduction asexuée chez les mycètes et quelques spores……. 79
Figure 5 : La reproduction sexuée chez les Ascomycètes……. 79
Figure 6 : La reproduction sexuée chez les Basidiomycètes……. 80
Figure 7 : Les cycles de reproduction chez les levures……. 80
Figure 8 : Les cycles de reproduction chez les moisissures…….. 81
Figure 9 : Les cycles de reproduction chez les champignons supérieurs…….. 81
Figure 10 : Des représentants des groupes fongiques…….. 82

Chapitre VII Introduction à la virologie

Figure 1 : Les génomes viraux…….. 84
Figure 2 : Les virus animaux……. 85
Figure 3 : Les virus de plantes…….. 85
Figure 4 : Les virus avec et sans enveloppe…….. 86
Figure 5 : Les virus de forme cylindrique……. 87
Figure 6 : Les virus de forme sphérique…… 87
Figure 7 : La forme des virus bactériophages……..… 87
Figure 8 : Les différentes phases de l'infection virale…….. 88
Figure 9 : Les conséquences de l'infection virale sur les cellules animales……. 89

Liste des tableaux

Chapitre I Le monde microbien

Tableau 1 : Caractères de différenciations entre cellule procaryote et cellule eucaryote……..... 7
Tableau 2 : Différences entre les trois groupes de microorganismes…….. 9

Chapitre IV Nutrition, culture et croissance des microorganismes

Tableau 1 : Sources de carbone, d'énergie et d'électrons…… 48
Tableau 2 : Principaux types nutritionnels de micro-organismes…… 49
Tableau 3 : Macronutriments rencontrés en milieu naturel et présents dans les milieux de culture……..... 51
Tableau 4 : Mesures de l'activité de l'eau (a_w) de certains produits……..... 65

Chapitre VI Introduction à la mycologie

Tableau 1 : Classification abrégée des champignons ou *Fungi*……. 83

Sommaire

Chapitre I Le monde microbien

Introduction

1. Historique……. 1

1. 1. Découverte des microorganismes (1632-1723) ……..... 1

1. 2. L'époque pastorienne (1822-1895) …..…….. 2

- Les fermentations……..... 2

- La génération spontanée……. 2

- La bactériologie médicale (1843-1910) ……..... 2

- Les vaccinations…….. 3

1. 3. La période moderne……... 4

2. Place de microorganismes dans le monde vivant…….. 4

3. Caractéristiques générales (cellulaire et virale)..…….. 6

3. 1. La cellule eucaryote……..……..... 6

3. 2. La cellule procaryote.……..……. 6

3. 3. Les virus..…….. 8

Chapitre II Morphologie et structure des microorganismes

1. Les techniques d'étude…….. 10

1. 1. Techniques d'observation de la cellule..…… 10

1. 1. 1. Les microscopes optiques…….…….. 10

1. 1. 2. La microscopie électronique…….. 13

1. 2. Séparation des constituants cellulaires.…….. 15

1. 3. Analyse fine ultra structurale…...…….. 16

2. La cellule bactérienne..……. 17

2. 1. Composition et organisation de la cellule bactérienne…….. 17

2. 1. 1. Taille et forme des bactéries….……...…….. 17

2. 1. 2. Organisation de la cellule procaryote..…….. 19

2. 1. 2. 1. Les éléments constants…….. 20

1)- Le cytoplasme…….. 20

2)- Le chromosome…..…… 20

- Composition de l'ADN..…… 20

- Réplications de l'ADN…..…….. 21
- Historique de la réplication unidirectionnelle……. 22
- Mécanisme moléculaire de la réplication de l'ADN..…… 23
3)- Les ribosomes…… 27
4)- La membrane plasmique…… 28
4. 1. Rôles de la membrane plasmique…… 28
4. 2. La composition chimique de la membrane plasmique…….. 29
5). La paroi…… 29
5. 1. La paroi des bactéries Gram^{+} et Gram $^{-}$…..…….. 30
5. 2. La relation entre la structure de la paroi et la coloration de Gram..…… 34
6). Le périplasme.…….. 34
2. 1. 2. 2. Les éléments inconstants (facultatifs) …… 34
1). La capsule.……... 34
2). Les couches S……..……..... 35
3). Les vésicules à gaz..…… 35
4). Les inclusions de stockage…..…… 35
5). Les flagelles ou les cils…… 36
6). Les pilis et les fimbriae…… 36
7). Les plasmides……..…… 37
8). Les endospores…..……..……..... 38
8. 1. La sporulation des endospores……... 38
8. 2. La germination…..…….. 40

Chapitre III La taxonomie microbienne

1. La classification..…….. …… 41
1. 1. La taxonomie polyphasique (dite conventionnelle) …… 41
1. 1. 1. La classification phénotypique (ou phénétique) …….. 41
1. 1. 2. La classification génotypique…..…….. 41
1. 1. 3. La taxinomie phylogénétique (dite moléculaire ou chimiotaxinomie) ……..... 41
1. 1. 3. 1. La classification phylogénétique ou phylétique : le ribotypage..…… 41
1. 1. 3. 2. La classification par hybridation ADN/ADN…….…… 42
1. 1. 3. 3. Analyses des esters méthylés d'acides gras…….. 43
1. 2. La taxinomie numérique……..…….. 44
1. 2. 1. La classification selon le manuel de *Bergey*…….. 44

2. La nomenclature : les rangs taxonomiques…..…….. 45
2. 1. Définitions…..…….. 45
2. 2. Principales règles de nomenclature…..…….. 45
Chapitre IV La nutrition et culture des microorganismes
1. La nutrition et culture des microorganismes…… 47
1. 1. Les types nutritionnels (trophiques) …… 47
1. 1. 1. Source d'énergie……... 47
1. 1. 2. Source d'électrons……. 48
1. 1. 3. Sources de carbone…… 48
1. 2. La nutrition microbienne……... 50
1. 2. 1. Le carbone……. 50
1. 2. 2. L'azote……... 50
1. 2. 3. Les macronutriments : P, S, K, Mg, Ca, Na…….. 50
1. 2. 4. Les micronutriments…….. 52
1. 2. 5. Les facteurs de croissance……. 52
2. La croissance microbienne…… 52
2. 1. La croissance cellulaire……. 52
2. 2. La courbe de croissance…… 53
2. 3. Les mathématiques de la croissance……. 55
2. 4. Mesure de la croissance…… 56
2. 4. 1. Mesure de la biomasse…….. 56
a) Détermination du poids total des cellules……. 56
b) Mesure du trouble……. 57
2. 4. 2. Mesure du nombre de cellules…….. 57
a) Lecture au microscope…….. 57
b) Compteur de particules……. 58
c) Epifluorescence (comptage des cellules vivantes)…… 58
d) Dénombrement après culture…… 59
- La culture en boite de Pétri……. 59
- La méthode du nombre de plus probables NPP…….. 60
- La méthode de filtration sur membrane…….. 61
2. 4. 3. Mesure des constituants cellulaires……... 62
3. Les facteurs influençant la croissance……... 62

3. 1. Concentration de substrat…….. 62
3. 2. La température…….. 63
3. 3. Le pH……. 64
3. 4. L'activité de l'eau (l'humidité)……. 64
3. 5. L'influence de l'oxygène…….. 65
3. 6. Les radiations……. 66
Chapitre V Contrôle de la croissance des microorganismes
1. Contrôle antimicrobien par les méthodes physiques……. 67
1. 1. Stérilisation par la chaleur……. 67
1. 2. Stérilisation par rayonnement..……. 69
1. 3. Filtration stérilisante…….……. 69
2. Contrôle antimicrobien par les méthodes chimiques…..……. 70
2. 1. Les différents agents antimicrobiens chimiques.……. 70
- Les agents bactériostatiques…….……. 70
- Les agents bactéricides…..……. 71
- Les agents bactériolytiques……. 71
2. 2. Etude de l'effet des agents antimicrobiens sur la croissance……..……. 71
- La concentration minimale inhibitrice……..……. 71
- La diffusion en milieu gélosé……. 72
2. 3. Agents antimicrobiens chimiques utilisés *in vivo*……. 73
2. 3. 1. Molécules antimicrobiennes de synthèse…..……. 73
- Les analogues des facteurs de croissance..……. 73
- Les analogues d'acide nucléique..……. 73
- Les quinolones…..……. 73
2. 3. 2. Molécules antimicrobiennes naturelles : les antibiotiques…..……. 73
- Antibiotiques à cycle β-lactame : pénicilline et céphalosporine……. 73
- Antibiotiques produits par les procaryotes……. 73
2. 3. 2. 1. Les cibles des agents chimiothérapeutiques……. 74
2. 3. 2. 2. Molécules antivirales……..……. 74
2. 4. Agents antimicrobiens chimiques à usage externe…..……. 74
2. 4. 1. Première catégorie……. 74
2. 4. 2. Deuxième catégorie…..……. 74

Chapitre VI Introduction à la mycologie

1. La structure des mycètes…..……. 76

1. 1. Une levure……..…….……. 76

1. 2. Une moisissure…..……. 77

1. 3. Champignons macroscopiques.……. 77

2. La reproduction chez les mycètes……. 78

2. 1. La reproduction asexuée..……. 78

2. 2. La reproduction sexuée……. 79

2. 3. Les cycles de reproduction…..……. 80

2. 3. 1. Chez la levure…..……. 80

2. 3. 2. Chez les moisissures……. 80

2. 3. 3. Chez les champignons macroscopiques…..……. 81

3. Les embranchements des mycètes et les caractéristiques……. 81

Chapitre VII Introduction à la virologie

1. Propriétés générales des virus..……. 84

1. 1. Les génomes viraux…..……. 84

1. 2. Les hôtes viraux et taxinomie..……. 85

1. 2. 1. Les virus animaux……. 85

1. 2. 2. Les virus de plantes……. 85

1. 2. 3. Les virus bactériens……. 85

2. Les propriétés structurales générales …..…… 86

2. 1. La structure des virions……. 86

2. 2. La symétrie des virions……. 86

3. L'infection virale…..……. 87

4. Conséquences de l'infection virale sur les cellules animales..……. 89

Références bibliographiques……. 90

Chapitre I

Le monde microbien

Introduction

La microbiologie s'organise autour de deux thèmes principaux : la science de la vie et application de la science aux besoins humains.

En tant que science biologique fondamentale, la microbiologie fournit des outils pour la compréhension des processus de vie. Grâce à leurs développements à de fortes densités dans des cultures en laboratoire, les microorganismes sont utilisés pour les études de biochimie et de génétique. Ces propriétés font des micro-organismes d'excellents modèles de compréhension dans les fonctionnements chez les organismes cellulaires.

En tant que science appliquée, la microbiologie s'intéresse à de nombreux problèmes en médecine, en agriculture et en industrie. Ils sont impliqués dans de nombreux processus industriels et biotechnologiques, comme la production d'antibiotiques ou de protéines.

La microbiologie générale étudie le fonctionnement des cellules, plus particulièrement des bactéries, un vaste groupe de cellules. Elle étudie également la diversité, l'évolution, les modes de survie des différents microorganismes et ses raisons, ainsi que leur rôle sur la planète, au sein de la société humaine, dans le corps humain, chez les animaux et les plantes. D'une façon ou d'une autre, les microorganismes influent sur toutes les formes de vie terrestre. Ils se distinguent les uns des autres par leur forme, leur taille et leur mode de vie.

1. Historique (Meyer et al., 2004)

1. 1. Découverte des microorganismes

La découverte des microorganismes nécessitait la fabrication d'un « outil » spécial. C'est le Hollandais ***Antony Van Leeuwenhoek*** **(1632-1723)** qui conçut le microscope le plus simple, c'est-à-dire la loupe. Il s'agissait d'une lentille biconvexe (avec un grossissement d'environ 270) maintenue entre deux plaques de métal avec un assemblage ingénieux permettant de déplacer l'objet et de faire une mise au point (**Figure 1**). Observateur génial, ***Van Leeuwenhoek*** révéla au monde scientifique la prodigieuse diversité des microorganismes et l'incroyable richesse des milieux naturels, comme l'eau, en protozoaires, en algues, en levures et en bactéries.

Dans des échantillons d'eau de rivière, des décoctions de foin ou encore dans la salive, ***Van Leeuwenhoek*** décrivait le grouillement d'une infinie variété d'**animalcules** mobiles ou immobiles, en forme de sphère, de bâtonnet, de spirille…etc.



Figure 1 : Le microscope découvert par *Antony Van Leeuwenhoek* (*http://sciences-et-cetera.fr/antonie-van-leeuwenhoek/*).

1. 2. L'époque pastorienne

- Les fermentations

L'essor de la microbiologie au cours de la seconde moitié du XIX^{ème} siècle, a été déclenché puis dominé par le génie du chercheur ***Louis Pasteur*** **(1822-1895)**. En 1854, il entreprend l'étude de la fermentation lactique. Il présente en 1857 son fameux mémoire où il décrit le ferment lactique comme un organisme vivant, globuleux, beaucoup plus petit que la levure.

Pendant 20 ans, il poursuit ses travaux sur d'autres fermentations (alcoolique en 1858, butyrique en 1861, acétique…) et sur les maladies qui les affectent. Ces maladies sont dues à des contaminants que l'on peut détruire par chauffage à 56°C. Il a mis au point un procédé universellement connu sous le nom de **pasteurisation**.

- La génération spontanée

C'est à cette époque que Pasteur réfute les thèses en cours sur la génération spontanée (selon laquelle les animalcules provenaient de la transformation de la matière organique) en montrant la présence de germes dans l'atmosphère, leur destruction par la chaleur (stérilisation) et leur rétention dans ses fameux ballons à col de cygne (**Figure 2**). Les organismes et les microorganismes ne peuvent donc apparaitre spontanément, comme on le croyait à l'époque, mais ils existent autour de nous, dans l'air, l'eau, la terre ; leur activité peut se révéler utile (cas de fermentation) ou nuisible (cas de maladies).

- La bactériologie médicale

Les chercheurs ***Louis Pasteur & Robert Koch*** **(1843-1910)** sont les véritables fondateurs de la bactériologie médicale.

C'est à ***Robert Koch*** et ses collaborateurs que l'on doit aussi d'avoir mis au point et porté d'emblée à un état de perfection incomparable toutes les techniques d'isolement et d'identification des bactéries.

A la même époque, le chirurgien anglais **Joseph Lister (1827- 1912)**, à partir des travaux de Pasteur, met au point la technique d'asepsie chirurgicale (Robertson, 1972).

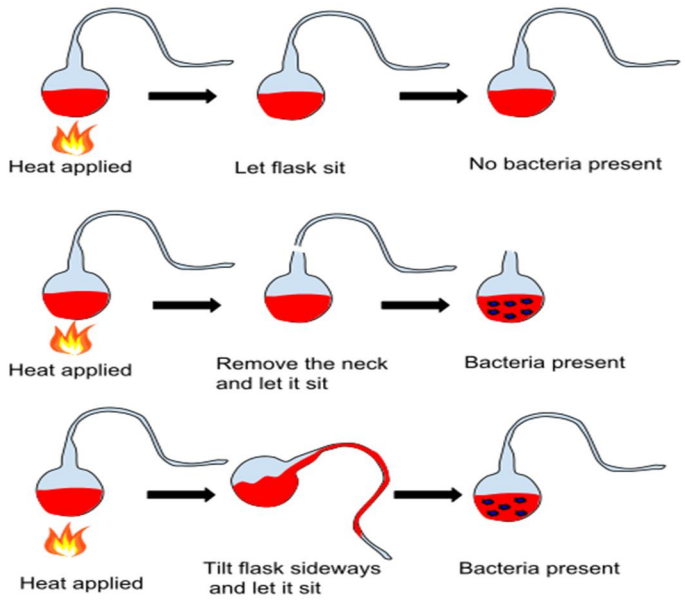


Figure 2 : expériences sur la théorie microbienne (concept de la génération spontanée)

- Les vaccinations

Poussé par un souci humanitaire, Pasteur se préoccupe de protéger l'homme contre les maladies infectieuses. L'étude du choléra des poules lui donne l'occasion de cultiver l'agent responsable et de l'atténuer. Les poules inoculées avec ce « virus » atténué (Figure 3) résistent à l'injection d'une culture virulente : la vaccination est née.

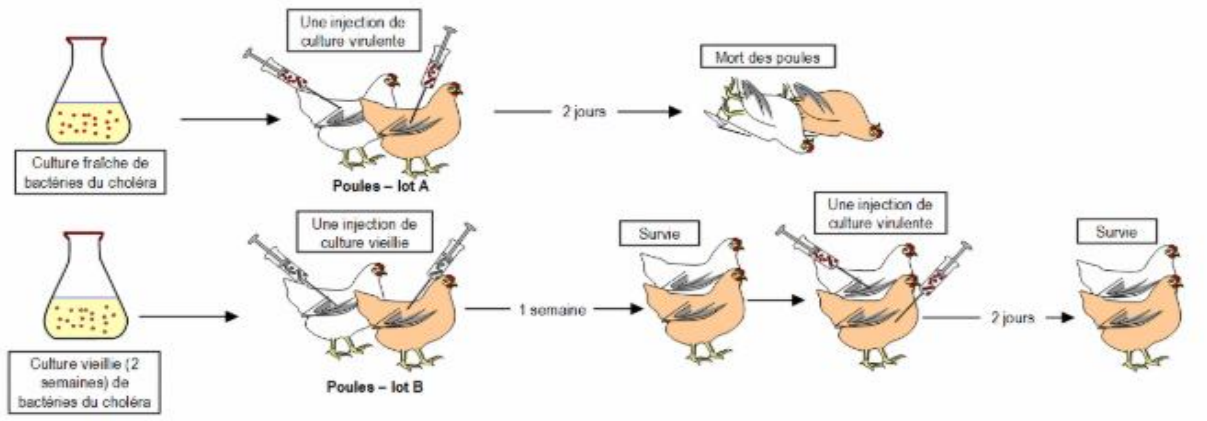


Figure 3 : Principe de la vaccination (Trehiou, 2016)

Cette théorie des vaccinations devait trouver une année plus tard (1881) une éclatante confirmation avec le charbon. Pasteur et ses collaborateurs mettent au point un procédé d'atténuation du bacille, qui devient alors vaccinant.

1. 3. La période moderne

Les microorganismes se reproduisent rapidement et sont faciles à cultiver ce qui constitue un outil favorable en génétique. En 1944, **Avery Mc Leod et Mc Carty** ont montré que l'ADN est le responsable dans le phénomène de transformation en étant le support des caractères héréditaires de la cellule.

La biologie moléculaire est née de la convergence de la génétique et de la biochimie. Elle s'intéresse à la structure des macromolécules, en particulier celle des acides nucléiques et des protéines.

La période actuelle est marquée par l'essor du génie génétique et des biotechnologies. Le génie génétique consiste à mettre en œuvre *in vitro*, des recombinaisons génétiques, véritables greffes entre deux molécules d'ADN. La cellule bactérienne qui reçoit ainsi une information nouvelle (d'une autre bactérie ou d'une cellule animale) devient capable de produire la substance dont on lui a confié le programme. Ces techniques suscitent d'immenses espoirs dans la production bactérienne d'hormones (clonage de l'interféron alpha en 1980).

Les biotechnologies font référence aux applications variées qui résultent de l'utilisation des capacités biologiques nouvelles : tels sont les « bioréacteurs » enzymatiques, les fermentations industrielles, la lutte biologique, les productions de biomasse, de biocombustibles, etc.

2. Place de microorganismes dans le monde vivant

La **figure 4** décrit la répartition des microorganismes : les protistes dans le monde du vivant et sa place considérable parmi les êtres vivants.

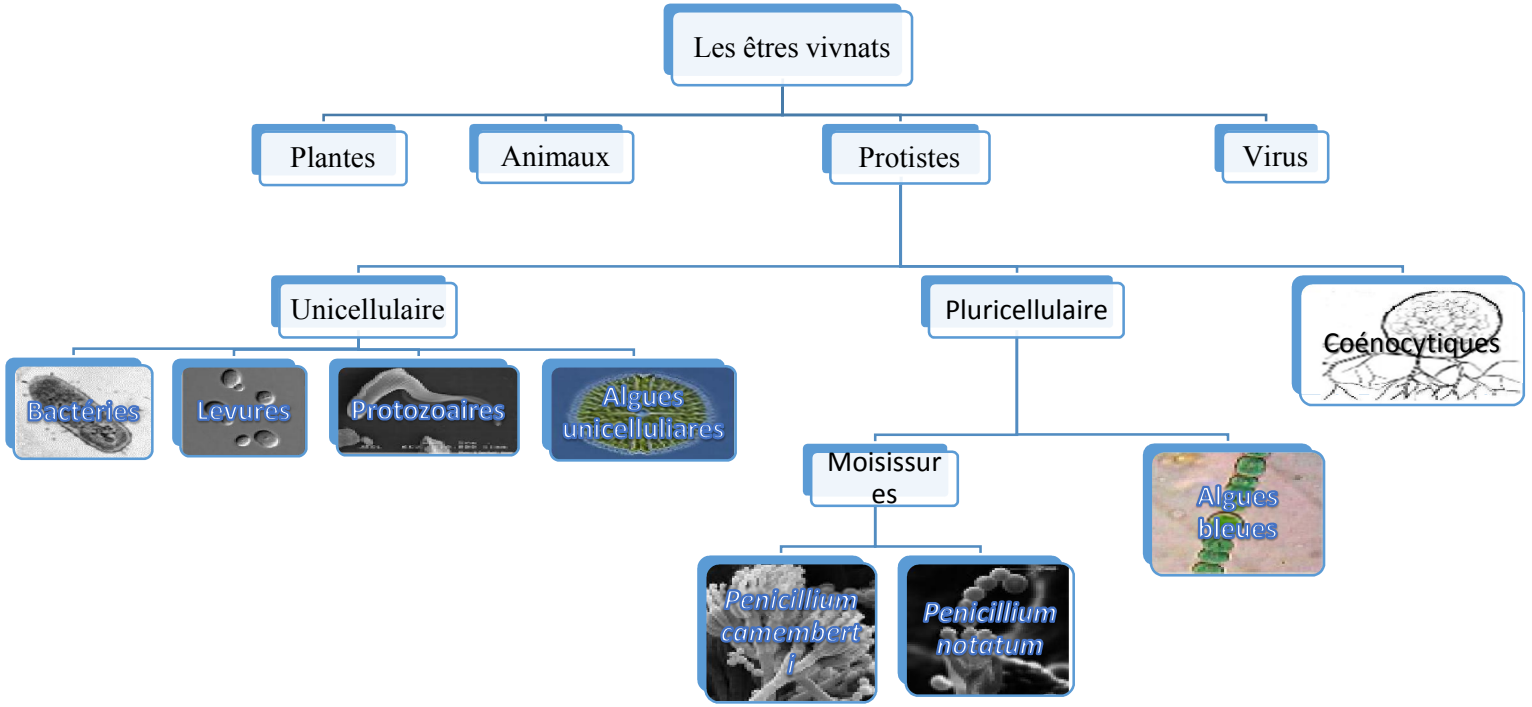


Figure 4 : La répartition des microorganismes parmi les êtres vivants

3. Caractéristiques générales (cellulaire et virale)

Toutes les cellules ont de nombreux points communs et présentent de nombreux éléments ou fonctions identiques. Elles possèdent toutes une barrière, appelée membrane cytoplasmique. Les cellules végétales et la majorité des microorganismes ont des parois cellulaires, contrairement à la plupart des cellules animales. L'étude des structures internes des cellules révèle deux types de structures : procaryotes et eucaryotes.

3. 1. La cellule eucaryote (Figure 5)

Elle possède un vrai noyau (du grec signifiant bon noyau ou vrai noyau).

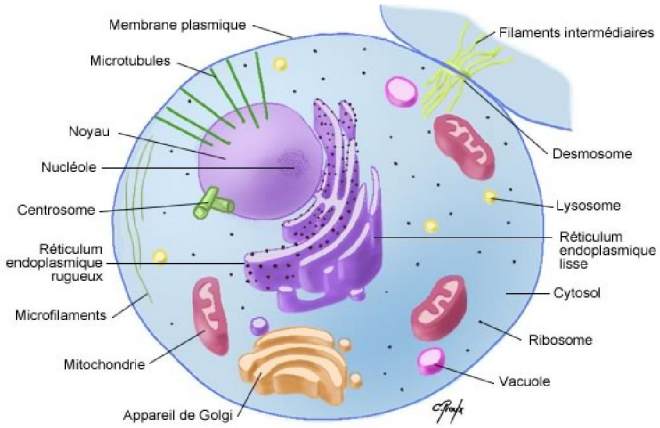


Figure 5 : La structure d'une cellule eucaryote (http://www.cours-pharmacie.com/biologie-cellulaire/cellules-procaryotes-et-cellules-eucaryotes.html)

3. 2. La cellule procaryote (Figure 6)

A la différence des cellules eucaryotes (**Figure 5**), les cellules procaryotes ont une structure interne plus simple dépourvue d'organelles.

Le groupe des procaryotes se scinde en deux domaines distincts, les *Archaea* et les *Bacteria.* Bien que leurs différentes espèces partagent la même structure cellulaire. La plupart des procaryotes appartiennent au domaine de *Bacteria*.

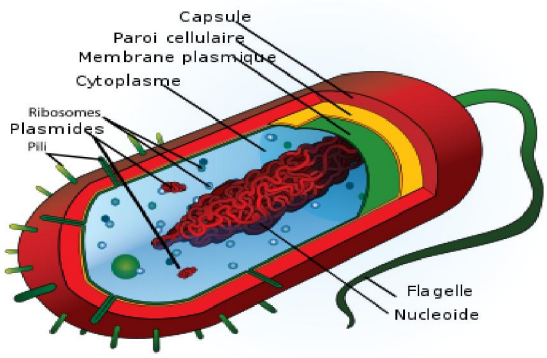


Figure 6 : La structure d'une cellule procaryote (https://fr.wikipedia.org/wiki/Cellule_(biologie)

Les cellules procaryotes se différent des cellules eucaryotes par plusieurs caractéristiques dont les principales différences sont présentées dans le tableau 1.

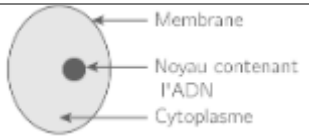
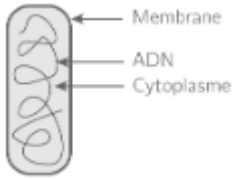
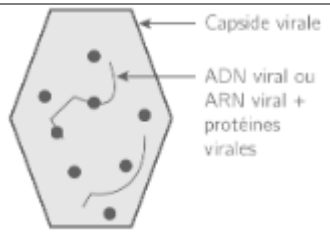
Tableau 1 : Caractères de différenciations entre cellule procaryote et cellule eucaryote (J.P. Euzéby "Dictionnairede Bactériologie Vétérinaire" - "Cellule"- Encyclopedie-fr.snyke.com (consulté 28/01/2019)

Caractéristiques	Cellule procaryote	Cellule eucaryote
Taille typique	1-10 µm	10-100 µm
Type de noyau	nucléoïde (pas de véritable noyau)	vrai noyau avec double membrane
Division de la cellule	division simple	mitose (réplication de la cellule) méiose (menant à la formation de gamètes)
Organisation génétique		
Membrane nucléaire	non	oui
Nombre de chromosomes	généralement 1	> 1
Chromosome circulaire	oui	non
Histones	non	oui
Nucléole	non	oui
Echange génétique	transfert unidirectionnel	fusion de gamètes
ARN et synthèse des protéines	couplé au cytoplasme	synthèse d'ARN dans le noyau synthèse de protéines dans le cytoplasme
Premier acide aminé initiant la synthèse d'une chaînepolypeptidique	méthionine ou N-formylméthionine	méthionine
Structures cellulaires et organites		
Réticulum endoplasmique	non	oui
Appareil de Golgi	non	oui
Lysosomes	non	oui
Mitochondries	non	oui
Chloroplastes	non	oui chez les plantes
Microtubules	non	oui
Paroi cellulaire avec peptidoglycane	oui	non
Présence de stérols dans les membranes	non	oui
Endospores	oui, parfois	non
Taille des ribosomes	70 S	80 S, sauf mitochondries etchloroplastes
Localisation des ribosomes	dispersés dans le cytoplasme	dispersés dans le cytoplasme ou liés au réticulum endoplasmique
Constantes de sédimentationdes ARN ribosomaux	16S, 23S, 5S	18S, 28S, 5,8S, 5S
Attributs fonctionnels		
Phagocytose	non	oui, parfois
Pinocytose	non	oui, parfois
Flux cytoplasmique	non	oui
Mouvement de la cellule	flagelles faites de flagelline	flagelle et cils faits de tubuline
Site de transport des électrons	membrane cellulaire	membrane des organites

3. 3. Les virus

Ce ne sont pas des cellules, mais constituent une classe majeure de microorganismes. Ils sont dépourvus de nombreuses caractéristiques cellulaires (tableau 2). C'est seulement au cours de l'infection d'une cellule que le virus acquiert la propriété clé d'un être vivant : la reproduction.

Tableau 2 : Différences entre les trois groupes de microorganismes (www.kartable.fr/ressources/svt/cours/les-microbes/44328)

Nom	Type d'organisme	Exemples	Vue schématique	Taille	Effets positifs ou négatifs
Champignons	Cellule à noyau	*Penicillium rquerforti* *Sacharomyces cerevisae*		10 µm	Peuvent être utilisé pour fabriquer le pain, le vin, la bière, les fromages. Mais peuvent également causer des mycoses.
Bactéries	Cellule sans noyau	*Escherichia coli ;* *Streptococcus thermophilus*		1 µm	Peuvent être utilisées pour la fabrication des yaourts mais aussi en génie génétique. Sont également responsables de maladies graves voire mortelles (tuberculose, tétanos..etc)
Virus	Structure non cellulaire	Virus de l'immuno-déficience humaine (VIH) ; Virus de la grippe ; Virus de la rage		100 µm	Doivent attaquer des cellules pour se reproduire et sont donc pathogènes. Responsables de très nombreuses maladies.

Chapitre II

Morphologie et structure de la cellule microbienne

1. Les techniques d'étude

Les bactéries typiques sont des organismes unicellulaires procaryotes. Elles n'ont pas de noyau et leur génome est le plus petit des cellules vivantes. Les bactéries se divisent en eubactéries et en archaebactéries.

1. 1. Techniques d'observation de la cellule

1. 1. 1. Les microscopes optiques

Ils sont, en général, utilisés pour l'observation des bactéries à faibles grossissements et ils sont basés sur l'utilisation des rayonnements lumineux.

a) Le microscope à fond clair ou microscope optique simple

La mise au point du premier microscope en (1632- 1723) par Antony Van Leeuwenhok marque le point de départ de la microbiologie. Depuis, cet appareil a été largement amélioré par une observation des structures de l'ordre de 1 µm (**Figure 1**). Les spécimens sont visualisés grâce à leur différence de contraste (densité) qui existe entre leur surface et le milieu environnant. Les différences de contraste proviennent des variations d'absorption et de réflexion de la lumière par les échantillons.

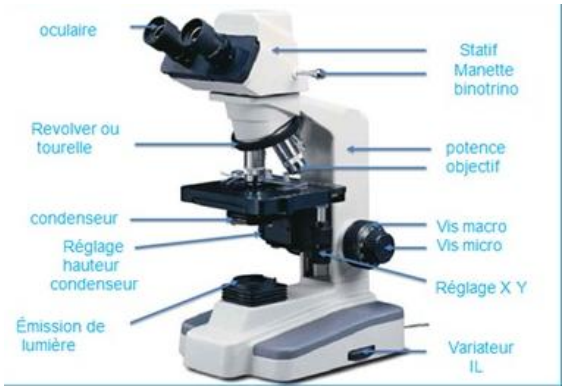


Figure 1 : Microscope optique simple

On distingue :

- L'observation **à l'état frais** entre lame et lamelle, de bactéries en milieu liquide et sa variante, **la coloration à l'encre de Chine** (pour la mise en évidence de la capsule). Les capsules correspondent au halo clair entourant les corps bactériens en noir.

- L’observation après fixation à la chaleur, telle que la coloration de Gram. 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 (Meyer et al., 2004).

b) Le microscope à fond noir

Les anneaux de phase arrêtent une partie de la lumière de sorte qu'elle ne peut plus atteindre le détecteur. Lorsqu'un échantillon est inséré, elle diffuse une partie de la lumière, même si elle est transparente. La microscopie à fond noir permet d'augmenter le contraste des images et d'objets non colorés (**Figure 2**).

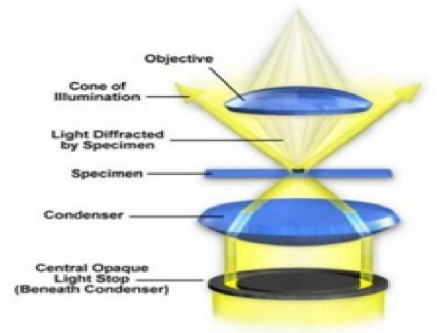


Figure 2 : Microscope à fond noir (Dahan, 2011)

c) Le microscope à contraste de phase

Il renforce la différence de contraste (densité) entre les cellules ou les bactéries et leur milieu environnant, permettant ainsi leur visualisation tout en évitant leur coloration. Cette technique de mise au point se prête bien à l’observation de spécimens à l’état frais.

Son principe repose sur le fait que les bactéries ralentissent la vitesse de la lumière qui les traverse et diffèrent ainsi de leur milieu environnant par leur indice de réfraction. Ceci se traduit par une différence de phase entre la bactérie et son milieu. Un anneau spécial appelé « plateau de phase » et monté dans l’objectif du microscope, amplifie cette différence subtile (**Figure 3**).

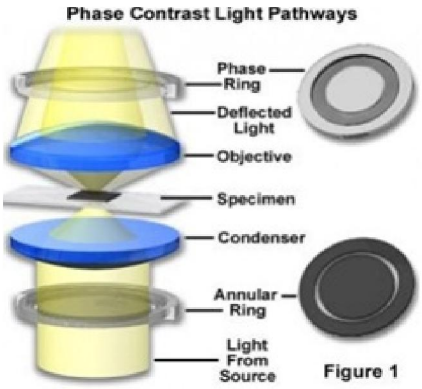
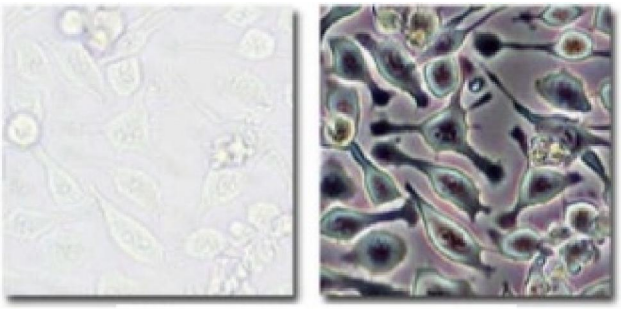


Figure 3 : Microscope à contraste de phase (Dahan, 2011)

Le résultat conduira à la construction d'une image foncée qui apparait sur un fond lumineux (**Figure 4**).



(a) (b)

Figure 4 : Construction de l'image (a) claire (b) foncée (Guedes, 2017)

Imaginé en 1930 par le Hollandais Frits Zernike (1888-1966), il permet d'examiner des cellules vivantes de toute sorte, dans des conditions variables, sans devoir leur infliger une coloration (Robertson, 1972), et a valu à son concepteur le prix Nobel en 1953.

d) Le microscope à fluorescence

Ce dernier est, généralement, utilisé pour l'observation des spécimens produisant une fluorescence naturelle (**Figure 5**) en raison de la présence au sein de la cellule de substance naturellement fluorescente (chlorophylle, par exemple) soit parce que la cellule a été préalablement traitée par un colorant fluorescent appelé fluorochrome (exemple : diamino 2-phénylindole DAPI). Ces substances, confèrent aux cellules la capacité d'émettre un rayonnement lumineux après excitation lumineuse (dans une autre couleur).

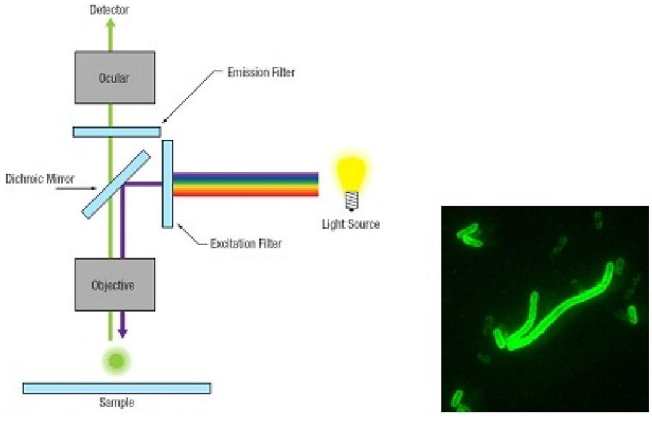


Figure 5 : Microscope à fluorescence (https://fr.wikipedia.org/wiki/Microscopie_fluorescence)

e) Le microscope confocale à balayage laser (*confocal scanning laser microscopy*)

Le principe du microscope confocale repose sur la réflexion de la lumière par les molécules de l'échantillon à analyser (microorganismes ou d'autres spécimens biologiques), il n'y a donc pas besoin d'utiliser des colorants, sauf applications particulières. La source lumineuse est un laser focalisé par un objectif. La lumière émise par le laser est réfléchie par l'échantillon, puis recueillie par l'objectif et transmise à un détecteur, après passage par un diaphragme qui permet de recueillir sélectivement la lumière provenant de la région d'intérêt **(figure** 6**)**. Pour arriver au résultat, la source lumineuse, la région éclairée, et le diaphragme sont dans des plans focaux dits conjugués d'où le terme confocal. L'image complète est ensuite reconstruite point par point par balayage du laser à la surface de l'échantillon étudié (Levy et al., 2016).

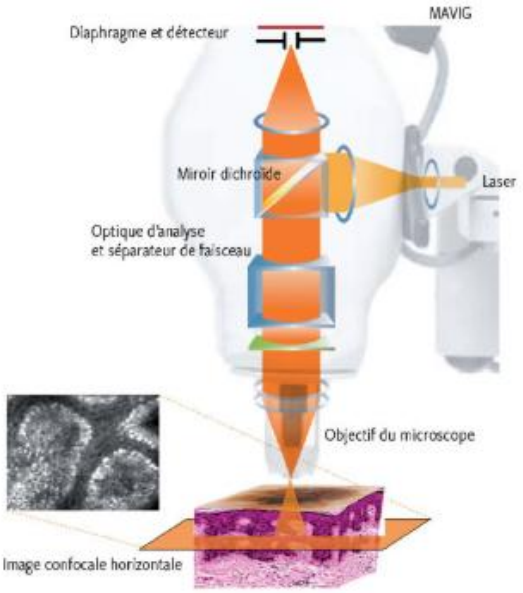


Figure 6 : Microscope confocale à balayage laser (Levy et al., 2016)

Cette technique permet l'observation des échantillons épais tels que les biofilms microbiens, non seulement, à la surface mais également celle des bactéries composant les différentes couches, cela grâce à l'ajustement du plan focal des rayons laser aux différentes profondeurs du biofilm.

1. 1. 2. La microscopie électronique

Pour ce type de microscopie, des électrons sont utilisés au lieu des photons pour la construction de l'image des cellules ou des structures intracellulaires.

a) Le microscope électronique à transmission

Il est utilisé, classiquement, pour examiner les structures intracellulaires. Il a permis de multiplier la résolution obtenue avec un microscope optique. Déjà, le microscope optique avait permis d'accroitre mille fois le pouvoir séparateur de l'œil humain (Robertson, 1972). Donc, sa

résolution peut atteindre 0.2 nm alors que celle d'un microscope optique, elle est de l'ordre de 0.2µm. C'est pourquoi des molécules comme les protéines et l'ADN sont observables de manière individualisée en microscopie électronique (**Figure 7**).

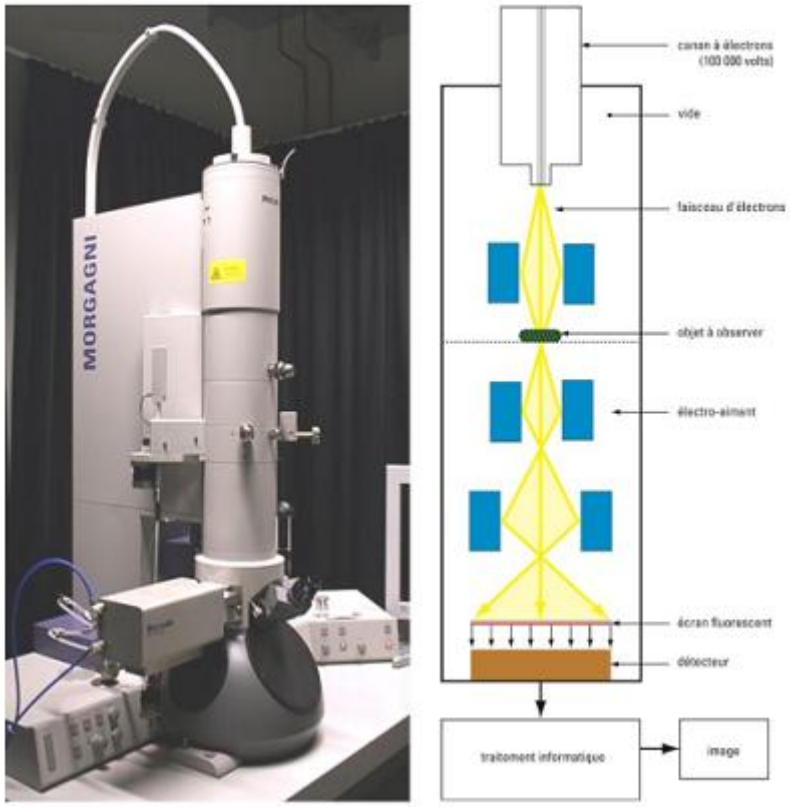


Figure 7 : Principe du microscope électronique à transmission (http://sites.crdp-aquitaine.fr/stl/lexique/met-microscope-electronique-a-transmission/)

Contrairement à la lumière du Visible, les sources d'électrons ne pénètrent pas bien ; même une unique cellule reste trop épaisse pour être, directement, observée. En conséquence, des techniques spéciales de coupes fines (comprises entre 20-60 nm) (**Figure 8**) sont nécessaires pour préparer les spécimens avant observation.

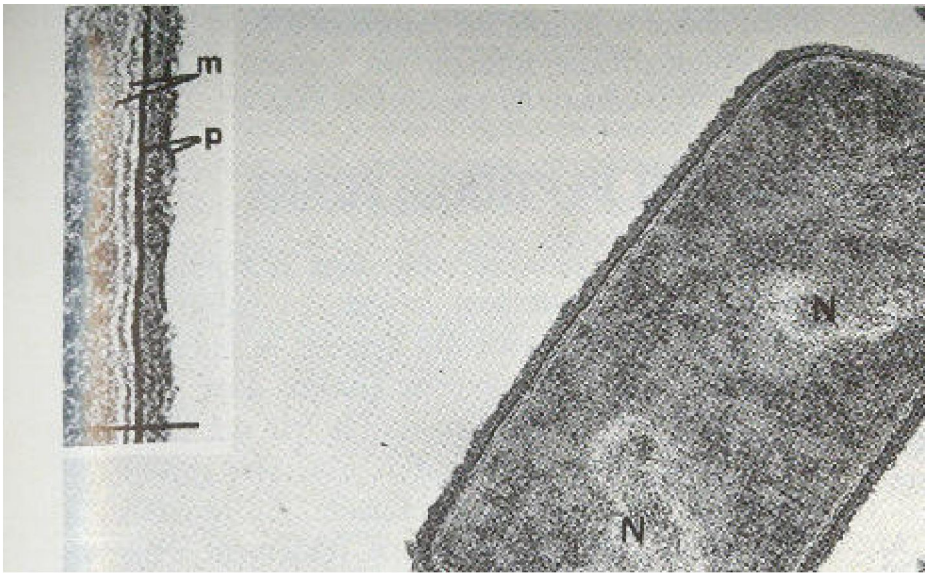


Figure 8 : Observation des coupes fines de cellule bactérienne par microscope électronique à transmission (N : appareil nucléaire, m : membrane plasmique, p : paroi) (http://www.ucam.ac.ma/fssm/biologie/cours_td/microbiosv3/structure_bacterienne.htm)

b) Microscopie électronique à balayage

Si seules les caractéristiques externes d'un organisme requièrent l'observation, les coupes fines ne sont pas nécessaires. Le spécimen est recouvert d'une fine couche de métal lourd tel que l'or. Un rayon d'électrons est dirigé vers le spécimen et le parcourt sur toute sa longueur. Les électrons dispersés par le métal sont collectés et activent un écran où l'image est produite (**Figure 9**).

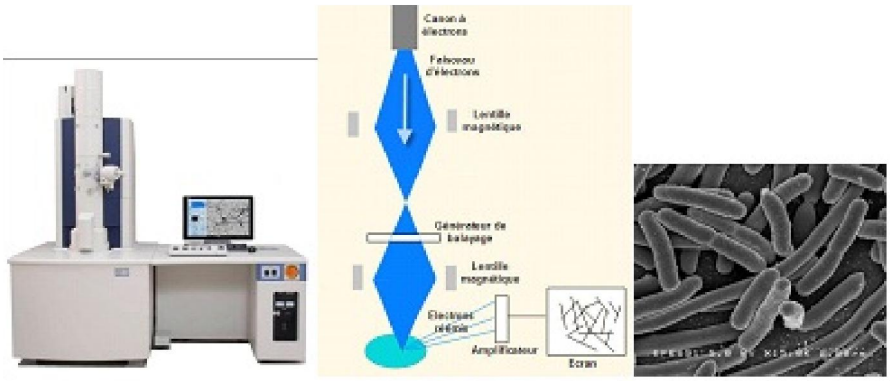


Figure 9 : Microscope électronique à balayage (www.internaute.com)

1. 2. Séparation des constituants cellulaires (Meyer, 2004)

L'étude plus précise des constituants cellulaires nécessite leur séparation. Pour les libérer, il faut rompre les enveloppes protectrices de la cellule (paroi et membrane). Pour se faire, plusieurs méthodes sont utilisées :

- Les ultrasons
- Les enzymes, tel que le lysozyme qui détruit la paroi bactérienne.
- La pression osmotique, après traitement au lysozyme, les bactéries sont placées en milieu hypotonique, gonflent et éclatent.
- La pression mécanique, ou le broyage par des billes en verre assure la rupture de la paroi et de la membrane.
- Le froid, par le procédé de cryolyse, c'est-à-dire par plusieurs cycles de congélation/décongélation successives.

Les méthodes de fractionnement par ultracentrifugation (**Figure 10**) permettent de séparer les différents organites cellulaires.

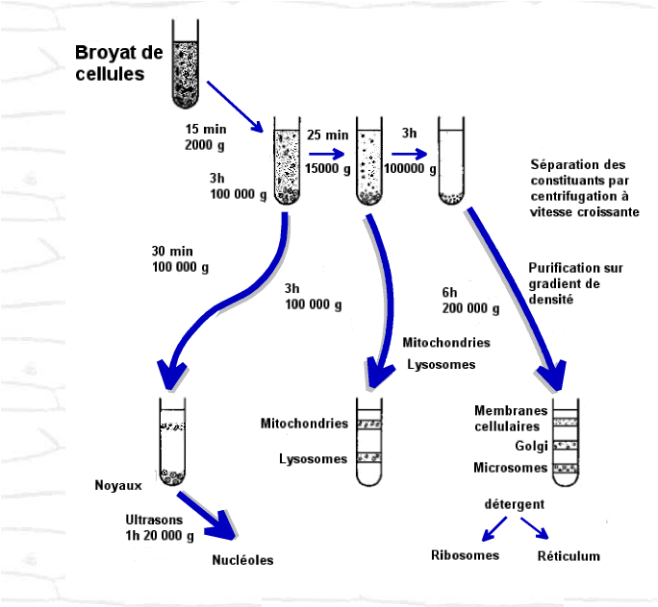


Figure 10 : Séparation des constituants cellulaires par ultracentrifugation (https://cell.sio2.be/moyens/10.php)

1. 3. Analyse fine ultra structurale (Meyer, 2004)

Pour rechercher, en microscopie électronique, un ou plusieurs constituants chimiques au niveau cellulaire, on peut avoir recours à l'analyse cytochimique ultrastructurale. Elle est effectuée par les méthodes suivantes :

- **L'autoradiographie** permet, ainsi, de localiser les sites de synthèse de composants macromoléculaires chez lesquels s'incorpore un précurseur marqué.

- Les méthodes immunocytochimiques permettent de localiser dans la cellule des molécules bactériennes. On utilise des anticorps marqués par la peroxydase, la biotine ou des molécules fluorescentes comme la fluorescéine. La formation d'un complexe stable antigène-anticorps permet de repérer la présence d'une molécule dans la cellule.

2. La cellule bactérienne

La bactérie est un microorganisme ubiquiste, unicellulaire et sans noyau (procaryote) dont le génome est constitué d'ADN. Celui-ci consiste en un seul chromosome et on note, éventuellement, la présence de plasmides.

2. 1. Composition et organisation de la cellule bactérienne

2. 1. 1. Taille et forme des bactéries

- Taille

Les bactéries présentent une taille de 0.5 à 1 µm de diamètre et de 2 à 5 µm de longueur. Certaines bactéries « spirilles » peuvent atteindre la taille d'une algue. Les entérobactéries telles que *Escherichia coli* a une taille de 1 à 3 µm tandis que *Treponema pallidum,* elle est comprise entre 0.1 et 20 µm et les spirochètes leur taille varie de 0.2- 3.5 à 500 µm.

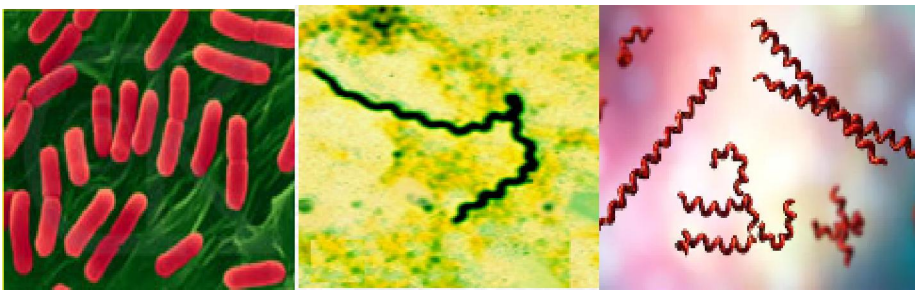


Figure 11 : Exemples de taille chez les bactéries (http://www.ucam.ac.ma)

- La forme

Les bactéries, les plus communes, ont deux formes :

Les coques (Figure 12) sont à peu près sphériques. Ils peuvent exister en tant que cellules individuelles, mais sont aussi associés en arrangements caractéristiques qui sont souvent utiles pour leur identification.

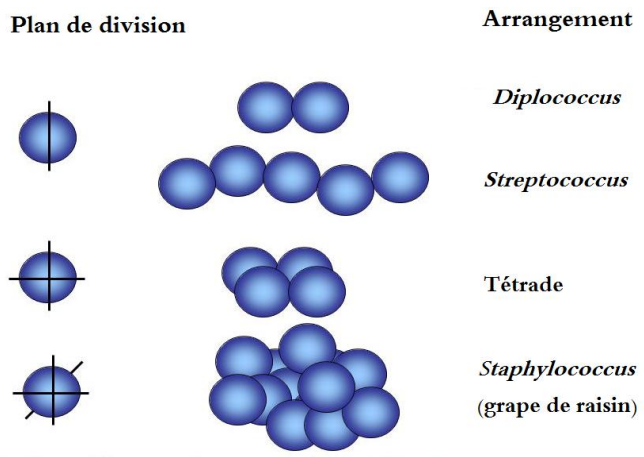


Figure 12 : Les bactéries sous forme de coques

Les bacilles, souvent appelés les bacilles, représentent la 2ème forme appelée également en bâtonnets (**Figure 13)**. Ces bactéries peuvent aussi rester ensemble après la division pour former des paires et des chaînes.

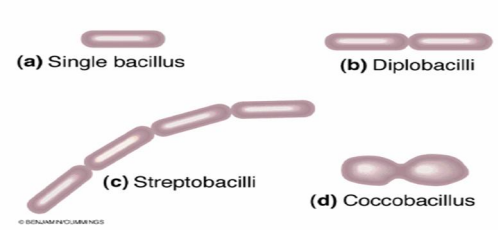


Figure 13 : Les bactéries sous forme de bâtonnets

Les bactéries peuvent avoir d'autres formes comme :

- **Les actinomycètes** qui forment de longs filaments multinucléés ou hyphes qui peuvent être ramifiés et produire un enchevêtrement appelé mycélium (**Figure 14)**.

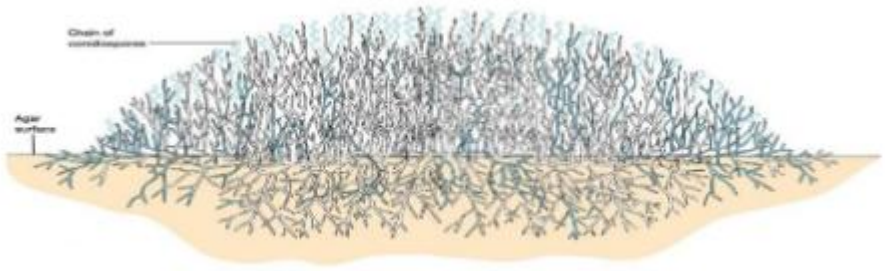


Figure 14 : Les actinomycètes (Prescot, 2010)

- **Les spirilles** (**Figure 15)** ont une forme de long bacille incurvé tordu en spirale ou en hélice (b).

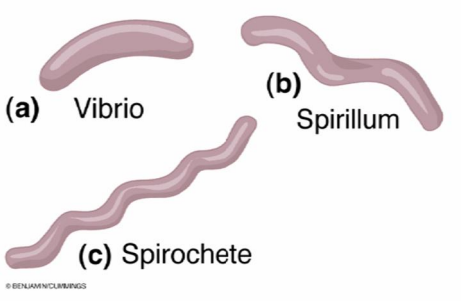


Figure 15 : Les spirilles

- **Les spirochètes** (c) sont des bactéries fines spiralées.

2. 1. 2. Organisation de la cellule procaryote

Les procaryotes ont la même structure fondamentale et possèdent la plupart les mêmes composants principaux. Elles sont presque toujours entourées d'une paroi cellulaire complexe. La membrane plasmique interne est séparée de la paroi par l'espace périplasmique. Puisque la cellule procaryote ne contient pas d'organites internes liés à la membrane, l'intérieur apparaît simple. Le matériel génétique est localisé dans le nucléoide et n'est pas séparé du reste du cytoplasme par une membrane (pas un vrai noyau). Les ribosomes et les inclusions sont dispersés dans le cytoplasme. Les cellules bactériennes peuvent utiliser des flagelles pour locomotion. De plus, beaucoup de cellules sont entourées d'une capsule qui est une couche externe à la paroi cellulaire (**Figure 16**).

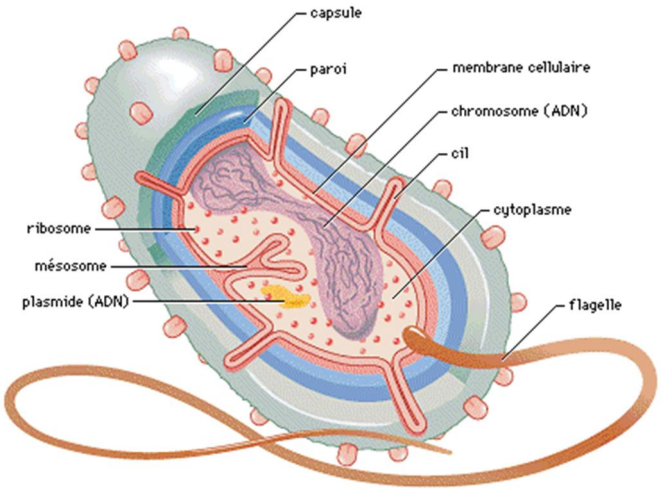


Figure 16 : La cellule procaryote

Il faut retenir que 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 ».**

2. 1. 2. 1. Les éléments constants

1)- Le cytoplasme

Le cytoplasme est un hydrogel colloïdal comprenant une phase dispersante (solution de sels minéraux) et une phase dispersée (composée de lipoprotéines et de lipides).

2)- Le chromosome

Le chromosome bactérien est constitué d'un filament unique, continu et circulaire, formé d'une double chaîne d'acide désoxyribonucléique (ADN). Sa masse moléculaire est de l'ordre de 3. 10^9 Daltons et le nombre de paires de bases est de 5 10^6 échelonnées le long de la double hélice. Il est compacté sous une forme visible appelée nucléoide, par contre on ne trouve pas d'histones comme chez les eucaryotes. On trouve, par contre, des polyamines**.**

Contrairement à la majorité des bactéries, *Vibriocholerae* en possède deux filaments, un grand de 2,9 millions de bases et un petit de 1 million de bases.

L'ADN isolé sous forme native présente une structure circulaire torsadée appelée super-hélice ou forme superenroulée. Elle se distingue, de l'autre forme, dite relaxée par une structure plus compacte (Meyer, 2004) **(Figure 17)**.

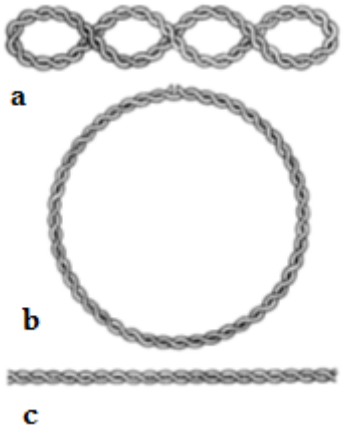


Figure 17 : Les structures de l'ADN chez la cellule bactérienne (Meyer, 2004)
(a : la forme native ; b : forme partiellement dénaturée, double hélice circulaire relaxée ; c : forme dénaturée, double hélice linéaire)

Des enzymes présentes dans la cellule appelées les topoisomérases sont capables de convertir une forme en l'autre. La topoisomérase II, appelée aussi gyrase, permet le passage de la forme superenroulée à la forme relaxée. La topoisomérase I réalise le passage inverse (Meyer, 2004).

- Composition de l'ADN

L'ADN ou acide désoxyribonucléique est un polymère de PM élevé, composé d'unités appelées nucléotides. Un nucléotide est composé d'un mélange de groupement phosphoré, de sucre à 5 atomes de carbone et d'une base purique (Adénine (A) et Guanine (G)) ou pyrimidique (Thymine (T) et Cytosine (C)) (**Figure 18**).

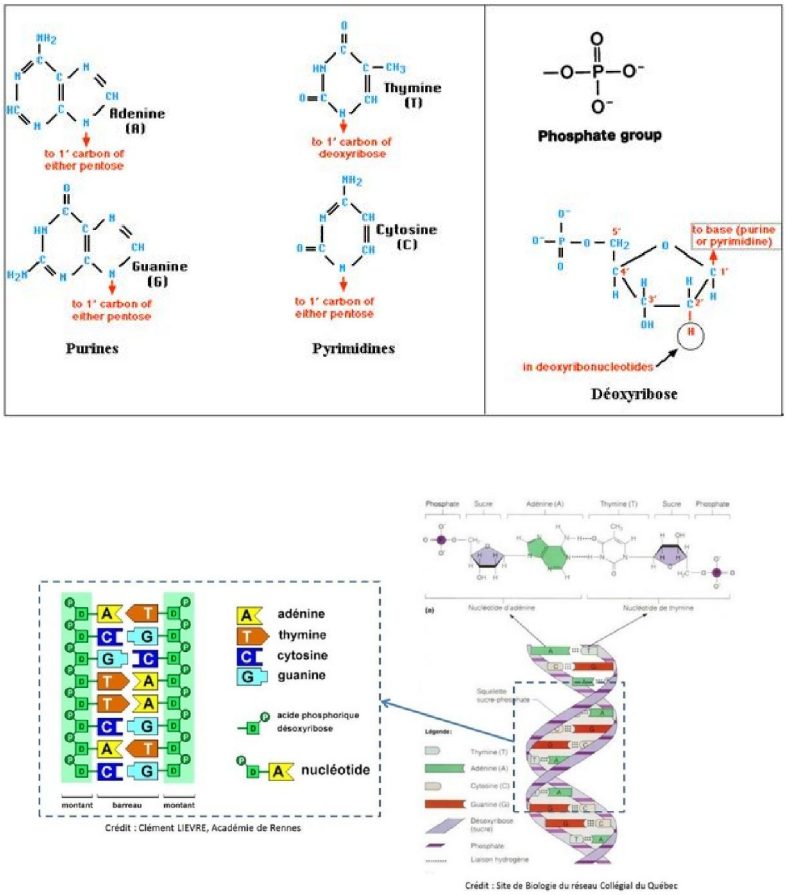


Figure 18 : Les constituants d'un nucléotide de l'ADN (Madigan et Martinko, 2012)

Il y a autant de « A que de T » et autant de « C que G » (**Figure 18**), par contre le rapport (A+T)/(G+C) mieux connu sous le nom de coefficient de Chargaff, exprimé en pourcentage, varie selon les espèces : 50% chez *E.coli*, 60% chez *Pseudomonas* et 25 à 45% chez *Clostridium*.

- Réplications de l'ADN

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. On distingue différents modes de réplication :

La réplication semi-conservative : Chaque chaîne parentale reste associée à la nouvelle chaîne, pour qui, elle sert de moule ou de matrice à la synthèse d'un nouveau brin identique à l'autre brin parental (**Figure 19**).

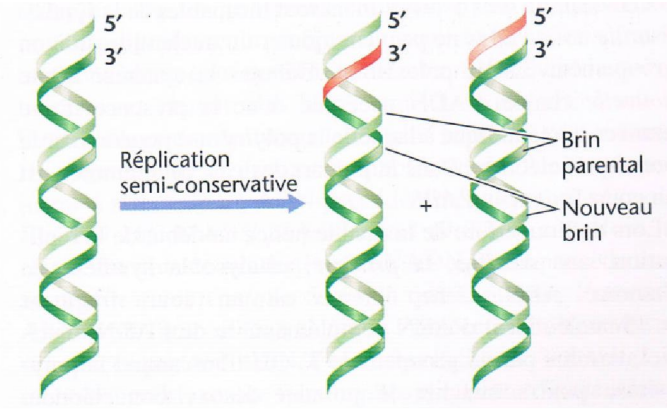


Figure 19 : La réplication semi-conservative des nucléotides de l'ADN (Madigan et Martinko, 2012)

Une double chaîne est synthétisée, identique à la double hélice parentale, ce qui donne finalement naissance à deux hélices.

La réplication bidirectionnelle : Les deux chaînes d'ADN parentales se répliquent simultanément jusqu'à ce que les deux points de croissance se rencontrent **(Figure 20)** pour donner naissance à une structure en théta (θ) **(Figure 21)**.

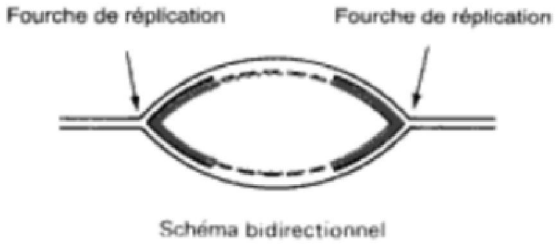


Figure 20 : La réplication bidirectionnelle des nucléotides de l'ADN (Meyer, 2004)

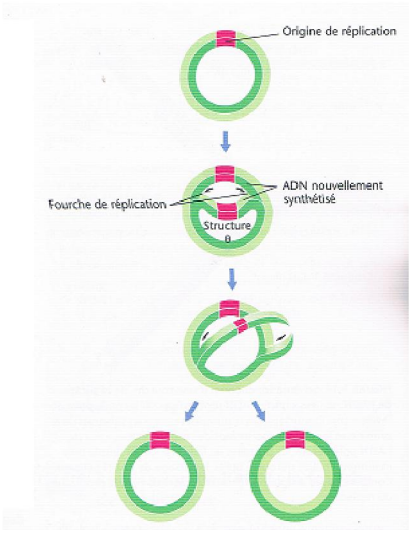


Figure 21 : La structure en θ de la réplication bidirectionnelle des nucléotides de l'ADN (Madigan et Martinko, 2012)

-Historique de la réplication unidirectionnelle

Le chercheur Cairns a été le premier à observer un chromosome entier *d'E.coli* en cours de réplication.

Le marquage bref, avec de la thymidine tritiée où seul l'ADN le plus récemment synthétisé est visible (3mn) montre que les deux structures marquées sont synthétisées à partir du même point. Lorsque le marquage est effectué durant plusieurs générations, les autoradigraphies montrent que la molécule est dupliquée à partir d'un seul point qui se déplace sur toute la longueur de la double chaîne. La croissance du brin nouvellement synthétisé engendre une fourche de réplication.

En se basant sur le modèle de la fermeture éclair de Watson et Crik, Cairns suppose que la molécule d'ADN se réplique dans une seule direction conformément au schéma unidirectionnel (Griffits et Doelbey, 2012).

Certaines études expérimentales portant sur *E.coli* et *Bacillus subtilis* remettent en cause l'hypothèse unidirectionnelle. Elles consistent à cultiver les bactéries en présence de thymidine tritiée à faible activité spécifique puis à les transférer, à des temps variables, dans un second milieu contenant le même métabolite marqué d'activité spécifique plus élevée. Les intensités différentes de marquage doivent permettre de repérer les régions de croissance. Si la molécule d'ADN se duplique à partir d'un seul point (schéma unidirectionnel), on observera un marquage intensif dans une seule des fourches de la bulle (ou œil) de réplication. Les expériences révèlent au contraire que la forte radioactivité est localisée aux deux fourches de réplication. Ainsi la réplication s'effectuerait selon un schéma directionnel.

- Mécanisme moléculaire de la réplication de l'ADN

La chimie de l'ADN, la nature de ses précurseurs ainsi que les activités enzymatiques impliquées dans la réplication imposent des limitations, quant à la manière dont est synthétisé un nouveau brin.

Le précurseur de chaque nucléotide est un nucléoside 5'-triphosphate dont deux phosphates sont éliminés et le troisième fixé de façon covalente à la chaîne en croissance. L'addition d'un nouveau nucléotide requiert la présence d'un groupement hydroxyle libre, seulement disponible à l'extrémité 3'de la molécule d'ADN. Cette restriction est à la base d'un principe important de la réplication : la réplication de l'ADN se déroule toujours dans le sens 5'-3' ; le phosphate en 5' du nucléotide arrivant se fixant à l'extrémité 3'-OH du nucléotide précédemment ajouté (Madigan et Martinko, 2012 ; Griffits et Doelbey, 2012) (**Figure 22**).

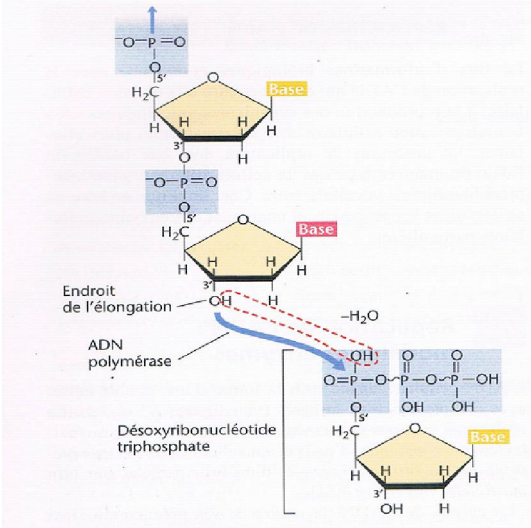


Figure 22 : Le mécanisme de la réplication de l'ADN : principe de la restriction (Madigan et Martinko, 2012)

Les enzymes catalysant l'addition des nucléotides sont des ADN polymérases de plusieurs sortes, possédant des fonctions bien spécifiques.

Toutes les polymérases connues synthétisent de l'ADN dans le sens 5'-3' mais sont incapables de synthétiser un nouveau brin : elles ne peuvent ajouter un nucléotide qu'à un groupement 3'-OH préexistant. Débuter la synthèse d'une nouvelle chaîne d'ADN nécessite donc la présence d'une amorce nucléotidique à laquelle la polymérase pourra fixer le premier nucléotide. Dans la plupart des cas, cette amorce est un court fragment d'ARN.

Lors de l'ouverture de la double hélice au début de la réplication, une enzyme : la primase catalyse la synthèse de l'amorce ARN. Cette amorce (<15 nucléotides) complémentaire de l'ADN matriciel est terminé par un groupement 3'-OH libre auquel la polymérase pourra attacher le premier désoxyribonucléotide **(Madigan et Martinko, 2012)** (**Figure 23**).

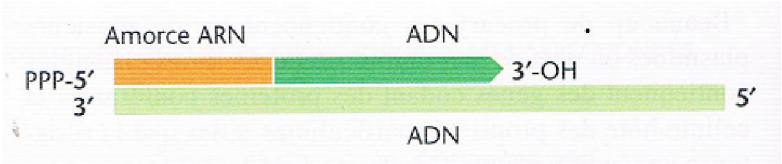


Figure 23 : La synthèse d'une nouvelle chaîne d'ADN par une amorce nucléotidique ARN (Madigan et Martinko, 2012)

L'élongation de la molécule se fait donc sous forme d'ADN et non d'ARN. L'amorce sera ensuite enlevée et remplacée par de l'ADN.

Chez les procaryotes, la synthèse d'ADN débute à un endroit précis du chromosome : origine de la réplication. C'est une séquence spécifique d'environ 300 paires de bases reconnue par des protéines d'initiation dont une, ouvre la double hélice pour rendre les brins accessibles à la machinerie réplicationnelle. La réplication de l'ADN commence alors sur les deux simples brins. Au fur et à mesure que la réplication se poursuit, le site de la réplication, appelé fourche de réplication, se déplace le long de l'ADN **(Madigan et Martinko, 2012)** (**Figure 24**).

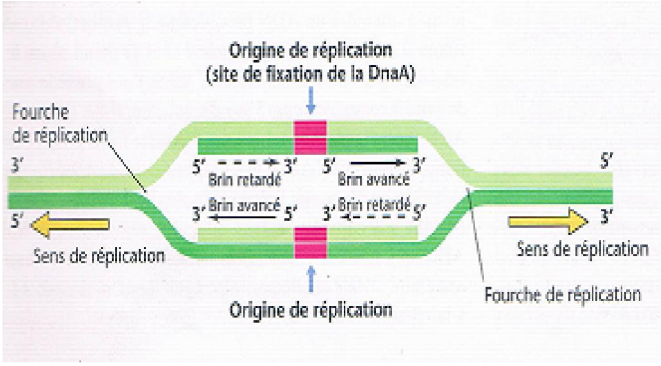


Figure 24 : L'origine de la réplication de l'ADN chez les procaryotes (Madigan et Martinko, 2012)

E.coli possède 5 ADN polymérase I, II, III**,** IV et V**.** L'ADN polymérase III (Pol III) est la première à agir au niveau de la fourche de réplication où sont également présentes plusieurs autres enzymes.

Les hélicases déroulent la double hélice d'ADN, mettant ainsi à jour une petite région d'ADN simple brin. Ces enzymes sont ATP-dépendantes, elles avancent le long de l'hélice et séparent les brins à l'avant de la fourche de réplication**(Madigan et Martinko, 2012)** (**Figure 25**).

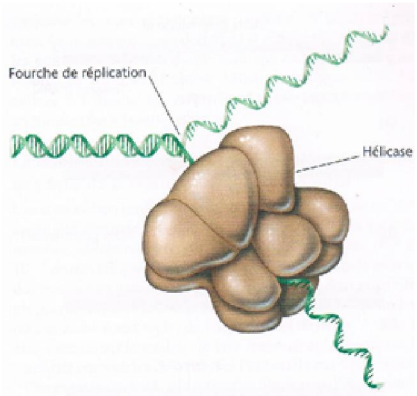


Figure 25 : L'action des hélicases dans le déroulement de la double hélice à l'avant de la fourche de réplication de l'ADN (Madigan et Martinko, 2007)

La région simple brin est complexée avec une protéine de liaison simple brin (**Figure 26**), qui stabilise l'ADN afin d'éviter la formation de liaison hydrogène intra-brin et le retour à la structure double hélice **(Madigan et Martinko, 2012)**.

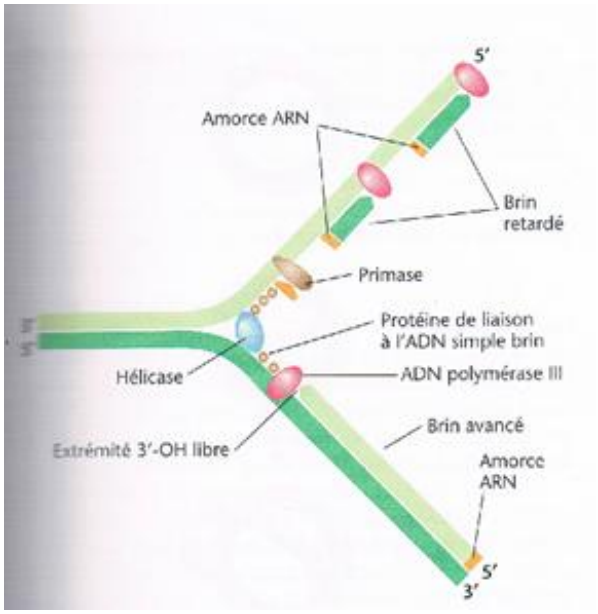


Figure 26 : L'action de la protéine de liaison dans la stabilisation de l'ADN formé (Madigan et Martinko, 2007)

Sur le brin en croissance dans le sens 5'-3', appelé brin avancé (**Figure 26)**, la synthèse d'ADN est continue : il y a toujours un groupement 3'-OH libre au niveau de la fourche de réplication auquel un nouveau nucléotide est ajouté. Sur le brin opposé, le brin retardé (**Figure 26)** (fragments d'Okasaki), la synthèse d'ADN est discontinue (il n'y a pas de 3'-OH libre). Cette extrémité se trouve à l'extérieur de la fourche de réplication. Sur le brin retardé, la primase doit donc synthétiser plusieurs amorces ARN au contraire du brin avancé où une seule amorce est nécessaire (Madigan et Martinko, 2007 ; Griffits et Doelbey, 2012).

Après la synthèse de l'amorce, la primase est remplacée par l'ADN polymérase. Cette enzyme est constituée d'un complexe de dix protéines comprenant le complexe du noyau polymérase lui-même. Les autres protéines fonctionnent comme un système d'attache maintenant la polymérase sur chacun des brins matriciels et participent à l'assemblage du réplisome.
La polymérase III ajoute les désoxyribonucléotides triphosphates jusqu'à atteindre un ADN précédemment synthétisé.

L'ADN polymérase I (Pol I), en plus de synthétiser l'ADN, possède une activité exonucléasique 5'-3' qui supprime l'amorce ARN. Lorsque cette amorce est supprimée et remplacée par l'ADN, Pol I est relâchée (**Figure 27**). A cet instant, l'ADN ligase met alors en place une liaison phosphodiester finale. Cette enzyme est capable de ressouder des ruptures dans les ADN qui possèdent une extrémité 5-phosphate et 3'-hydroxyle et elle participe, comme Pol I, à la réparation de l'ADN (Griffits et Doebley, 2012).

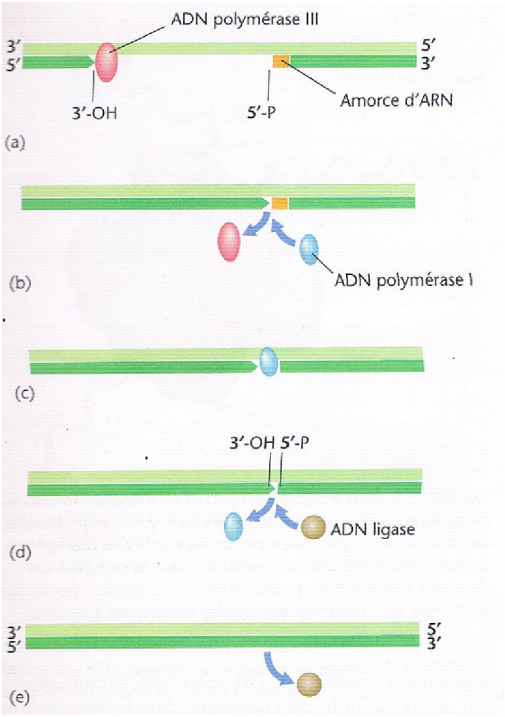


Figure 27 : Mécanisme de synthèse et d'élimination de l'amorce ARN et le remplacement par l'ADN (Madigan et Martinko, 2007)

En résumé le réplisome contient, en plus de la polymérase, plusieurs protéines clés de la réplication :

- l'ADN gyrase : qui supprime le superenroulement ;
- les ADN hélicase/primase qui déroulent et amorcent l'ADN ;
- les protéines de liaison simple brin, qui empêchent les brins séparés de reformer la double hélice.

3)- Les ribosomes

Ce sont des complexes ribonucléoprotéiques (c'est-à-dire composés de protéines et d'ARN) présents dans les cellules eucaryotes et procaryotes. Leur fonction est desynthétiser les protéines en décodant l'information contenue dans l'ARN messager. Ce sont de petites structures qui assurent la synthèse des protéines par un mécanisme appelé traduction.

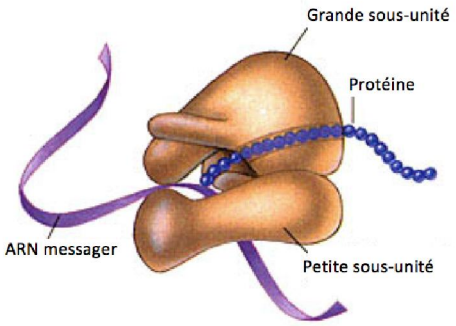


Figure 28 : Synthèse des protéines par le mécanisme de traduction chez les ribosomes (Madigan et Martinko, 2007)

4)-La membrane plasmique

La membrane plasmique ou cytoplasmique est une structure fine qui entoure la cellule. Avec ses 8 nm d'épaisseur, cette structure vitale constitue une barrière séparant l'intérieur de la cellule de son environnement. Si la membrane est cassée, l'intégrité cellulaire est atteinte, le cytoplasme se vide dans l'environnement et la cellule meurt.

4. 1. Rôles de la membrane plasmique (Figure 29)

- Rôle de barrière semi-perméable (ou semi sélective) : elle permet le passage de molécules lipophiles et empêche le passage des molécules hydrophiles. On distingue 2 grands types de transport :

- ✓ Le transport passif : il se fait dans le sens du gradient de concentration et ne nécessite pas d'énergie.
- ✓ Le transport actif : il 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 fixation des flagelles (voir « les flagelles » plus loin).

- Elle permet **l'ancrage des protéines ayant pour rôle :**

- ✓ Enzymes responsables de la biosynthèse et de l'excrétion dans l'espace périplasmique de molécules nécessaires à la synthèse de la paroi.
- ✓ Enzymes de la chaîne respiratoire permettant la synthèse d'ATP et celles de la photosynthèse : c'est la conservation de l'énergie.
- ✓ Des transporteurs de diverses molécules (ions, sucres, …) dans les 2 sens.

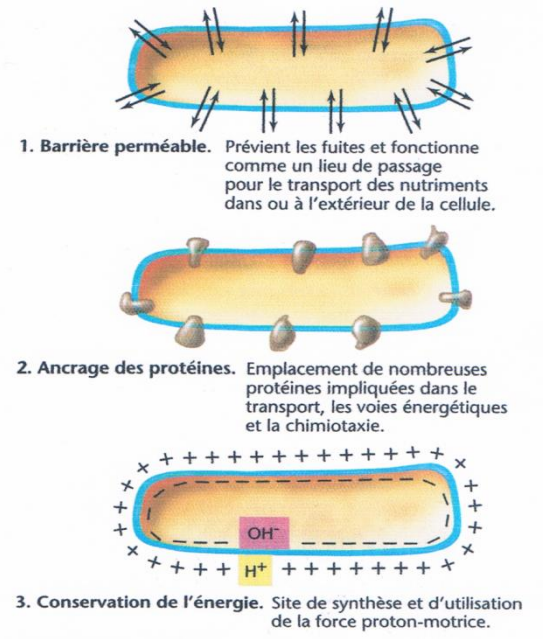


Figure 29 : Rôles de la membrane plasmique (Madigan et Martinko, 2007)

4. 2. La composition chimique de la membrane plasmique

La structure générale des membranes biologiques est une bicouche phospholipidique dans laquelle sont enchâssées des protéines. Les phospholipides contiennent à la fois des composants hydrophobes (acides gras) et hydrophiles (phosphates et glycérol) (**Figure 30)**.

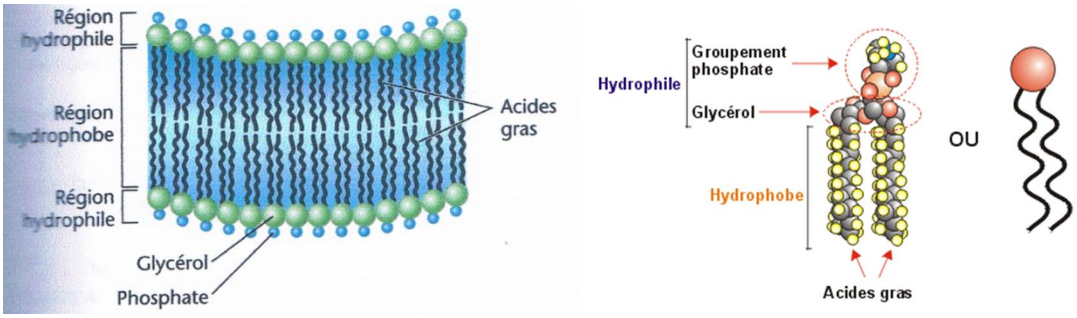


Figure 30 : Composition chimique de la membrane plasmique (Madigan et Martinko, 2007)

La membrane cytoplasmique contient entre 30-40% de lipides, 60-70% de protéines et les glucides qui sont liés d'une façon covalente aux protéines pour former les glycoprotéines. Il est noté l'absence du cholestérol et des glycolipides comparant à la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes. La majorité des protéines des membranes cytoplasmiques ont typiquement leurs surfaces externes hydrophobes au niveau des régions qui traversent la membrane et leurs surfaces hydrophiles qui sont en contact avec l'environnement extérieur et le cytoplasme (**Figure 31**).

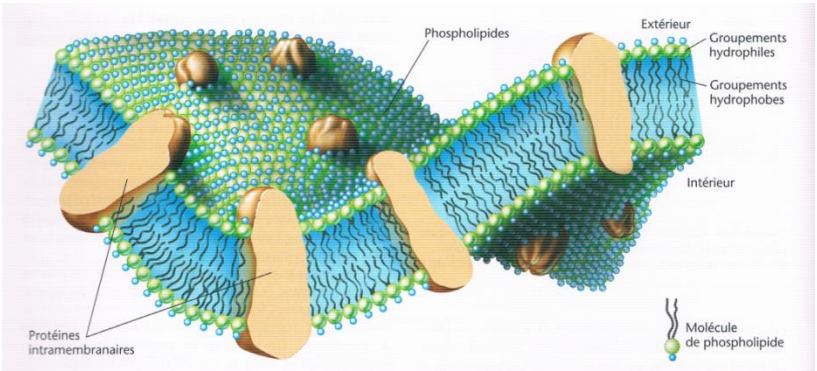


Figure 31 : Répartition des groupements hydrophiles et hydrophobes à travers la membrane plasmique (Madigan et Martinko, 2007)

5). La paroi

Elle représente une enveloppe rigide qui représente 20% du poids sec de la cellule. Elle confère à la cellule la résistance à la forte pression osmotique et joue un rôle dans la division cellulaire. Elle est, uniquement, absente chez les mycoplasmes.

5. 1. La paroi des bactéries Gram positif et Gram négatif

Le domaine de *Bacteria* est divisé en deux groupes suivant la réaction des cellules vis-à-vis de la coloration de Gram. La différence entre les deux groupes est liée à des variations dans la structure et la composition chimique de leur paroi. L'observation de coupes ultrafines de bactéries Gram positif (coloration violette) montre que leurs parois sont constituées de couches épaisses et globalement uniformes **(Figure 32)**. A l'inverse, les parois des bactéries Gram négatif (coloration rose) sont plus complexes en raison de la présence d'une membrane externe, en plus du peptidoglycane **(Figure 33)**.

Le constituant principal des bactéries Gram positif est le peptidoglycane. Suivant les espèces, il représente 40 - 80% de la matière sèche de la paroi. Le peptidoglycane est caractérisé par une résistance à la pression, proche de celle du béton armé. Ces parois contiennent, également, des acides teichoïques et lipoteichoïques qui présentent plusieurs rôles :

1/ Rôle antigénique.

2/ Responsable, en partie, de la charge négative de surface cellulaire.

3/ Site de liaisons pour des cations bivalents Ca^{2+} ou Mg^{2+}.

4/ Certains sont liés aux lipides membranaires appelés acides lipoprotéiques.

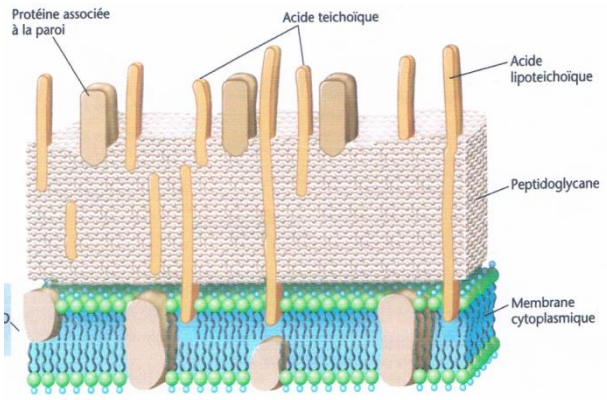


Figure 32 : Composition de la paroi des bactéries Gram positif (Madigan et Martinko, 2007)

Les bactéries Gram négatif **(Figure 33)** ne contiennent pas les acides teichoïques et lipoteichoïques et n'en possèdent qu'une ou ont des feuilles de bas poids moléculaires. Pour ces organismes, le peptidoglycane ne représente que 5% du poids de la paroi. Malgré cette faible proportion, le peptidoglycane forme une barrière externe rigide autour de la membrane cellulaire grâce aux liaisons covalentes échangées avec les principales protéines de la membrane externe.

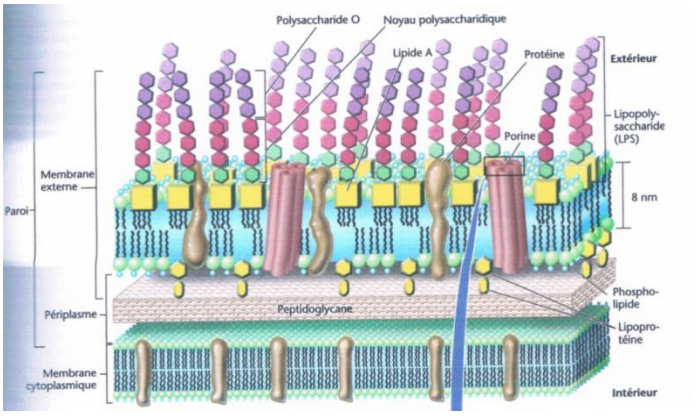


Figure 33 : Composition de la paroi des bactéries Gram négatif (Madigan et Martinko, 2012)

La membrane externe des bactéries Gram négatif présente un aspect analogue à celui de la membrane cellulaire. C'est une seconde bicouche lipidique, mais constituée également de :

1/ lipopolysaccharide : LPS. Il est constitué d'un noyau polysaccharidique et un polysaccharide O liés au lipide A.

- Le lipide A est doté de propriétés toxiques des bactéries Gram négatif pathogène (ex: *Salmonella*), ce qui a permis d'attribuer le terme endotoxine à ce constituant toxique du LPS.
- Le noyau polysaccharidique est constitué de 10 sucres.
- La chaine latérale O ou antigène O, chaine courte, sa composition varie selon la souche bactérienne.

Le LPS joue plusieurs fonctions, telle que l'attachement sur les surfaces et le blocage à l'entrée de substances toxiques. Il agit comme une endotoxine (lipide A) qui cause les symptômes des maladies induites par des Gram négatif telles que fièvres et lésions.

2/ protéines répartis en :

-protéines majeures : 70% des protéines de la membrane externe, les porines, groupées pour former des pores qui traversent toute la membrane externe et sont fortement liées au peptidoglycane (transport de petites molécules hydrophiles).

-protéines mineures : transport spécifique de molécules qui ne peuvent pas passer à travers les porines telles que les molécules hydrophiles ou chargées.

3/ lipoprotéines. Ils jouent le rôle de point d'ancrage entre la membrane et le peptidoglycane.

4/ peptidoglycane **(Figure 34).**

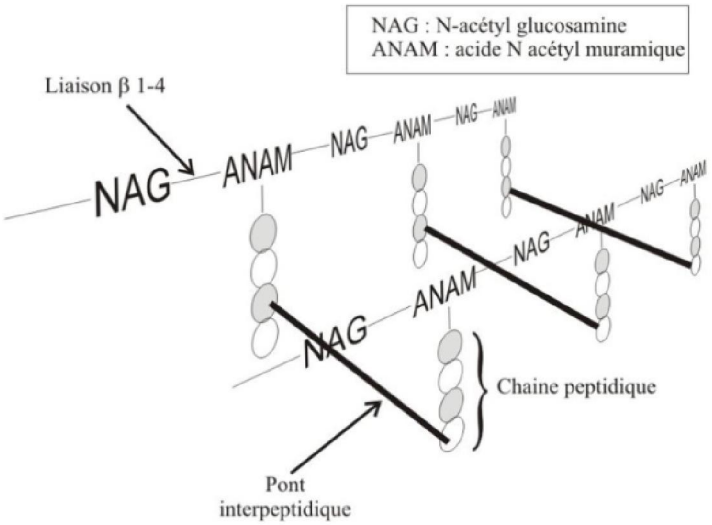


Figure 34 : La structure du peptidoglycane dans la paroi des bactéries Gram négatif et Gram positif (http://www.microbiologie-medicale.fr)

5/ bactoprénol : elle représente une molécule transporteuse de lipides. Il se lie aux précurseurs de peptidoglycane : N-acétyl glucosamine (NAG), l'acide N-acétylmuramique (ANAM) et un pentapeptide **(Figure 35)** et les transporte au travers de la membrane cytoplasmique jusqu'au périplasme grâce à son caractère hydrophobe.

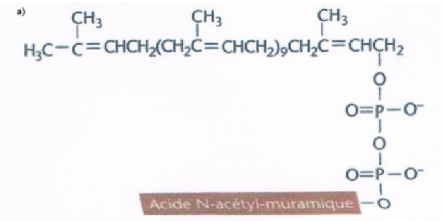


Figure 35 : La structure du bactoprénol dans la paroi des bactéries Gram négatif et Gram positif (Madigan et Martinko, 2007)

Une fois dans le périplasme, le bactoprénol réagit avec des enzymes qui additionnent les précurseurs de la paroi au point de croissance et catalysent les réactions de formation des ponts glycosidiques pour former une alternance des résidus NAG et ANAM (**Figure 36**).

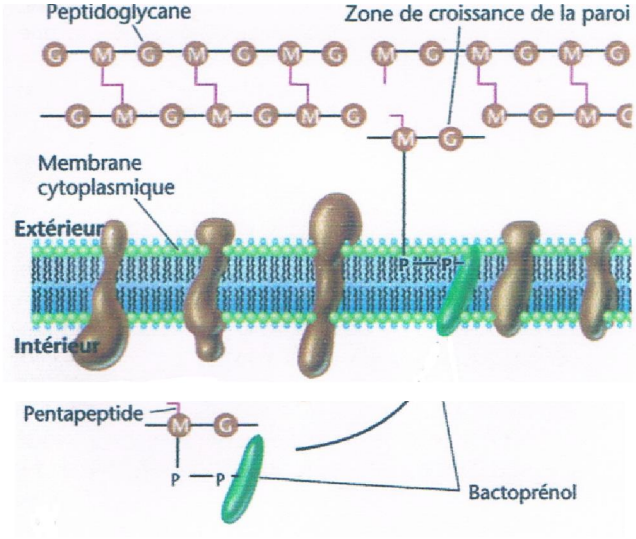


Figure 36 : L'action du bactoprénol dans la synthèse du peptidoglycane (Madigan et Martinko, 2007)

La dernière étape de la synthèse de la paroi est appelée **transpeptidation** **(Figure 36)**. Elle consiste en la formation de liaisons peptidiques entre résidus d'acide muramique contenus dans des chaines de glycane adjacentes. Ce pont peptidique comprend une ou plusieurs acides aminés selon la structure de la paroi de l'organisme considéré. Chez les bactéries Gram négatif telles que *Escherichia coli,* ce pont peptidique se réalise entre l'acide diamino-pimélique et la D-alanine des deux peptides adjacents. L'une des deux molécules de D-alanine présente initialement est éliminée lors de la transpeptidation. Ceci apporte l'énergie nécessaire pour la poursuite de la réaction, qui se réalise dans l'espace périplasmique ou l'ATP n'est pas disponible (**(Madigan et Martinko, 2007)**.

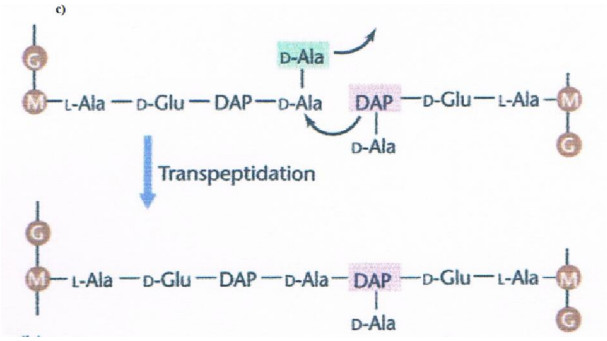


Figure 37 : La transpeptidation dans la synthèse du peptidoglycane (Madigan et Martinko, 2007)

Cette réaction de transpeptidation est intéressante du point de vue médical, car elle est inhibée par un antibiotique, la *pénicilline.* De nombreuses protéines se fixant à la pénicilline ont été identifiées dans le périplasme des bactéries Gram négatif, dont la protéine PLP appelée également transpeptidase (protéine liant la pénicilline). Lorsque la pénicilline se fixe à ces

protéines, elles ne présentent plus d'activité catalytique. En l'absence de synthèse de la nouvelle paroi, l'activité des autolysines va affaiblir la paroi pour finalement aboutir à la lyse cellulaire (Madigan et Martinko, 2007).

5. 2. La relation entre la structure de la paroi et la coloration de Gram

La différence entre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives lors de la réaction de coloration de Gram est due à la nature physique de leur paroi cellulaire.

Lors de cette technique, les bactéries sont d'abord colorées avec le cristal violet, un colorant à charge positive, qui est attiré par la charge négative nette de la cellule bactérienne, puis traitées avec de l'iode. L'iode est un mordant qui interagit avec le cristal violet en formant un complexe et entraine ainsi sa rétention. On considère que le traitement à l'éthanol lors de la décoloration, réduit la dimension des pores du peptidoglycane épais de la plupart des bactéries Gram-positives. Le peptidoglycane agit donc comme une barrière de perméabilité qui retiendrait le cristal violet. Les bactéries resteraient violettes. Par contre, le peptidoglycane des bactéries Gram-négatives est très mince et peu ponté, de plus il contient de larges pores. Le traitement par l'alcool extrait également assez de lipides de la membrane externe pour augmenter encore la porosité de la paroi. C'est pour ces raisons que l'alcool élimine plus facilement le complexe cristal violet-iode de ces bactéries. Le contre colorant, colore facilement les cellules décolorées pour les faire apparaitre en rose (Prescott, 2018).

6). Le périplasme

Il représente l'espace compris entre la paroi et la membrane cellulaire. C'est le siège d'une intense activité enzymatique. Différentes étapes de synthèse de la paroi y sont effectuées.

2. 1. 2. 2. Les éléments inconstants (facultatifs)

1). La capsule

De nombreux procaryotes sécrètent du matériel visqueux ou de consistance collante à leur surface. Certaines sont constituées de polysaccharides, d'autres de protéines. Ce sont des couches bien organisées, qui ne peuvent pas ôtées facilement (Prescott, 2018). Les termes capsule ou couche mucoide sont fréquemment utilisés pour désigner ces couches polysaccharidiques **(Madigan et Martinko, 2007)**.

Les capsules sont facilement visibles au microscope optique en utilisant des colorations particulières. Elles ne sont pas nécessaires pour la croissance et la multiplication des cellules cultivées en laboratoire. Mais, elles leur confèrent plusieurs avantages quand elles se développent dans leurs habitats normaux. Elles permettent aux bactéries pathogènes de résister à la phagocytose par les cellules phagocytaires de l'hôte (Prescott, 2018).

Une couche mucoide est une couche de substance diffuse et non organisée que l'on peut facilement enlever. Elle est en générale composée de polysaccharides, mais elle n'est pas facilement visible au microscope optique (Prescollt, 2018).

Le terme de glycocalyx fait référence à une couche qui est un réseau de polysaccharides recouvrant la surface des cellules. Ce terme pourrait comprendre à la fois les capsules et les couches mucoides.

2). Les couches S

Nombre de bactéries ont en surface une couche ayant une structure régulière, appelée couche S. cette couche S ressemble à un pavement régulier et est composé de protéines et de glycoprotéines. Chez les bactéries Gram-négatives typiques, la couche S adhère directement à la membrane externe. Elle est associée à la surface du peptidoglycane chez les bactéries Gram-positives typiques.

Certaines bactéries possèdent des structures entourant la paroi. On distingue en réalité 3 types de couches : la capsule, les couches mucoïdes et la couche S selon les bactéries (Prescott, 2018).

-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.
- ✓ d'antigénique : les antigènes capsulaires sont responsable de la spécificité sérologique. A partir de cette propriété, une classification peut être établie.

3).Vésicules à gaz

Certains procaryotes sont planctoniques, flottant durant leur existence au sein de la colonne d'eau dans les lacs et les océans. Ces vésicules à gaz confèrent aux espèces aquatiques une certaine flottabilité, c'est un moyen de mobilité verticale, permettent aux cellules de monter et de descendre dans la colonne d'eau, en réponse aux facteurs environnementaux **(Madigan et Martinko, 2007)**.

4). Les inclusions de stockage

Les procaryotes stockent diverses substances organiques ou inorganiques comme réserves de nutriments (Prescott, 2018). Ces substances sont conservées sous forme de polymères ce qui permet à la cellule de maintenir sa pression osmotique. Les principaux composés organiques

stockés par les bactéries sont : le glycogène, l'amidon, le poly-β-hydroxybutyrate et la cyanophycine.

5). Les flagelles ou les cils

De nombreuses bactéries mobiles se déplacent grâce à des flagelles, Ce sont des structures inconstantes chez les bactéries. Ils constituent les organes de locomotion pour les bactéries qui en possèdent.

Selon la disposition des flagelles, on distingue **(Figure 38)** :

- Les flagelles polaires **monotriches** (du grec *trikhos,* cheveu) ont un seul flagelle polaire ex *Pseudomonas*) ; s'il est situé à une extrélité, on le dit polaire (Prescott, 2018);
- Les flagelles amphitriche (du grec *amphi,* des deux côtés) ont un seul flagelle à chaque pôle, exemple : *Spirillium) ;*
- Les flagelles lophotriches ou polaire multitriche (du grec *lophos* signifie une touffe, *trichos* signifie cheveu) c'est-à-dire touffe de flagelles polaires, à une ou aux deux extrémités exemple *P.fluorescens ;*
- Les flagelles péritriches (du grec *peri,* autour) lorsque les flagelles sont répartis sur toute la surface des bactéries. Exemple : entérobactérie (*E.coli*)

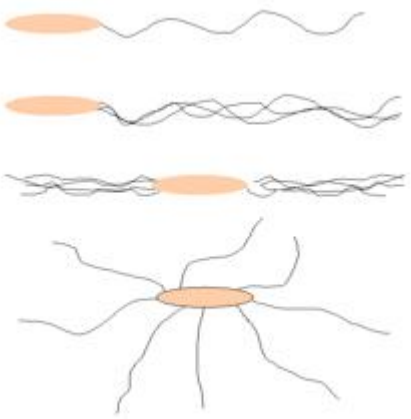


Figure 38 : Les différents flagelles

6). Les pili et les fimbriae

De nombreuses bactéries possèdent de courts appendices, fin comme des cheveux, plus minces que les flagelles et habituellement appelés fimbriae (sing. Fimbria) ou pili (sing. Pilus). Les termes sont synonymes, mais certaines structures sont toujours appelées (pilus sexuel) et d'autres toujours fibriae (Prescott, 2018). Les fimbiae donnent aux microrganismes une capacité d'adhésion. Les pili, malgré leur possible implication dans l'attachement comme les

fimbriae, sont clairement impliqués dans le processus de conjugaison chez les procaryotes **(Madigan et Martinko, 2007) (Figure 39).**

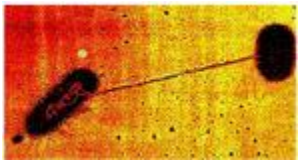


Figure 39 : Le pili

7). Les plasmides

En plus du matériel génétique présent dans le nucléoide, beaucoup de bactéries possèdent des molécules d'ADN extrachromosomiques appelées plasmides. Leur information génétique n'est pas nécessaire à l'hote et les cellules, qui en sont dépourvues, ont habituellement une activité normale. Néanmoins, de nombreux plasmides portent des gènes qui donnent un avantage sélectif à leur hôte dans certains milieux (Prescott, 2018).

7. 1. Structure des plasmides

Ce sont des molécules d'ADN bicaténaire, généralement circulaires (**Figure 40)**, mais il en existe des linéaires. Ils sont transmissibles aux cours des générations mais pas de façon équitable comme pour le chromosome. La perte d'un plasmide est dite curage.

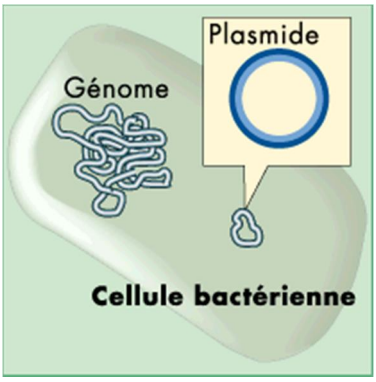


Figure 40 : Un plasmide

Les plasmides sont généralement de petite taille (1 kb à 400 kb) et représentent le 1/100 du chromosome bactérien. Ils portent très peu de gènes, moins de 30. On classe les plasmides selon leur fonction et leur propagation. On distingue, ainsi :

- Des plasmides conjugatifs, qui portent le gène responsable de la synthèse des pilis sexuels, nécessaires à la conjugaison ;
- Des plasmides R (facteurs de résistances) permettent aux bactéries de résister aux antibiotiques ;
- Des plasmides Col qui codent pour des protéines dites bactériocines, telle que la colicine *d'E.coli.* Les bactériocines donnent un avantage à la bactérie en tuant des souches très proches systématiquement parlant d'*E.coli ;*

- Des plasmides de virulence qui codent pour des toxines responsables des symptômes causés par des bactéries pathogènes ;
- Des plasmides métaboliques qui codent pour des enzymes capables de cataboliser des molécules complexes, aromatiques qui polluent notre environnement (pesticides) ou bien des nutriments comme le lactose, le citrate de Na et l'urée (Meyer, 2004; Madigan et Martinko, 2007 ; Prescott, 2018).

8). Les endospores

Certaines bactéries produisent des structures appelées endospores lors du phénomène de sporulation (**Figure 41**). Les endospores sont des cellules différenciées très résistantes à la chaleur et difficiles à détruire, même par traitement chimique ou par irradiation. La fonction biologique des endospores est de permettre à l'organisme de survivre à des conditions extérieures difficiles. Ce sont également des structures idéales pour être dispersées par le vent, l'eau ou le tractus intestinal des animaux. Les bactéries capables de sporulation se retrouvent le plus fréquemment dans le sol. Parmi les bactéries sporulées, les genres *Bacillus* et *Clostridium* sont les plus étudiés (**Madigan et Martinko, 2007**).

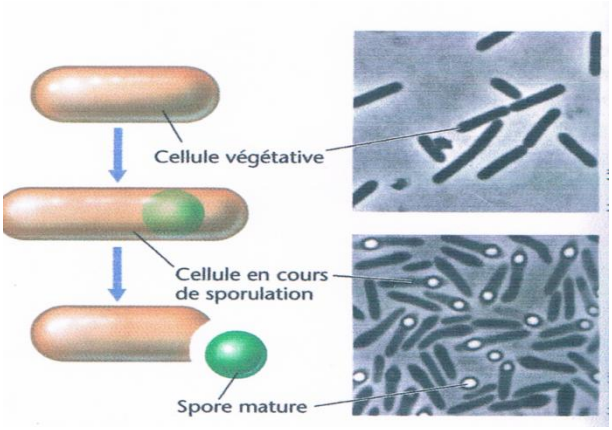


Figure 41 : La sporulation : la production des endospores (Madigan et Martinko, 2007).

L'endospore est structurellement plus complexe qu'une cellule végétative, car elle possède plusieurs enveloppes qui n'existent pas dans la cellule végétative.

8. 1. La sporulation des endospores

Il existe différents stades de sporulation de I à VII (**Figure 42).**

Stade 0: la cellule est en phase stationnaire accompagnée de l'arrêt de la synthèse de l'ADN, l'ARN et les protéines. L'ADN devient plus dense.

Stade I: le premier changement visible est la conversion de l'ADN en un filament chromatique axial qui s'étend sur presque toute la longueur de la cellule.

Stade II: il est caractérisé par un cloisonnement membranaire: septum de sporulation. Il se forme par une invagination de la membrane cytoplasmique.

Stade III: la synthèse du septum se poursuit (enkystement), il s'étend et se détache de la membrane plasmique en formant une préspore visible au microscope électronique.

Stade IV: la préspore va mûrir progressivement en s'entourant d'un certain nombre de téguments: la paroi sporale et le cortex. Il se produit une apparition de l'exosporium (glycoprotéine) à l'extérieur avec un début de déshydratation.

Stade V: la sporulation modifie la composition de la paroi, avec synthèse de l'acide dipicolinique et le pompage de Ca^{2+}. La déshydratation s'avance car la formation du complexe calcium- acide dipicolinique réduit encore la biodisponibilité de l'eau. On note également la synthèse des protéines SASP et formation de la tunique sporale.

Stade VI: il se produit la maturation de la spore par le développement de la résistance à la chaleur et aux agents chimiques.

Stade VII: il y a la lyse bactérienne et libération de la spore.

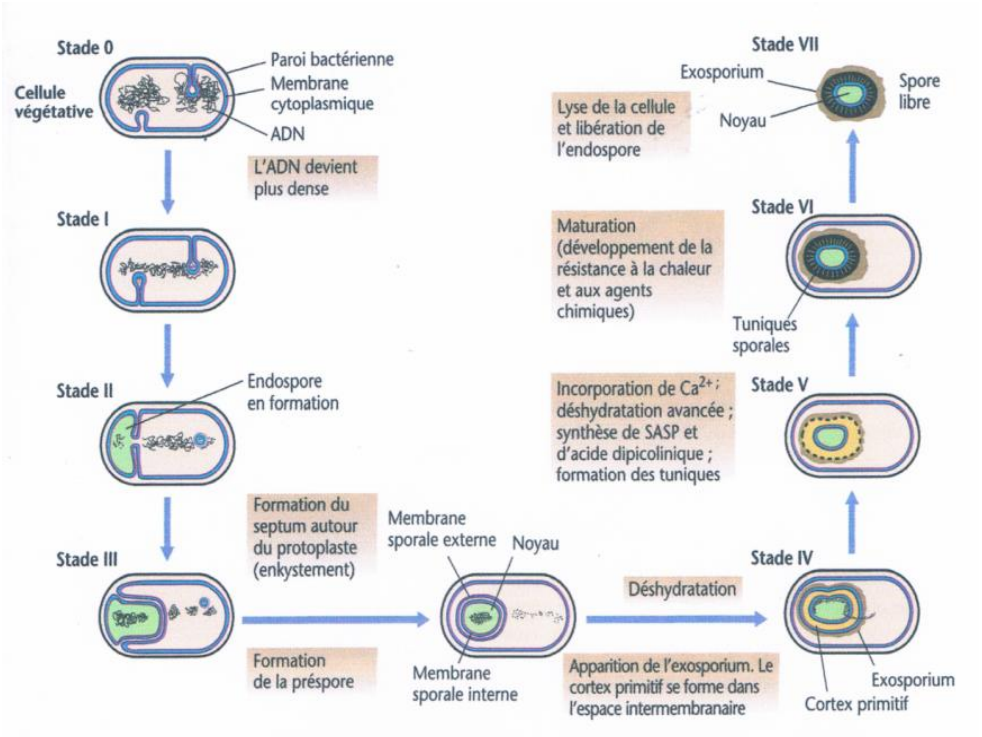


Figure 42 : La sporulation : la production des endospores (Madigan et Martinko, 2007).

Les différentes positions des spores sont représentées par les lettres A à G (**Figure 43).**

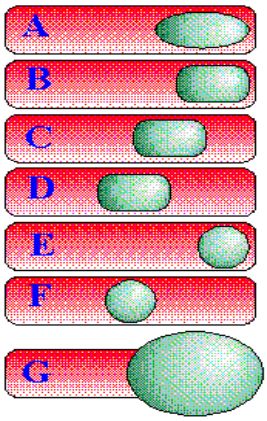


Figure 43 : Les différentes positions des spores dans la cellule végétative

A = ovale, terminale

B = rectangulaire, terminale

C = rectangulaire, subterminale

D = rectangulaire, centrale

E = circulaire, terminale

F = circulaire, centrale

G = terminale, en forme de club de golf

8. 2. La germination

Une fois les conditions sont favorables, la spore se réhydrate c'est la germination. Afin que la spore germe, elle doit se trouver dans des conditions favorables : eau, nutriments, pH, température convenable donc redonne naissance à une cellule végétative. On distingue 3 phases dans le processus de germination :

L'activation : est un processus qui prépare les spores à la germination et qui se produit généralement suite à un traitement, par exemple un chauffage.

La germination est l'interruption de l'état de dormance de la spore.

L'émergence, la spore peut commencer à synthétiser diverses molécules requises pour entamer l'émergence de la spore et retourner vers un stade végétatif.

Chapitre III

La taxonomie microbienne

Un des premiers outils nécessaire pour étudier la diversité de microorganismes sur terre est un système de classification fiable : la taxinomie ou taxonomie (du grec *taxis*, disposition ou ordre et *nomos*, loi ou *nemein*, distribuer ou gouverner) qui se définit comme la science de la classification biologique. Au sens large, elle est faite de trois parties séparées, mais reliées entre elles : la classification, la nomenclature et l'identification. La classification est l'arrangement des organismes en groupes ou taxons selon leur similitude ou leur parenté évolutive. La nomenclature est la branche de la taxinomie qui s'occupe de donner des noms aux groupes taxinomiques selon des règles publiées. L'identification est le côté pratique, elle consiste à déterminer qu'un isolat particulier appartient à un taxon connu. Une confusion existe entre taxinomie et systématique. La systématique étudie la diversité biologique et permet de classer, d'organiser les taxons dans un ordre logique. Ainsi, la systématique englobe des disciplines, comme la morphologie, la biologie, l'épidémiologie, la biochimie, la biologie moléculaire et la physiologie.

1. La classification

1. 1. La taxinomie polyphasique (dite conventionnelle)

En pratique, la détermination du genre et de l'espèce d'un procaryote nouvellement découvert est basée sur la taxinomie polyphasique qui inclut les caractères phénotypiques, génotypiques et phylogénétiques.

1. 1. 1. La classification phénotypique (ou phénétique)

Dans les années 60, la définition de chaque espèce en bactériologie n'utilisait que la prise en compte d'un certain nombre de caractères considérés comme importants tels que la morphologie, la nutrition, la physiologie, l'habitat,...

1. 1. 2. La classification génotypique

Elle est basée sur la détermination du pourcentage de guanine (G) et de cytosine (C) dans l'ADN d'un organisme (pourcentage de G+C). Ces pourcentages sont très variables, allant de 20 à presque 80% chez les procaryotes.

1. 1. 3. La taxinomie phylogénétique (dite moléculaire ou chimiotaxinomie

Le terme phylogénie (du grec *phylon* = tribu ou race, *genesis*= génération ou origine) désigne le développement évolutif d'une espèce.

1. 1. 3. 1. La classification phylogénétique ou phylétique : le ribotypage

Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis de caractériser les gènes qui codent pour les ARN ribosomaux (ARNr) c'est **le ribotypage**. En comparant une multitude de séquences d'ARNr 16S, appartenant à divers organismes vivants, il est arrivé à diviser les organismes vivants en trois domaines (**Figure 1)** : le domaine des *Bacteria* ou *Eubacteria*, le domaine des *Archaea* et le domaine des *Eucarya* (animaux, plantes, les mycètes et les protistes).

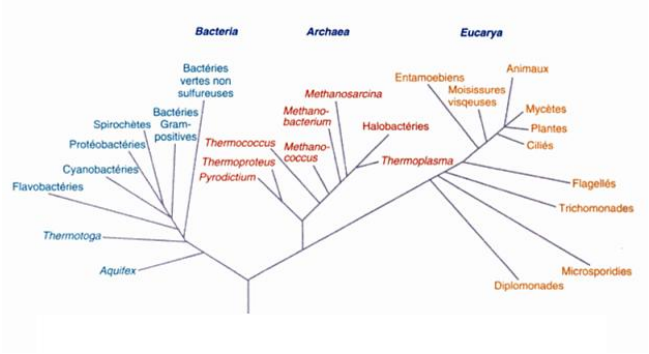


Figure 1 : La classification phylogénétique des organismes vivants

1. 1. 3. 2. La classification par hybridation ADN/ADN

Le pourcentage de G+C indique le pourcentage de chaque nucléotide dans l'ADN génomique d'une espèce donnée, mais ne donne absolument aucune information sur la séquence de ces nucléotides. Les séquences sont en fait importantes car si deux organismes possèdent beaucoup de séquences identiques dans leurs ADN, il est vraisemblable qu'ils contiennent de nombreux gènes très semblables, sinon identiques. Deux ADN doivent donc s'hybrider l'un avec l'autre en proportion de similitudes dans les séquences de leurs gènes. L'hybridation génomique mesure le degré de similitude de séquences de deux ADN (**Figure 2)** et s'avère très utile pour différencier les organismes très proches, lorsque le séquençage de l'ARNr ne permet de conclure.

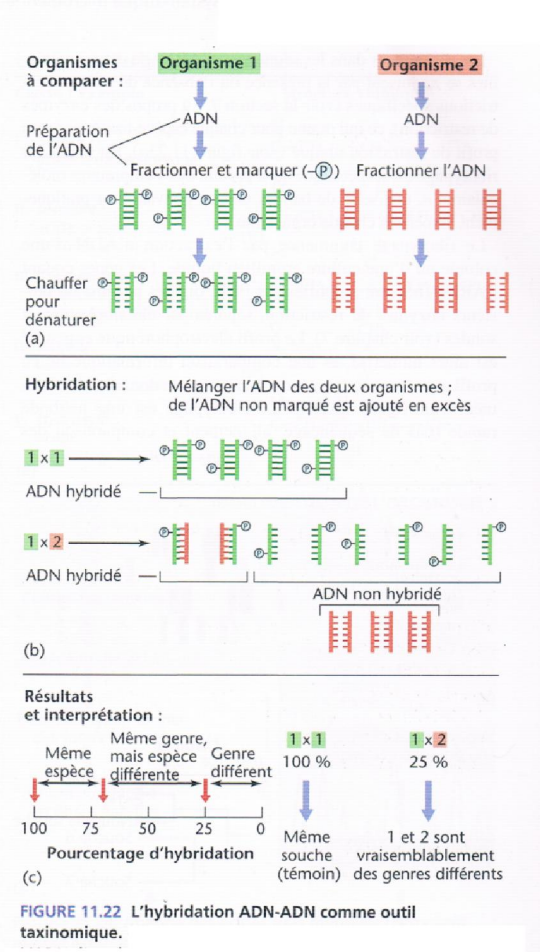


FIGURE 11.22 **L'hybridation ADN-ADN comme outil taxinomique.**

Figure 2 : La classification par hybridation ADN/ADN

1. 1. 3. 3. Analyses des esters méthylés d'acides gras

Une autre méthode d'identification bactérienne est basée sur la caractérisation des types et proportions d'acides gras présents dans les lipides de la membrane cytoplasmique et de la membrane externe (bactéries **Gram –**) des cellules. Cette technique nommée *FAME* (pour *fatty acid methyl ester*, ester méthylés d'acides gras) (**Figure 3**).

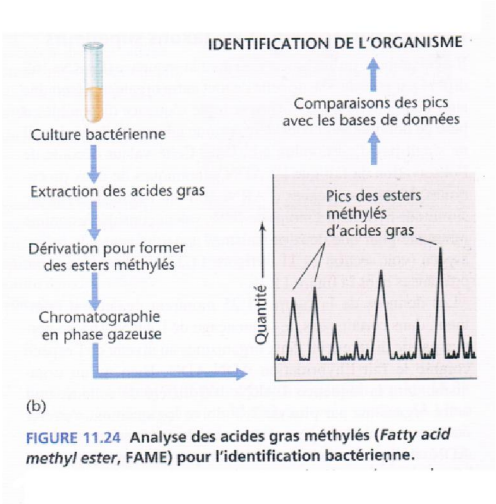


FIGURE 11.24 **Analyse des acides gras méthylés (*Fatty acid methyl ester*, FAME) pour l'identification bactérienne.**

Figure 3 : Classification par analyse des esters méthylés d'acides gras

1. 2. La taxinomie numérique

En taxinomie classique, les tests sont effectués dans un ordre déterminé et les résultats des premiers tests orientent le choix des tests suivants. Il est possible de traiter l'ensemble des résultats des tests réalisés simultanément par informatique. Un caractère positif est noté 1, un caractère négatif, 0 ; chaque microorganisme peut donc être caractérisé par une suite de chiffre : 1101001….La taxinomie numérique établit à partir de ces nombres caractéristiques un coefficient de similitude, qui exprime l'affinité entre deux souches.

1. 2. 1. La classification selon le manuel de *Bergey*

Ce qu'il faut savoir c'est qu'il n'existe pas une classification officielle des bactéries, mais on se réfère à la classification du manuel de ***Bergey***. Cette classification est la plus acceptée par tous les microbiologistes. Dans ces premières éditions, en 1936, elle se basait sur l'étude de :

- leur morphologie microscopique (bactérie de type coque, bacille, vibrion ; isolés, par deux, en chaînettes...) ;
- leur morphologie macroscopique (taille, forme, couleur,... des colonies sur milieux de culture gélosés) ;
- leur mobilité (mobilité ou immobilité à une température donnée) ;
- la présence de spores ;
- le résultat de la coloration de Gram (coloration de **Gram +** ou **Gram –**) ;
- la température de croissance (4°C, 20°C, 30°C, 37°C,...),
- le type respiratoire (aérobie, anaérobie strict, aéro-anaérobie facultatif, microaérophile,...) ;
- les besoins nutritionnels (nécessité de substances particulières pour le développement) ;
- la capacité à utiliser certaines sources de carbone ou d'azote (on parlera de biotypes ou biovars).

A cette période, les procaryotes étaient répartis en 4 divisions reconnues sur la base de l'existence ou non de la paroi. : les *Gracilicutes*, les *Firmicutes*, les *Tenericutes*, les *Mondosicutes.*

Division 1 : les *Gracilicutes* (peau fine)

Classe 1 : *Scotobacteria* (Bactéries chimiolithotrophes ; Myxobactéries ; Bactéries à trichomes ; Bactéries appendiculées et bactéries bourgeonnantes ; Spirochètes ; Bactéries Gram – aérobies / microaérophiles ; Bactéries Gram – anaérobies facultatives ; Bactéries Gram – anaérobies strictes ; Rickettsies et chlamydies)

Classe 2 : *Anoxyphotobactéria* (Bactéries phototrophes)

Classe 3 : *Oxyphotobactéria* (Cyanobactéries)

Division 2 : les *Firmicutes* (peau dure)

Classe 1 : *Firmibacteria* (Bactéries **Gram +** non sporulées et Bactéries **Gram +** sporulées)

Classe 2 : *Thallobactéria* (Actynomycètes)

Division 3 : les *Tenericutes* (peau tendre) (sans paroi)

Classe 1 : *Mollicutes* (Mycoplasmes)

Division 4 : les *Mendosicates* (peau défectueuse)

Classe 1 : *Archéobactéria* (Archéobactéries)

Dans l'édition récente et moderne avec l'utilisation de la classification polyphasique, les procaryotes sont divisés en deux domaines *Eubacteria* et *Archaeobacteria* qui comprennent 34 phylums : 30 pour *Eubacteria* et 45 pour *Archaeobacteria.*

2. La nomenclature : les rangs taxonomiques

La classification des microorganismes consiste à les placer dans des niveaux taxinomiques hiérarchisés. Le rang le plus élevé est le domaine, ensuite il y a le phylum, la classe, l'ordre, la famille, le genre et l'espèce. Certains procaryotes sont aussi attribués en une sous-espèce (**Figure 4**).

2. 1. Définitions

Espèce : c'est le groupe de base en taxinomie microbienne. C'est un ensemble de souches qui partagent de nombreuses propriétés stables et diffèrent de façon significative des autres groupes de souches.

Souche : elle est constituée des descendants d'une seule culture microbienne pure. Il y a un bon nombre de façons différentes pour décrire les souches à l'intérieur d'une espèce :

- **Biovars :** sont des souches variantes caractérisées par des différences biochimiques ou physiologique ;

- Morphovars : diffèrent morphologiquement ;

- **Sérovars :** ont des propriétés antigéniques distinctes ;

Genre : est un groupe bien défini, d'une ou de plusieurs espèces, qui est clairement séparé des autres genres.

2. 2. Principales règles de nomenclature

• La nomenclature bactérienne utilise des mots latins ou latinisés qui sont traditionnellement écrits en italique ou ils sont soulignés dans un manuscrit.

• Aucun signe diacritique (á, à, â, ä, ã, é, è, ê, ë, í, î, ï, ñ, ó, ò, ô, ö, õ, ú, ù, û, ü, ø, æ...) n'est toléré et les mots ne doivent pas contenir de trait d'union. Par exemple, on doit écrire *Bacteroides* et non *Bacteroïdes*.

• Les noms de famille et de genre s'écrivent avec une majuscule.

• Les noms des espèces sont formés d'une combinaison binaire c'est le **système binomial** dont le premier terme est le nom de genre et d'un deuxième terme l'espèce. Le premier terme prend une majuscule et le deuxième terme commence par une minuscule (exemple : *Streptococcus equi*). Après une première citation, l'utilisation de la première lettre du nom de genre suivie d'un point puis de l'espèce est tolérée (exemple : *S. equi*).

• Les noms des sous-espèces sont formés d'une combinaison ternaire commençant par le nom d'espèce suivi par l'abréviation « subsp. » et d'un troisième terme propre à la sous-espèce (exemple : *Streptococcus equi* subsp. *equi*).

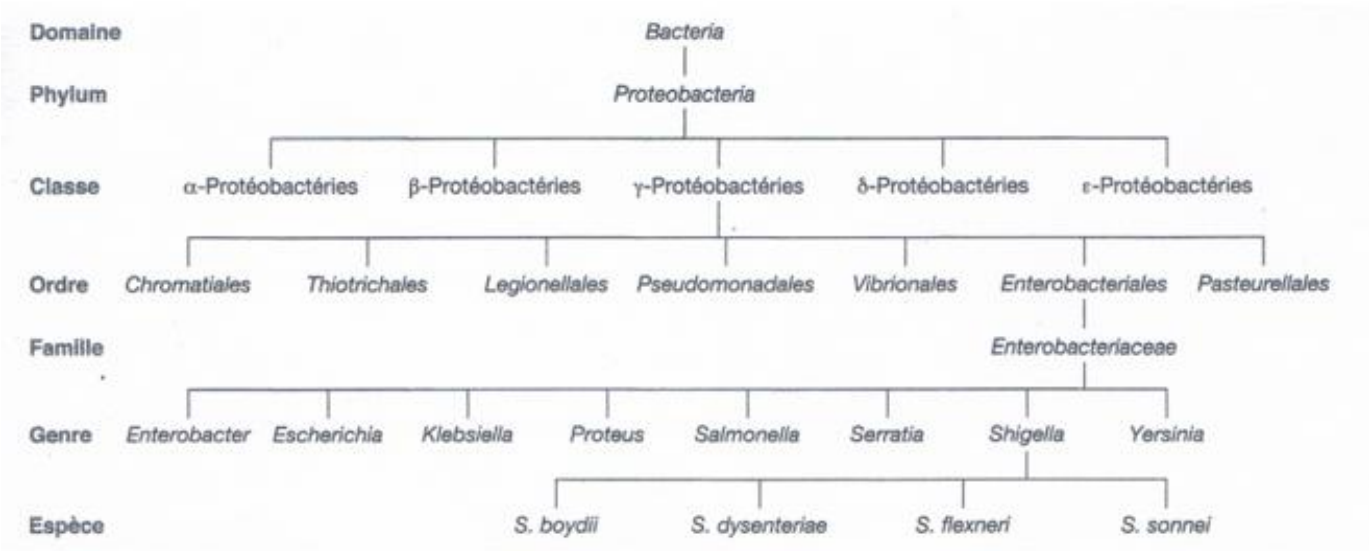


Figure 4 : Les rangs taxonomiques

Chapitre IV

Nutrition, culture et croissance des microorganismes

Avant qu'elle puisse se diviser, une cellule doit coordonner un grand nombre de réactions chimiques différentes et assembler les molécules en structures spécifiques. Le terme métabolisme désigne l'ensemble de toutes ces réactions. Les réactions métaboliques comprennent d'une part des réactions libérant de l'énergie, ou réactions cataboliques (catabolisme), et d'autre part des réactions consommant de l'énergie, ou réactions anaboliques (anabolisme).

1. La nutrition et culture des microorganismes

1. 1. Les types nutritionnels (trophiques)

Tous les organismes ont besoin d'une source d'énergie pour maintenir leur équilibre et leur complexité. De plus, l'importance des réactions d'oxydoréduction au sein du métabolisme cellulaire impose aux organismes d'avoir une source d'électrons. Enfin, la vie sur Terre est à base de carbone. Tous les organismes doivent donc puiser leur carbone dans leur environnement afin de synthétiser les molécules nécessaires à leur survie. L'importance centrale de l'énergie, des électrons, et du carbone, a conduit les biologistes à décrire un organisme selon la manière dont ces impératifs sont obtenus. Les termes conçus pour cela peuvent être combinés pour caractériser le type nutritionnel d'un organisme (Prescott, 2018). Les cellules sont constituées principalement de macromolécules, polymères composés d'unités plus petites appelées monomères et d'eau. La nutrition microbienne est le domaine qui étudie les processus par lesquels les cellules incorporent les monomères ou leurs précurseurs indispensables à leur croissance. Ces substances sont appelées nutriments.

Pour chacun de ces besoins-énergie, électrons, carbone- il y a une dichotomie dans la manière dont un organisme les satisfait. Selon la nature de ces besoins, on sera amené à définir des catégories de microorganismes que l'on appelle des **types trophiques** (du grec *trophus* : nourriture).

1. 1. 1. Source d'énergie les organismes ne disposent que deux sources d'énergie : la lumière et un certain nombre de molécules.

- **les phototrophes ou photosynthétiques** (de photo qui signifie lumière) qui puisent leur énergie dans le rayonnement lumineux **(tableau 1)**.

Tableau 1 : Sources de carbone, d'énergie et d'électrons (Prescott, 2018)

Source de carbone	
Autotrophes	CO_2, seule ou principale source de carbone
Hétérotrophes	Molécules organiques réduites ou préformées
Sources d'énergie	
Phototrophes	Lumière
Chimiotrophes	Oxydation de composés organiques ou inorganiques
Sources d'électrons	
Lithotrophes	Molécules inorganiques réduites
Organotrophes	Molécules organiques

1. 1. 2. Source d'électrons, les **lithotrophes** (littéralement les mangeurs de roches) utilisent un substrat inorganique réduit comme donneur d'électrons, alors que les **organotrophes,** tirent leurs électrons de substrats organiques réduits.

1. 1. 3. Sources de carbone, les organismes peuvent être **hétérotrophes,** lorsqu'ils utilisent pour leur croissance des molécules préexistantes réduites comme source de carbone, ou bien **autotrophes**, lorsqu'ils utilisent le dioxyde de carbone (CO_2) comme seule source ou principale source de carbone.

Sur la base de la définition de ces termes, la plupart de ces organismes peut être placée dans l'un des cinq types nutritionnels d'après leur source principale de carbone, d'énergie, et d'électrons **(tableau 2)**

La majorité des micro-organismes étudiés jusqu'à présent sont soit photolithoautotrophes, chimiolithoautotrophes, ou chimio-organohétérotrophes. Les **photolithoautotrophes** (souvent simplement appelés **photoautotrophes**) utilisent l'énergie lumineuse et ont le CO_2 pour source de carbone.

Les **chimio-organohétérotrophes** (parfois appelés **chimiohétérotrophes** ou encore chimioorganotrophes) utilisent les composés organiques réduits synthétisés par les autotrophes comme source d'énergie, d'électrons, et de carbone. Fréquemment, la même substance organique satisfait tous ces besoins.

Les autres types nutritionnels comptent moins de microorganismes connus mais sont écologiquement très importants. Certaines bactéries phototrophes utilisent la matière organique

Tableau 2 : Principaux types nutritionnels de micro-organismes (Prescott, 2018)

Type nutritionnel	Source de carbone	Source d'énergie	Source d'électron	Micro-organisme représentatif
Photolithoautotrophe	CO_2	Lumière	Donneur d'é organique	Bactéries sulfureuses pourpres et vertes, cyanobactéries, diatomées
Photoorganohétérotrophe	Carbone organique	Lumière	Donneur d'é organique	Bactéries non sulfureuses pourpres et vertes
Chimiolithoautotrophe	CO_2	Composés inorganiques	Donneur d'é inorganique	Bactéries oxydatrices du soufre, oxydatrices de l'hydrogène, méthanogène, nitrifiantes, oxydatrices du fer
Chimiolithohétérotrophe	Carbone organique	Composés inorganiques	Donneur d'é inorganique	Certaines bactéries oxydatrices du soufre
Chimioorganohétérotrophe	Carbone organique	Composés organiques, souvent identiques à la source de carbone	Donneur d'é organique souvent identiques à la source de carbone	La plupart des microorganismes non photosynthétiques, dont la majorité des pathogènes, des champignons, et de nombreux protistes et archées.

comme donneur d'électrons et source de carbone. Ces photoorganohétérotrophes sont hôte communs des lacs et cours d'eau pollués. Les chimiotithohétérotrophes utilisent des molécules inorganiques réduites comme source d'énergie et d'électrons, mais tirent leur carbone de sources organiques (Prescott, 2018).

1. 2. La nutrition microbienne

Les cellules sont constituées principalement de macromolécules, polymères composés d'unités plus petites appelées monomères et d'eau. La nutrition microbienne est le domaine qui étudie les processus par lesquels les cellules incorporent les monomères (ou les précurseurs de monomères) indispensables à leur croissance. Ces substances sont appelés nutriments.

Les besoins nutritifs diffèrent en nature et en quantité selon les organismes. Quelques nutriments, appelés macronutriments **(tableau 3)** sont utilisés en quantité importante ; d'autres, les micronutriments, sont utilisés en quantité moindre, parfois même à l'état de traces.

1. 2. 1. Le carbone

Le carbone, est un **élément indispensable** à toutes les cellules et la plupart des procaryotes utilisent un composé organique comme source de carbone. Environ **50% du poids sec d'une cellule microbienne** est composé de carbone. Des composés organiques carbonés comme des **acides aminés, des acides gras, des acides organiques, des sucres**…sont assimilés par les microorganismes pour synthétiser leurs composants cellulaires. La liste des substrats carbonés utilisables par une souche bactérienne comme unique source de carbone et d'énergie constitue **l'auxanogramme de la souche**.

1. 2. 2. L'azote

L'élément le plus abondant dans les cellules après le carbone est **l'azote.** Environ **12% du poids sec d'une cellule microbienne** est constitué d'azote, élément présent dans les **protéines, les acides nucléiques et plusieurs autres constituants cellulaires.**

Dans le milieu naturel, l'azote se trouve sous forme **organique et inorganique.** L'azote assimilable se manifeste cependant sous forme inorganique : ammoniaque (NH_3), nitrate (NO_3^-), ou N_2. Les bactéries fixatrices d'azote utilisent **l'azote atmosphérique (N_2) comme unique source d'azote (ex : *Rhizobium*)** (Madigan et Martinko, 2007).

1. 2. 3. Les macronutriments : P, S, K, Mg, Ca, Na

Le phosphore est un constituant des composés hautement énergétique (ex : ATP), des phospholipides membranaires et des acides nucléiques.

Le soufre le soufre entre dans la composition de deux acides aminés, la cystéine et la méthionine, qui participent à la structure des protéines.

Tableau 3 : Macronutriments rencontrés en milieu naturel et présents dans les milieux de culture (Madigan et Martinko, 2007)

Eléments	Types courants de nutriments dans l'environnement	Forme chimique apportée aux milieux de culture
Carbone (C)	CO_2, composés organiques	Glucose, malate, acétate, pyruvate, acides aminés, des centaines d'autres composés ou des mélanges complexes (extrait de levure, peptone, tec.)
Hydrogène (H)	H_2O, composés organiques	H_2O, composés organiques
Oxygène (O)	H_2O, O_2, composés organiques	H_2O, O_2, composés organiques
Azote (N)	NH3, NO_3^-, N_2, O_2, composés organiques	Inorganiques : NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$, KNO_3, N_2 Organiques : acides aminés, bases azotés de nucléotides, beaucoup d'autres composés contenant N.
Phosphore (P)	PO_4^{3-}	KH_2PO_4, Na_2HPO_4
Soufre (S)	H_2S, SO_4^{2-}, composés organiques soufrés S, sulfures métalliques (FeS, CuS, ZnS, NiS, etc.)	Na_2SO_4, $Na_2S_2O_3$, Na_2S, cystéine ou autres composés organiques soufrés
Potassium (K)	K^+ en solution ou sous diverses formes de sels de K	KCl, KH_2PO_4
Magnésium (Mg)	Mg^{2+} en solution ou sous diverses formes de sels de Mg	$MgCl_2$, $MgSO_4$
Sodium (Na)	Na^{2+} en solution ou sous forme de NaCl ou d'autres sels de Na	NaCl
Calcium (Ca)	Ca^{2+} en solution ou sous forme de $CaSO_4$ ou d'autres sels de Ca	$CaCl_2$
Fer (Fe)	Fe^{2+} ou Fe^{3+} en solution ou sous forme de FeS, $Fe(OH)_3$ ou de nombreux autres sels de Fe	$FeCl_3$, $FeSO_4$, diverses solutions chélatant le fer (Fe^{3+} EDTA, Fe^{3+}citrate, etc.)

Certains de ces éléments jouent sans aucun doute un rôle dans l'équilibre physico-chimique de la cellule. Ce sont notamment le potassium (K^+), le sodium (Na^+), le magnésium (Mg^{2+}) et le chlore (Cl). Ils souvent appelés microéléments. Beaucoup plus nombreux, sont partie constituante d'une enzyme ou d'une coenzyme come le calcium, fer (Fe^{2+}) ou le cobalt (Co), Cu, Mn, Mo, on les appelle fréquemment des oligoéléments. Le fer joue un rôle important dans la respiration cellulaire.

1. 2. 4. Les micronutriments

Bien que nécessaires en très faible quantité, les micronutriments sont néanmoins indispensables au bon fonctionnement cellulaire. Comme le fer, les micronutriments, souvent appelés oligo-éléments, sont des métaux. Ils jouent généralement un rôle dans la catalyse en tant que composants de diverses enzymes (Madigan et Martinko, 2007).

1. 2. 5. Les facteurs de croissance

Ce sont des composés organiques qui, comme les micronutriments, sont nécessaires en très petite quantité à certains microorganismes. Les vitamines, les acides aminés, les purines et les pyrimidines sont des facteurs de croissance synthétisés par la plupart des microorganismes. Quelques microorganismes doivent cependant obtenir ces constituants essentiels à partir de leur environnement. Pour ces derniers, ces composés doivent donc être rajoutés au milieu de culture.

2. La croissance microbienne

2. 1. La croissance cellulaire

La croissance est définie par un accroissement du nombre de cellules. Les cellules ont une période de vie limitée et le maintien d'une espèce est lié à une croissance continue de sa population. Chez la plupart des procaryotes, la croissance d'une cellule se poursuit jusqu'à sa division en deux nouvelles cellules. Ce processus est appelé fission binaire (Madigan et Martinko, 2007) ou scissiparité **(Figure 1)**.

La scissiparité est un type de relativement simple de division cellulaire : la cellule s'allonge pendant que nouveaux constituants sont synthétisés, réplique son chromosome et sépare les molécules d'ADN nouvellement formées de manière à ce qu'il y ait un chromosome dans chaque moitié de la cellule. Finalement, un septum se forme au milieu de la cellule en divisant la cellule parentale en deux cellules filles contenant chacune son chromosome et une partie des autres constituants cellulaires.

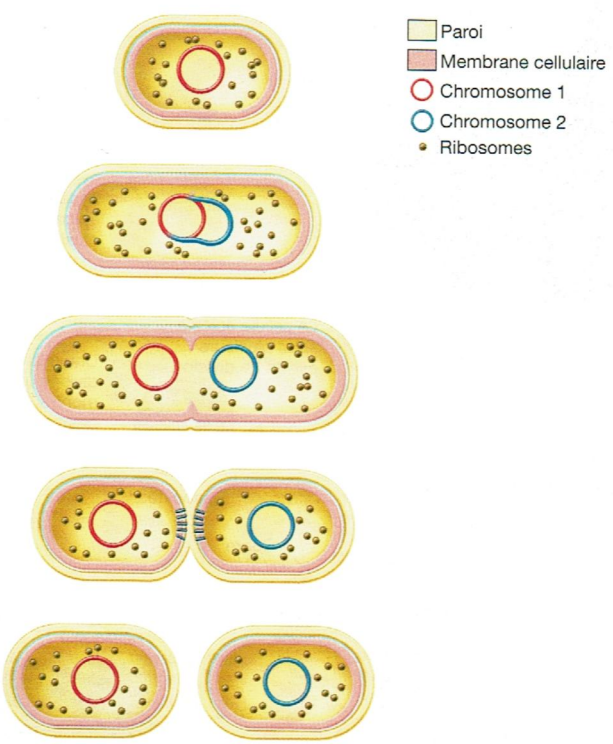


Figure 1 : La scissiparité (Prescott, 2018)

2. 2. La courbe de croissance

Au cours du cycle de division cellulaire tous les composants structurels de la cellule se dupliquent. Si l'intervalle pour la formation de deux cellules à partir d'une est appelé **génération**, le temps nécessaire à cet évènement est appelé **temps de génération.** C'est donc le temps indispensable pour que la population cellulaire double (Madigan et Martinko, 2007). Si on trace la courbe représentant le nombre de cellules en fonction du temps, X= f (t) **(figure 2)**, on obtient une courbe qui comprend quatre phases distinctes :

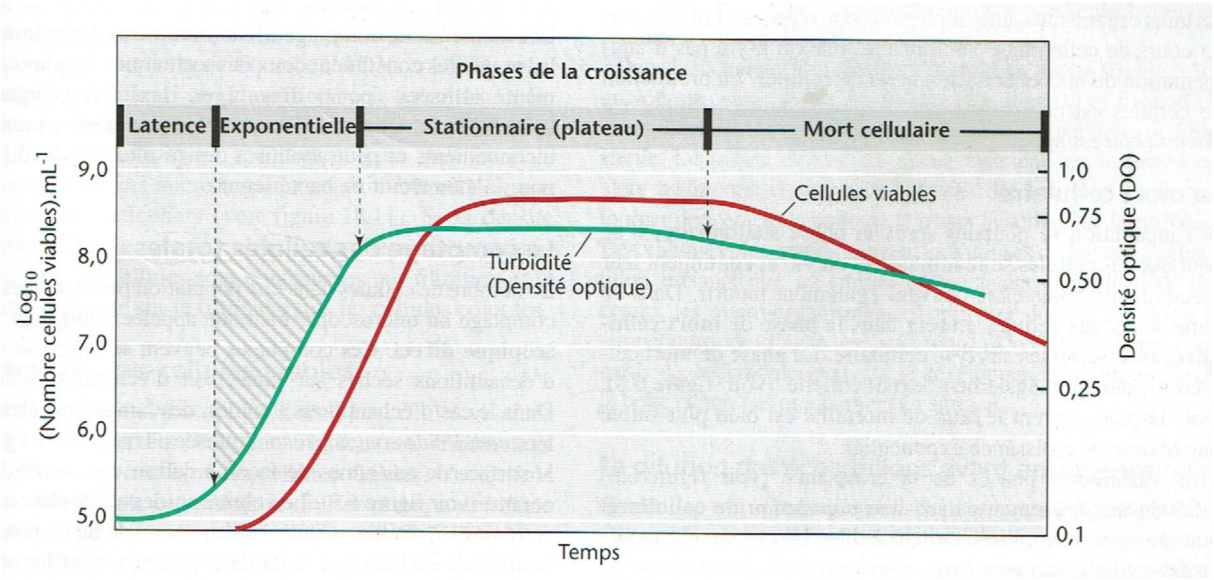


Figure 2 : La courbe de croissance microbienne (Madigan et Martinko, 2007).

La phase de latence

C'est la phase pendant laquelle la vitesse spécifique de croissance est nulle, la biomasse n'augmente pas. Elle dure plus ou moins longtemps selon le cas et parfois même n'existe pas, la culture démarrant immédiatement en phase exponentielle (Madigan et Martinko, 2007). Ce n'est pas une période d'inactivité, car les cellules synthétisent de nouveaux composants. Cela peut être nécessaire pour différentes raisons :

- Plus l'inoculum est important, plus la phase de latence est réduite ;
- L'âge des bactéries semble également avoir une influence : lorsque des cellules jeunes, de quelques heures, sont introduites dans un milieu neuf, la phase de latence peut être extrêmement courte ; elle est au contraire prolongée avec des bactéries provenant d'une culture en phase stationnaire ou en phase de déclin qui contient plus de cellules mortes que cellules vivantes. De plus, ces dernières sont aussi dans un état physiologique peu favorable, il leur faut le temps nécessaire pour restaurer tous leurs systèmes enzymatiques mis en sommeil pendant leur maintien à l'état non proliférant.
- La composition du milieu. Un inoculum cellulaire prélevé en phase exponentielle de croissance et introduit dans un milieu neuf de composition chimique identique se multiplie instantanément sans aucune phase de latence. En revanche, si les constituants nutritifs (source de carbone, d'azote) sont différents, on observe à nouveau une phase de latence. Celle-ci traduit l'absence d'enzymes nécessaires à l'utilisation de ces nouveaux substrats et la nécessité pour la

cellule de les synthétiser. Une période d'adaptation enzymatique est nécessaire pour induire la synthèse de ces nouvelles enzymes (Madigan et Martinko, 2007).

La phase exponentielle

Pendant cette phase, les microorganismes se développent et se divisent à la vitesse maximale possible en fonction de leur potentiel génétique, de la nature du milieu et des conditions de culture. Leur vitesse de croissance est constante pendant la phase exponentielle **(Figure 2)**. C'est-à-dire que les organismes se divisent et doublent leur nombre à intervalles de temps réguliers (Prescott, 2018). Durant cette phase, la population est presque uniforme en termes de propriétés chimiques et physiologiques.

C'est la phase physiologique par excellence : les bactéries se multiplient sans entrave. Pendant cette phase, on assiste à la libération de métabolites primaires d'intérêt industriel (Madigan et Martinko, 2007).

La phase stationnaire

Elle ne dure que quelques heures. Le milieu devient de moins en moins favorable à la croissance. Le nombre des cellules viables reste constant. Il peut correspondre à un équilibre entre le nombre de cellules provenant de la multiplication et le nombre de cellules qui disparaissent par autolyse. Il peut aussi traduire la persistance de bactéries vivantes en l'absence de tout développement. On peut attribuer ce phénomène à un certain nombre de causes au premier rang desquelles s'inscrirait l'épuisement de l'aliment, l'accumulation des déchets toxiques ou l'évolution défavorable de l'environnement physique (pH) (Madigan et Martinko, 2007).

La phase de déclin ou de mortalité

Au cours de cette dernière phase, les bactéries ne se divisent plus. Beaucoup d'entre elles meurent et sont lysées par les enzymes qu'elles libèrent (auto-lysines) (Madigan et Martinko, 2007).

2. 3. Les mathématiques de la croissance (Prescott, 2018)

Permet le calcul de deux valeurs importantes : la constante de vitesse de croissance (k) et le nombre de génération par unité de temps et est souvent exprimé en générations par heure.

Calcul de la constante de vitesse de croissance

Chaque cellule microbienne donne après multiplication deux cellules identiques. Après n générations, le nombre initial de cellules N_0 pour $t_0=0$, devient au temps t, N tel que :

Considérons N_0 nombre de cellules à t_0

N nombre de cellules à t

n nombre de génération dans le temps t

Pour des populations se reproduisant par scissiparité

$$N=N_0 \times 2^n$$

La valeur de n, le nombre de génération, peut être obtenue en prenant les logarithmes en base 10

$$\log N = \log N_0 + n \log 2$$

$$n = (\log N - \log N_0)/\log 2$$

La constante de vitesse de croissance (k) est le nombre de générations par unités de temps (n/t). donc :

$$\mathbf{k = n/t = (\log N - \log N_0)/0{,}301t}$$

Calcul du temps de génération (de doublement)

Si la population double, alors

$$N = 2N_0$$

En substituant 2 N_0 dans l'équation de la constante de vitesse de croissance, on peut déterminer k.

$$k = [\log (2N_0) - \log N_0]/0{,}301g = [\log 2 + \log N_0 - \log N_0]/0{,}301g$$

$$k = 1/g$$

Le temps de génération est l'inverse de la constante de vitesse de croissance.

$$\mathbf{g = 1/k}$$

2. 4. Mesure de la croissance

Les techniques de mesure de la croissance sont fondées sur l'évolution du nombre de microbes ou de leur masse par unité de volume ou de poids de milieu.

2. 4. 1. Mesure de la biomasse

a) Détermination du poids total des cellules

Les cellules cultivées dans un milieu liquide peuvent être concentrées dans le fond d'un tube par centrifugation :

*** le poids de la matière humide** du culot de cellules peut être mesuré en le plaçant dans un récipient de poids connu, la différence entre les deux valeurs donnant le poids effectif.

*** le poids de la matière sèche** les microorganismes sont récoltés par centrifugation ou par filtration sur membrane. Après un lavage soigneux à l'aide d'un tampon approprié, le culot ou le filtre est desséché à 100- 110°C. Après refroidissement à température ambiante en atmosphère sèche, il est ensuite pesé. Le poids est exprimé généralement en grammes de matière sèche par litre.

b) Mesure du trouble

C'est le procédé le plus simple, le plus rapide et actuellement le plus utilisé pour évaluer la masse microbienne. Il s'agit d'une méthode optique générale, appelée turbidimétrie, fondée sur la propriété que présente toute suspension de diffracter une partie de l'intensité d'un faisceau de lumière qui la traverse en ligne droite **(Figure 3)**.

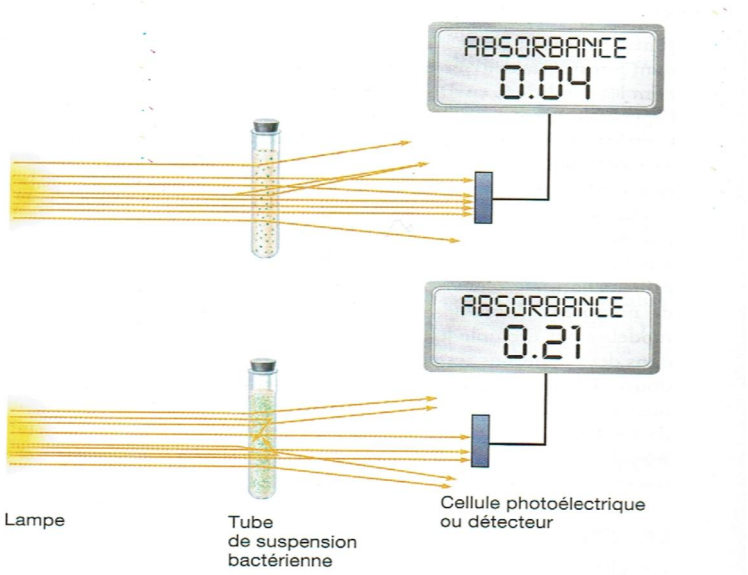


Figure 3 : La turbidité et la mesure de la masse (Prescott, 2018)

2. 4. 2. Mesure du nombre de cellules

a) Lecture au microscope

La méthode est pratiquée couramment pour les microbes de grande taille (plusieurs micromètres) comme les levures. On utilise un hématimètre (cellule de Thomas, cellule de Malassez) **(Figure 4)**.

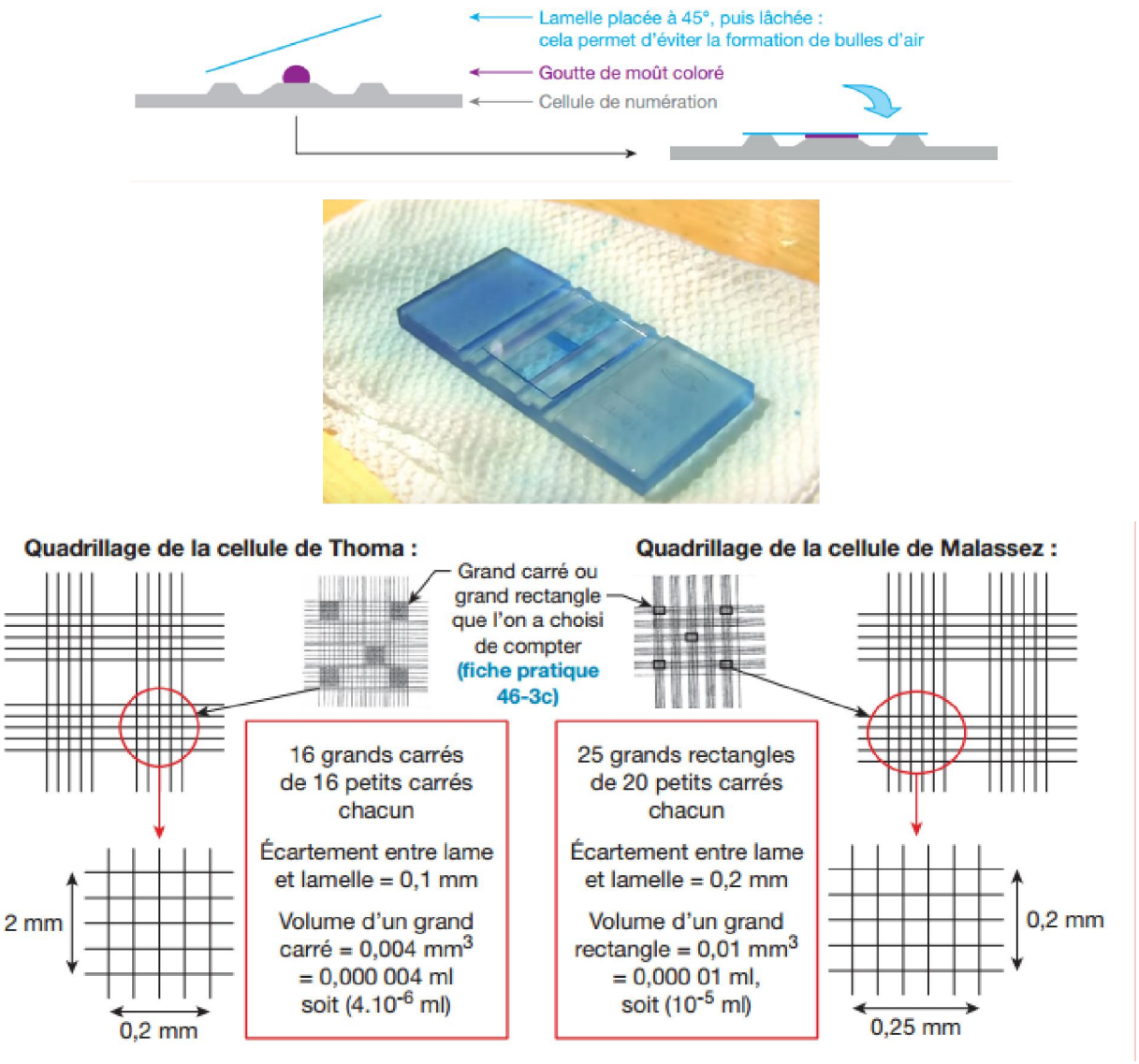


Figure 4 : Principe de comptage direct au moyen d'une chambre de comptage

b) Compteur de particules

Cet appareil réalise automatiquement le dénombrement des particules ou des cellules en suspension dans une solution d'électrolytes (solution saline) (Meyer, 2004).

c) Epifluorescence (comptage des cellules vivantes)

Les bactéries sont colorées par un fluorochrome comme l'orangé d'acridine, puis examinées en lumière ultraviolette. On peut théoriquement compter sélectivement les bactéries vivantes qui sont fluorescentes dans le vert (ADN double brin apparié) et les bactéries mortes dont la fluorescence rouge résulte de la combinaison du fluorochrome avec l'ADN dénaturé.

d) Dénombrement après culture

Le dénombrement des microbes viables est une méthode communément utilisée. Plusieurs méthodes peuvent être proposées la plus habituelle :

- La culture en boite de Pétri : après la préparation de la suspension mère de l'échantillon à analyser, une série de dilutions de 10 en 10 est préparée dans de l'eau physiologique **(Figure 5)**.

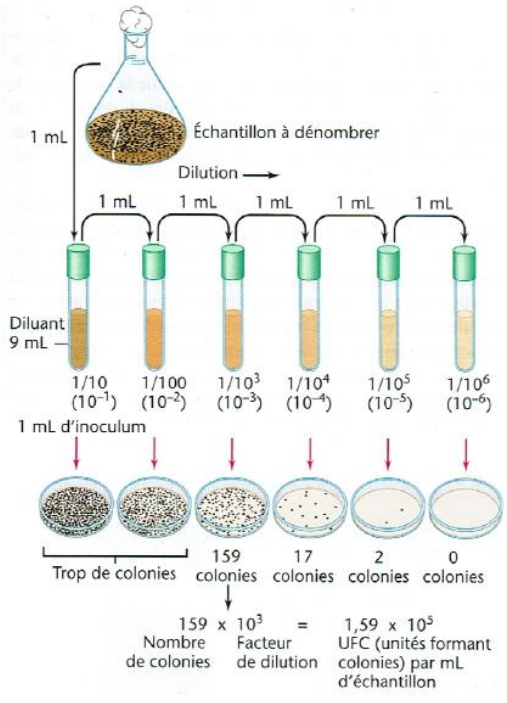


Figure 5 : La méthode de préparation des séries de dilutions de l'échantillon (Madigan et Martinko, 2007).

Un volume fixe de la suspension brute ou des dilutions est étalé à la surface d'un milieu gélosé ou incorporé au milieu avant sa solidification **(Figure 6)**.

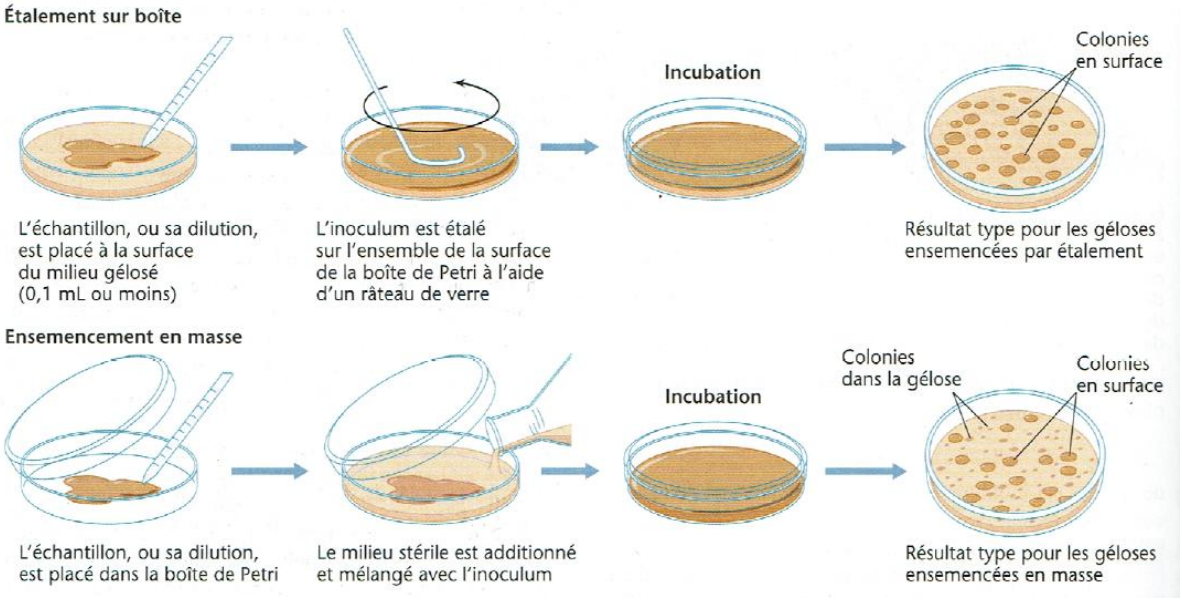


Figure 6 : Dénombrement des cellules viables (Madigan et Martinko, 2007).

Après incubation à une température convenable, le nombre de colonies apparues correspond au nombre de cellules microbiennes présentes dans le volume analysé de la suspension. La technique doit être exécutée et l'analyse faite en triple exemplaire. Le nombre de colonies retenues après lecture des boites devra être compris entre 30 et 300. Il faut remarquer que les chainettes, les amas et les agglomérats microbiens ne donnent qu'une seule colonie. C'est pour quoi on doit exprimer les résultats non pas en nombre de cellules mais en unités formant colonies (UFC) (Madigan et Martinko, 2007).

- La méthode du nombre de plus probables NPP (Bourgeois et Leveau, 1990)

Cette méthode repose sur une dilution en série de l'échantillon et sur son ensemencement dans une batterie de trois, quatre ou cinq tubes. Les résultats de la croissance reçoivent une interprétation statistique à partir d'une table qui s'appelle la table de Mc Crady. Ces tables donnent le nombre le plus probable de bactéries pour chaque combinaison de résultats obtenus avec des séries de tubes.

La description suivante s'applique à la méthode à trois tubes par dilution. Après avoir homogénéisé la suspension mère on en réalise plusieurs dilutions décimales successives. Puis à partir de la suspension mère et de chacune de ses dilutions on inocule trois tubes de milieu à raison d'un millilitre par tube. Après incubation on compte les tubes positifs (apparition d'un trouble, virage de colorant, dégagement gazeux) dans les dilutions successives et déterminer le nombre caractéristique de trois chiffres qui, reporté dans la tables correspondante, donnera le

nombre le plus probable de bactéries dans l'échantillon. Le nombre de bactéries présentes peut alors être déterminé à l'aide de la table.

Exemple **(Figure 7)** : dilution 10^{-1} : 3 tubes positifs

dilution 10^{-2} : 2 tubes positifs

dilution 10^{-3} : 1 tube positif

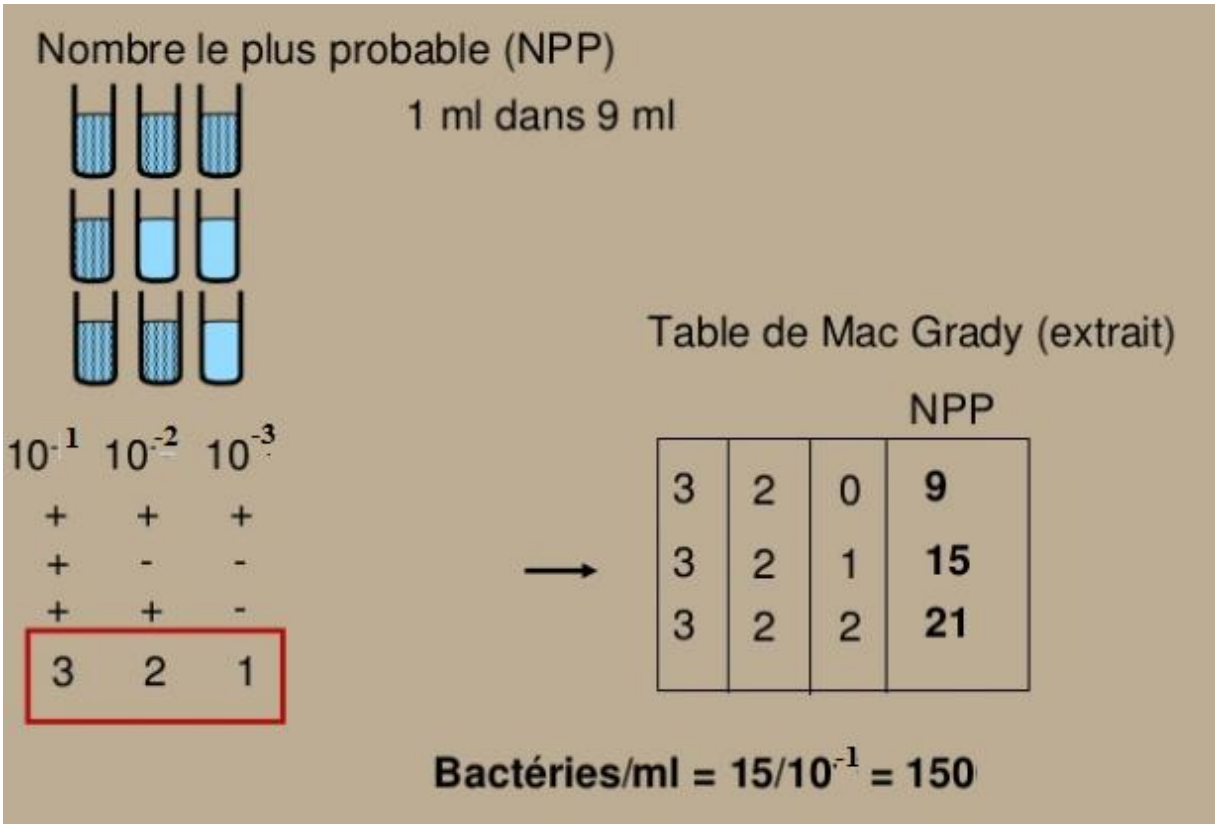


Figure 7 : Exemple d'application de la méthode NPP

Donc le nombre est 321 correspond à 15 dans le prélèvement correspondant à la plus faible dilution considérée ; il reste alors à calculer la concentration cellulaire dans la suspension initiale en tenant compte des dilutions effectuées.

- La méthode de filtration sur membrane est aussi très classique dans le cas des études spéciales. Elle consiste à filtrer un volume déterminé d'une suspension sur une membrane filtrante en cellulose qui est ensuite déposée sur un milieu convenable **(Figure 8)**. Elle a l'avantage de concentrer les bactéries présentes en faibles quantité dans le milieu.

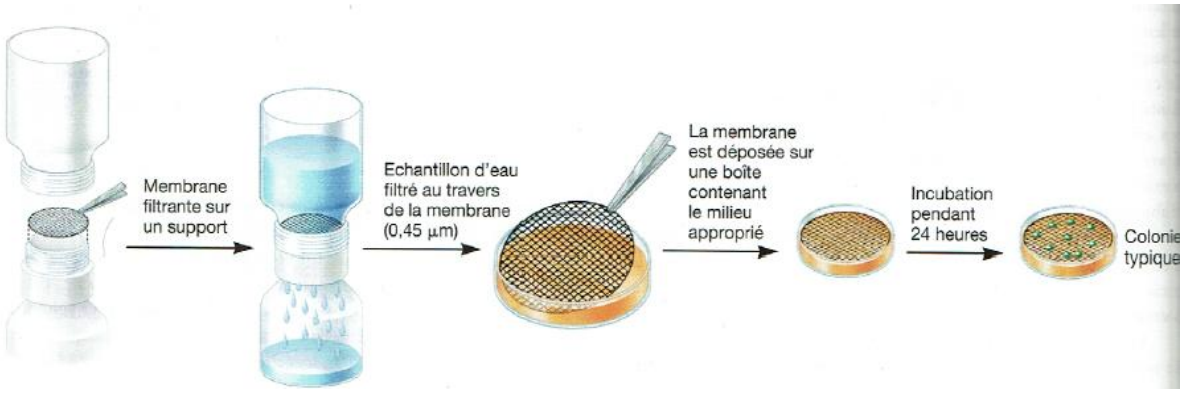


Figure 8 : Le procédé de filtration sur membrane

2. 4. 3. Mesure des constituants cellulaires

Les méthodes actuelles les plus prometteuses sont fondées sur le dosage par bioluminescence de l'ATP (Adénosine 5-triphosphate) (Meyer, 2004).

3. Les facteurs influençant la croissance

Certaines conditions physiques sélectionnent les types de micro-organismes capables de se développer dans un environnement donné.

3. 1. Concentration de substrat, au cours de la phase exponentielle, le taux de croissance est indépendant de la concentration des divers composés du milieu de culture, lorsqu'ils sont en excès. Quand on fournit les composés en quantités faibles et variables d'un essai à l'autre (de S1 à S5) (voir courbe LnX=f(t) pour différentes concentrations en glucose **(Figure 9)**. On constate que plus on augmente la concentration en glucose, plus la vitesse de croissance augmente en phase exponentielle pour arriver au niveau S5 à un maximum. On peut représenter ces résultats en traçant la courbe µ= f [glucose]. On voit que µ augmente en fonction de la concentration en glucose qui est ici le facteur limitant, jusqu'à une valeur maximale µmax (Meyer, 2004) .

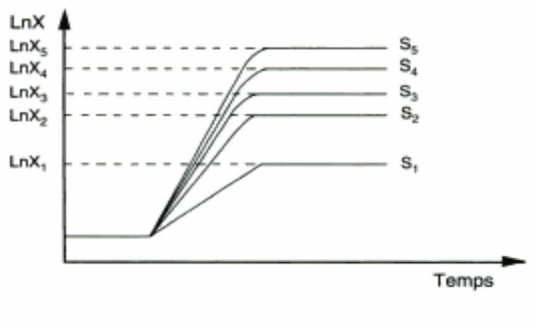


Figure 9 : Courbe LnX = f (t) pour différentes concentrations en glucose (S_1, S_2…) (Meyer, 2004)

La courbe obtenue tend vers une asymptote quelle que soit la nature du facteur limitant.

3. 2. La température : est l'un des paramètres de l'environnement les plus importants, si ce n'est le plus important, vis-à-vis de l'impact sur la croissance et la survie des microorganismes (Madigan et Martinko, 2007).

Les températures cardinales (Figure 10) pour chaque microorganisme il existe une température minimale au-dessous de laquelle il n'y a pas de croissance, une température optimale ou la croissance est la plus rapide, et une température maximale au-dessus de laquelle la croissance n'est plus possible.

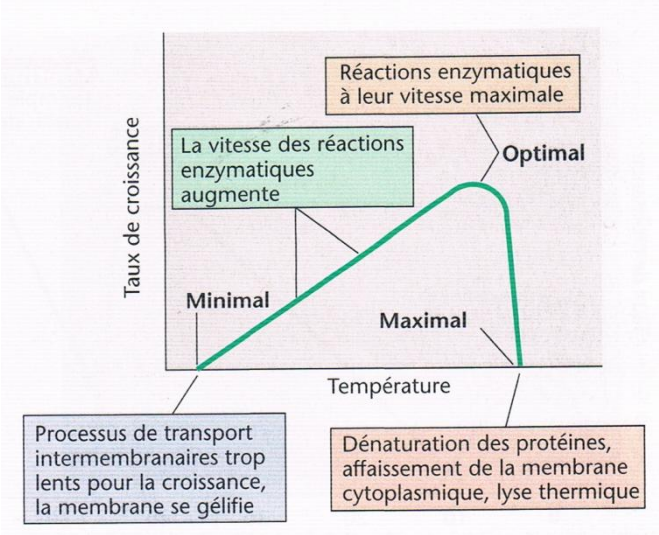


Figure 10 : Effet de la température sur le taux de croissance et conséquences au niveau moléculaire pour la cellule (Madigan et Martinko, 2007).

En fonction de la température optimale de la croissance, on peut distinguer quatre grands groupes de micro-organismes : **les psychrophiles** température optimale basse, **les mésophiles** température optimale moyenne, les **thermophiles,** ont une température optimale élevée et les **hyperthermophiles** température optimale très élevée **(Figure 11)** (Madigan et Martinko, 2007).

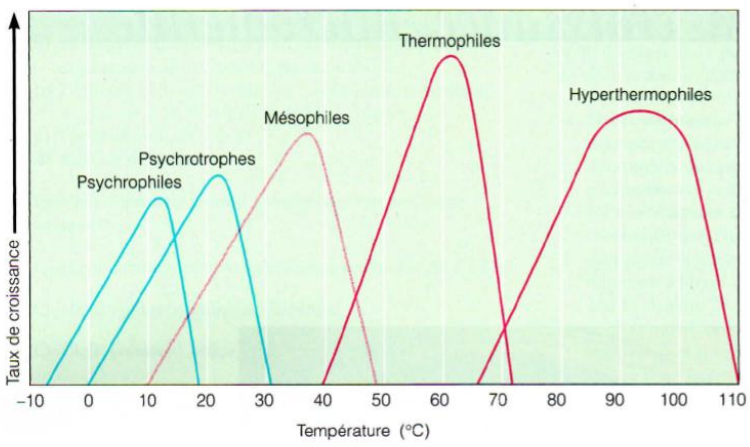


Figure 11 : Réaction vis-à-vis de la température d'organismes psychrophiles, mésophiles, thermophiles et de différents hyperthermophiles (Madigan et Martinko, 2007).

3. 3. Le pH : acidité ou l'alcalinité d'une solution est exprimé par son pH. Des valeurs de pH < à 7 caractérisent les milieux acides et des valeurs supérieurs, les milieux alcalins ou basiques. Chaque micro-organisme présente une gamme de pH ou la croissance est possible et un optimum bien défini. Les organismes dont la croissance est meilleure pour des pH bas sont appelé acidophiles. Les champignons sont souvent plus tolérants que les bactéries. Quelques extrémophiles ont un optimum de pH très élevé, proche de 10, et sont appelés alcaliphiles. Ces organismes colonisent des lacs hyperalcalins sodiques ou des sols riches en carbonate. Pour la majorité des micro-organismes dont le pH optimal est compris entre 6 et 8 sont appelé neutrophiles (Madigan et Martinko, 2007).

3. 4. L'activité de l'eau (l'humidité) : la disponibilité de l'eau présente dans l'atmosphère ou dans une substance intervient dans la croissance bactérienne, s'exprime selon une variable physique qui est l'activité de l'eau, notée *aw*. L'activité de l'eau est inversement proportionnelle à la pression osmotique d'un composé **(tableau 4)**. Ainsi, elle est affectée par la présence plus ou moins importante de sels ou de sucres dissous dans l'eau.

- en présence de sels : les bactéries halophiles nécessitent du sel NaCl pour leur croissance. Cette concentration peut varier de 1- 6% pour les faiblement halophiles jusqu'à 15- 30% pour les bactéries extremes (ex : *Halobacterium*). Les bactéries halotolérantes acceptent des concentrations modérées de sels non obligatoires pour leur croissance (ex : *Staphylococcus aureus*).

- en présence de sucres : les bactéries osmophiles nécessitent des sucres pour leur développement. Celles osmotolérantes acceptent des concentrations modérées de sucres mais

non obligatoires pour leur croissance. Enfin les bactéries xérophiles peuvent se multiplier en l'absence de l'eau dans leur environnement (Madigan et Martinko, 2007).

Tableau 4 : Mesures de l'activité de l'eau (a_w) de certains produits (Madigan et Martinko, 2007).

Activité de l'eau	Produits	Exemples d'organismes
1,00	Eau pure	*Caulobacter, Spirillum*
0,995	Sang humain	*Streptococcus, Escherichia*
0,980	Eau de mer	*Pseudomonas, Vibrio*
0,950	Pain	La plupart des bacilles Gram positif
0,900	Sirop d'érable, jambon	Coques Gram positif tels que *Staphylococcus*
0,850	Salami	*Saccharomyces rouxii* (levure)
0,800	Gâteau aux fruits, confiture	*Saccharomyces bailii* *Penicillium* (champignon)
0,750	Lacs salés, poisson salé	*Halobacterium,* *Halococcus*
0,700	Céréales, sucre, fruits secs	*Xeromyces bisporus* et autres champignos xérophiles

3. 5. L'influence de l'oxygène : un organisme capable de se développer en présence d'oxygène atmosphérique est an aérobie, tandis que celui qui croit en son absence est un aérobie. Ceux qui ont besoin de l'oxygène pour vivre sont les aérobies obligatoires **(Figure 12)**. Les anaérobies facultatifs ne demandent pas d'O_2 pour croitre mais se développent mieux en sa présence. Les anaérobies aérotolérants (*Enterococcusfaecalis*) ignorent simplement l'O2 et se développent aussi bien en sa présence qu'en son absence. Au contraire les anaérobies stricts ou obligatoires (*Bacteroides, Clostridium pasteurianum)* ne tolèrent pas l'oxygène. Les microaérophiles (*Campylobacter*) sont endommagés par le niveau atmosphérique normal d'O_2 (20%) mais requièrent une faible concentration (2 à 10%) pour leur croissance (Madigan et Martinko, 2007).

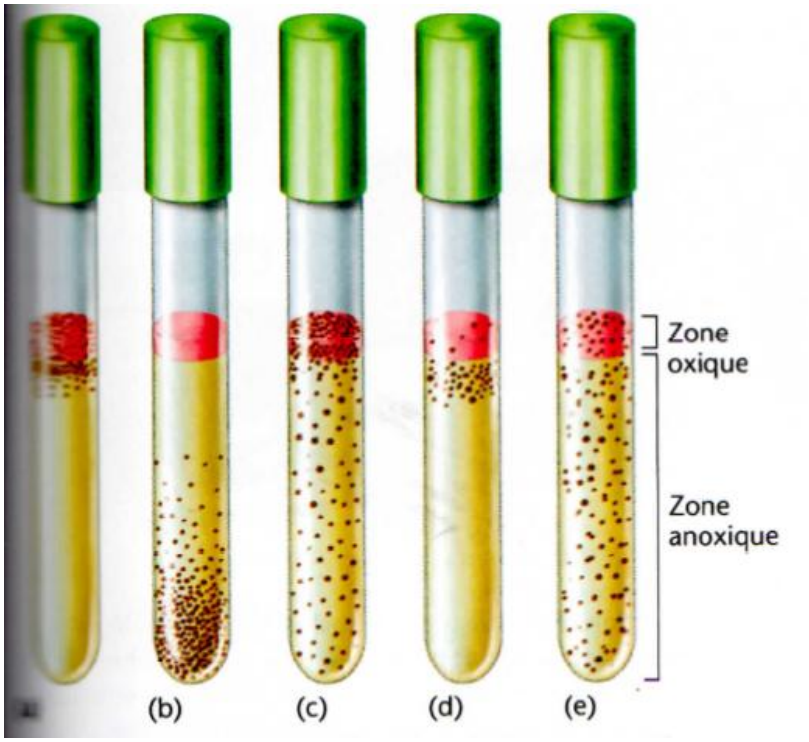


Figure 12 : Croissance en fonction de la concentration en oxygène (Madigan et Martinko, 2007).

3. 6. Les radiations : de nombreuses formes de radiations électromagnétiques sont très dangereuses pour les microorganismes. Les radiations ionisantes (longueurs d'ondes très courtes ou à haute énergie) ex Rayons X ou rayons gamma à faibles doses provoquent des mutations et indirectement la mort les fortes doses sont directement létales. Utilisées pour stériliser quelques bactéries (*Deinococcusradidurans*). La lumière ultraviolette, tue toutes les espèces de microroganismes à cause de sa longueur d'onde courte et de son énergie élevée (Madigan et Martinko, 2007). .

Chapitre V

Contrôle de la croissance des microorganismes

Le contrôle des microorganismes reste un sujet brulant, parce qu'ils évoluent pour résister aux stratégies actuelles. Les efforts de contrôle ont un rôle tant en santé publique pour prévenir la maladie qu'en thérapeutique pour traiter la maladie. En général, tout produit chimique, physique ou biologique qui contrôle des microorganismes est désigné comme un agent antimicrobien (**Figure 1**) (Prescott, 2018).

1. Contrôle antimicrobien par les méthodes physiques

Les méthodes physiques sont employées souvent pour réaliser les décontaminations, les désinfections et les stérilisations microbiennes.

1. 1. Stérilisation par la chaleur

Le traitement thermique est la méthode la plus employée pour contrôler les développements microbiens.

- l'autoclave est un appareil de stérilisation par la chaleur humide. C'est le procédé habituel pour stériliser les milieux de culture par chauffage à 1 bar de pression de vapeur, ce qui correspond à une température de 121°C. Il permet la destruction des endospores thermorésistantes qui exige un chauffage à des températures au-dessus de 100°C par l'utilisation de la vapeur sous pression (Madigan et Martinko, 2007).

- La pasteurisation est un traitement thermique qui a pour objectif de réduire les populations microbiennes (charge microbienne) dans le lait ou dans d'autres liquides thermosensibles. Le processus a été découvert par ***Louis Pasteur***. Elle ne détruit pas tout les microorganismes, elle retarde également la croissance des microorganismes d'altération, augmentant considérablement la durée de conservation des liquides périssables (Madigan et Martinko, 2007).

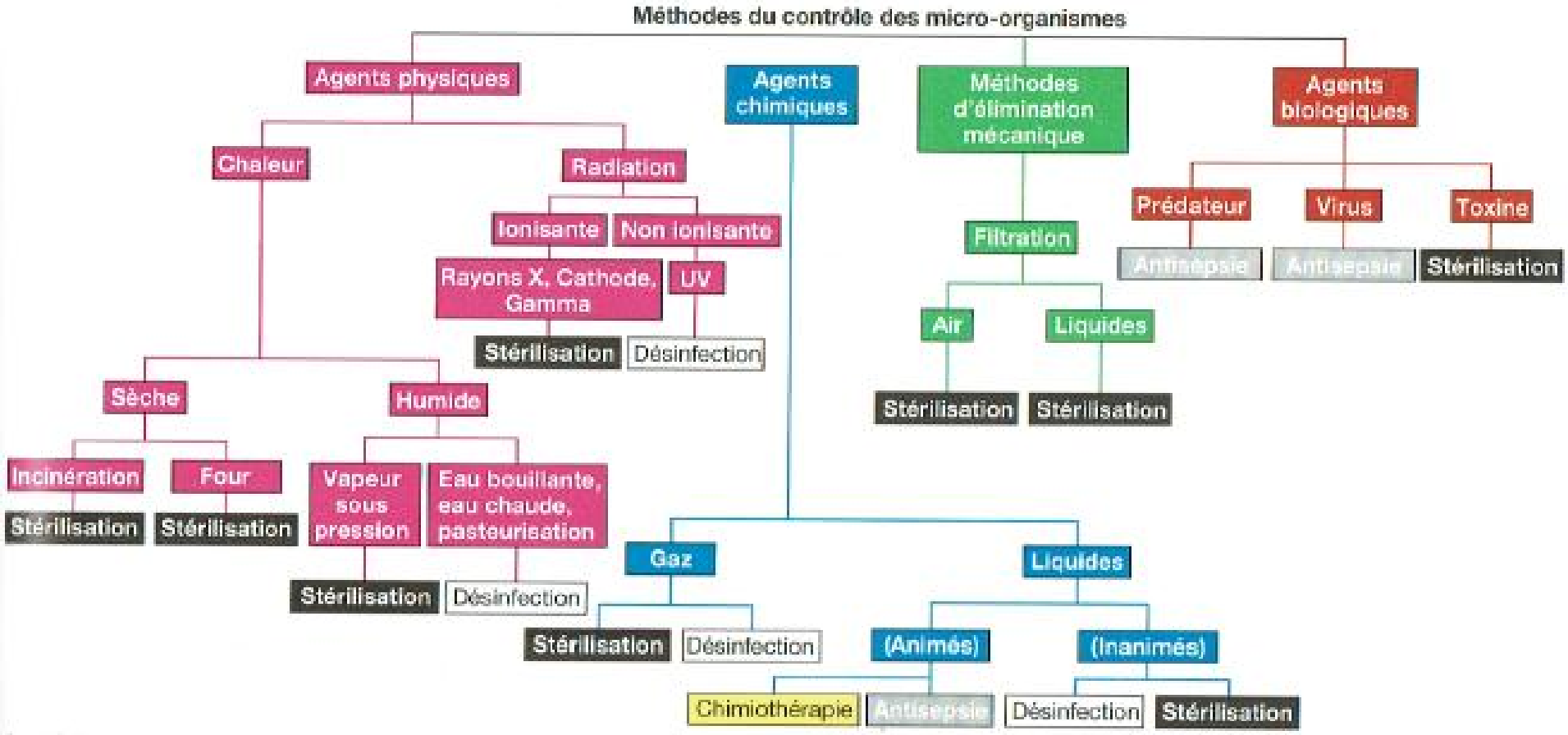


Figure 1 : Les méthodes de contrôle microbiologique (Prescott, 2018)

1. 2. Stérilisation par rayonnement (**Figure 2**)

En utilisant les microondes, les infrarouges, les ultraviolets (UV), les rayons X et les rayons γ (Madigan et Martinko, 2007).



Figure 2 : Poste de sécurité biologique (Le poste est présenté avec une source de radiations ultraviolettes UV (lampe à vapeur de mercure) utilisée pour décontaminer les surfaces internes (Madigan et Martinko, 2007).

1. 3. Filtration stérilisante

On a vu que la chaleur est une manière très efficace pour la stérilisation de la plupart des liquides. Cependant**,** les liquides sensibles à la chaleur peuvent être stérilisés par filtration. Un filtre est un dispositif avec des pores trop étroits pour le passage des microorganismes, mais assez larges pour permettre le passage du liquide ou du gaz (**Figure 3**).

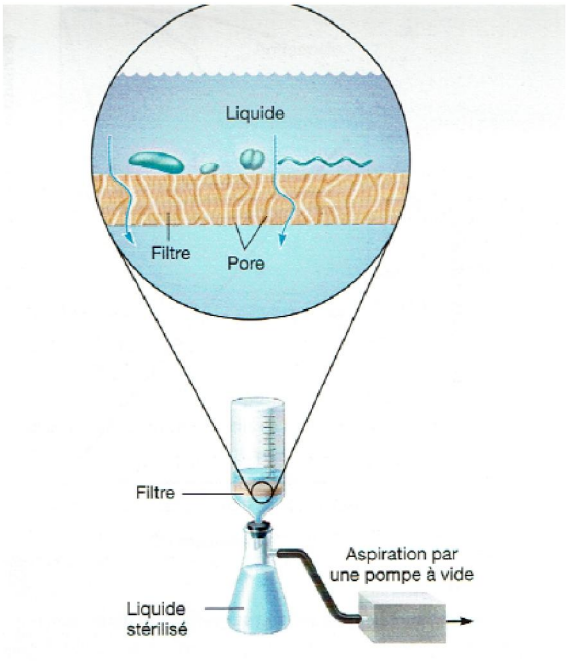


Figure 3 : Stérilisation par une membrane filtrante (Madigan et Martinko, 2007).

2. Contrôle antimicrobien par les méthodes chimiques

2. 1. Les différents agents antimicrobiens chimiques

A la maison, sur le lieu de travail et au laboratoire, des agents chimiques sont employés en routine pour empêcher les développements microbiens. Un agent antimicrobien est un produit chimique naturel ou synthétique qui tue ou inhibe la croissance des microorganismes.

Quand un agent antimicrobien est ajouté à une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance, on peut observer trois effets :

- Les agents bactériostatiques : ils sont fréquemment des inhibiteurs de la synthèse des protéines et agissent en se liant aux ribosomes. Si la concentration de l'agent est réduite, il est libéré du ribosome et la croissance reprend (**Figure 4**) (Madigan et Martinko, 2007).

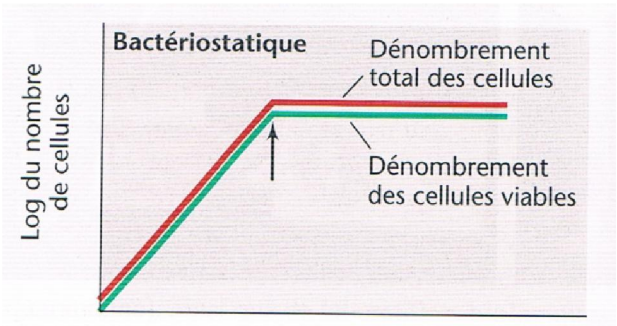


Figure 4 : Effet de l'agent bactériostatique sur la croissance cellulaire (Madigan et Martinko, 2007)

- Les agents bactéricides : ils se lient étroitement à leurs cibles cellulaires et ne sont pas enlevés par dilution, mais la lyse, la perte d'intégrité des cellules et le dégagement du contenu ne se produisent pas (**Figure 5**).

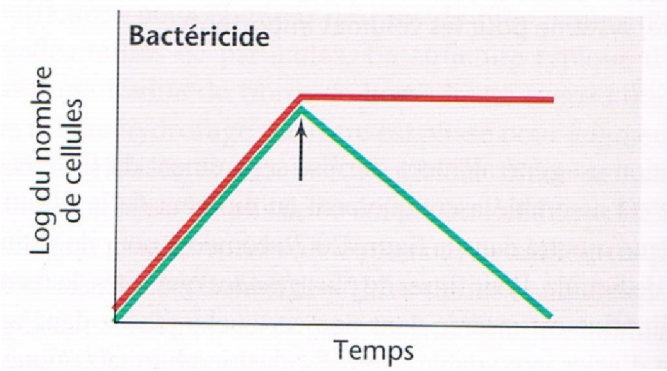


Figure 5 : Effet de l'agent bactéricide sur la croissance cellulaire (Madigan et Martinko, 2007)

- Les agents bactériolytiques : ils induisent la mort par lyse des cellules, qui peut être observée par la diminution du nombre de cellules cultivables ou de la turbidité après que l'agent a été ajouté (**Figure 6**).

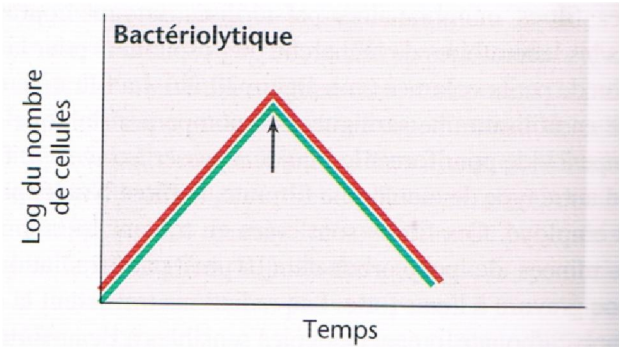


Figure 6 : Effet de l'agent bactériolytique sur la croissance cellulaire (Madigan et Martinko, 2007)

2. 2. Etude de l'effet des agents antimicrobiens sur la croissance

- La concentration minimale inhibitrice : l'activité antimicrobienne est mesurée en déterminant la concentration de composés antimicrobiens requise pour empêcher la croissance d'un microorganisme étudié, une valeur appelée la concentration minimale inhibitrice (CMI). C'est la concentration la plus basse du composé antimicrobien qui empêche complètement la croissance du microorganisme étudié. Ce procédé simple et efficace est souvent appelé technique de dilution (**Figure 7)** (Madigan et Martinko, 2007).

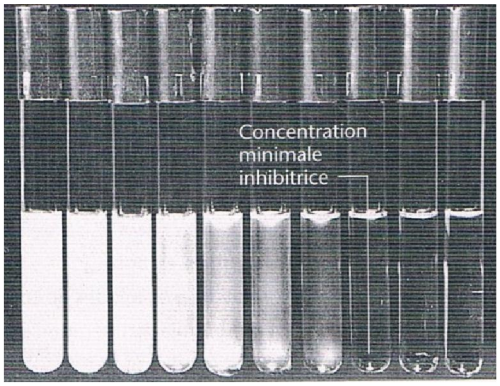


Figure 7 : Détermination de la sensibilité aux antibiotiques par la méthode des dilutions (Madigan et Martinko, 2007)

- La diffusion en milieu gélosé : c'est une méthode d'analyse courante pour la détermination de l'activité antimicrobienne. Cette méthode est habituellement employée pour déterminer l'efficacité des antibiotiques sur les bactéries pathogènes (**Figure 8**) (Madigan et Martinko, 2007).

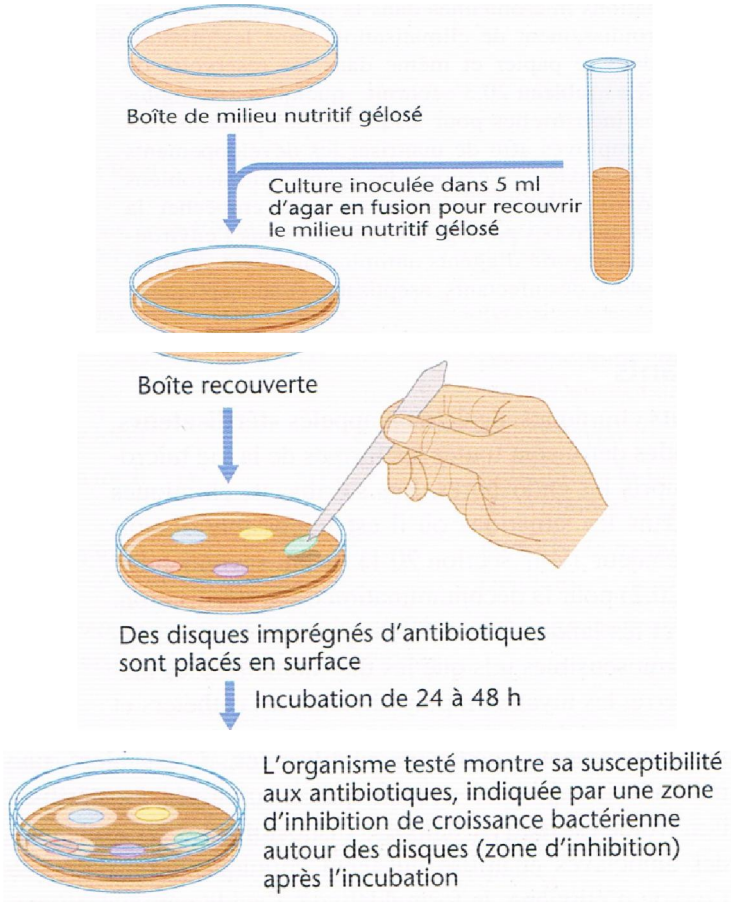


Figure 8 : Mesure de l'activité des antibiotiques par la méthode de diffusion en milieu gélosé (Madigan et Martinko, 2007)

2. 3. Agents antimicrobiens chimiques utilisés *in vivo*

Un certain nombre d'agents antimicrobiens, synthétiques et naturels, sont employés pour traiter des infections microbiennes *in vivo.* Ces composés ont révolutionné le traitement des maladies infectieuses.

2. 3. 1. Molécules antimicrobiennes de synthèse

- Les analogues des facteurs de croissance : sont des composés synthétiques structurellement semblables à un facteur de croissance, mais de subtiles différences structurales entre les deux, empêchent les facteurs de croissance de fonctionner dans la cellule.

- Les analogues d'acide nucléique : les analogues des bases d'acide nucléique ont été obtenus par l'addition d'un fluor ou d'un atome de brome. Le fluor est un atome relativement petit qui ne change pas la forme globale des bases, mais les propriétés chimiques du composé.

- Les quinolones : forment une classe distincte de composés antibactériens synthétiques qui interagissent avec l'ADN gyrase bactérienne empêchant l'enroulement de l'ADN dans la cellule bactérienne (exemple : ciproflaxine) (Madigan et Martinko, 2007).

2. 3. 2. Molécules antimicrobiennes naturelles : les antibiotiques

Les antibiotiques sont des composés antimicrobiens et sont plutôt des substances naturelles que synthétiques. Ils sont produits par un large éventail de microorganismes fongiques et bactériens et inhibent ou tuent d'autres microorganismes. Un grand nombre d'antibiotiques a été identifié en milieu naturel, mais moins de 1% sont médicalement utiles. Beaucoup d'antibiotiques naturels ont été structurellement modifiés en laboratoire pour augmenter leur efficacité formant la classe des antibiotiques semi-synthétiques tels que :

- Antibiotiques à cycle β-lactame : pénicilline et céphalosporine

La pénicilline, molécule antibactérienne découverte en 1929 par le scientifique anglais ***Fleming***, est produite par la moisissure de *Penicillium chrysogenum*.

Les céphalosporines, un autre groupe d'antibiotiques à cycle β-lactame. La céphalosporine est produite par des champignons *Cephalosporium* sp.

- Antibiotiques produits par les procaryotes

1- les aminoglycosides contiennent des sucres reliés par des liaisons glycosidiques telle que la streptomycine (produite par *Streptomyces griseus),* la gentamycine, …etc.

2- les macrolides tels que l'érythromycine produite par *streptomyces erythreus*.

3-les tétracyclines produites par plusieurs espèces de *Streptomyces*. Elles étaient les premiers antibiotiques à large spectre, inhibant presque toutes les bactéries Gram positives et Gram négatives.

2. 3. 2. 1. Les cibles des agents chimiothérapeutiques

La sensibilité des microorganismes aux différents antibiotiques et autres agents chimiothérapeutiques est très diverses.

Les cibles principales des antibiotiques chez les bactéries sont les ribosomes (traduction), la paroi cellulaire, la membrane cytoplasmique, la réplication de l'ADN et la transcription (**Figure 9**).

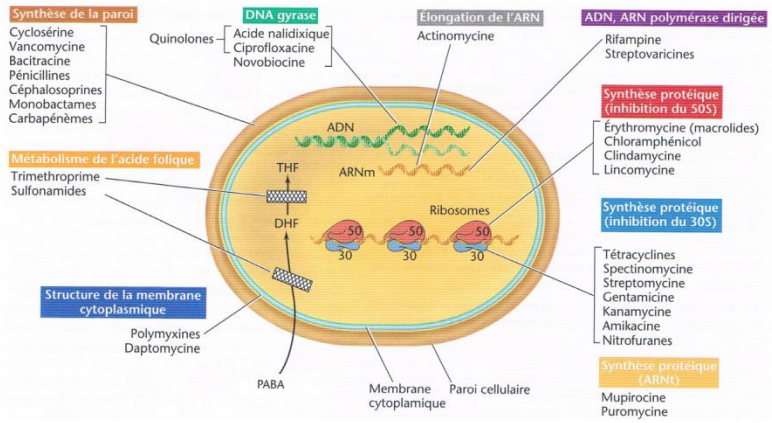


Figure 9 : Mode d'action des agents chimiothérapeutiques antimicrobiens (Madigan et Martinko, 2007)

2. 3. 2. 2. Molécules antivirales

Les agents chimiothérapeutiques antiviraux les plus utilisés sont les analogues de nucléoside. Le premier composé universellement reconnu depuis 1988 dans cette catégorie est la zidovudine ou azidothymidine (AZT) qui inhibe les rétrovirus tels que le VIH.

2. 4. Agents antimicrobiens chimiques à usage externe

2. 4. 1. Première catégorie : elle contient les produits antimicrobiens qui sont employés pour contrôler les microorganismes non pathogènes chez l'homme. Dans l'industrie, ils sont utilisés pour maitriser les contaminations microbiennes dans la nourriture ou dans les tours de refroidissement de climatisation (exemple : chlore).

2. 4. 2. Deuxième catégorie : elle contient des produits prévus pour empêcher la croissance des microbes pathogènes humains dans l'environnement.

- Les stérilisants : appelés également stérilisateur (exemple : oxyde d'éthylène) ou les sporicides détruisent toutes les formes de vie microbienne, y compris les endospores. Ils sont utilisés dans les situations où il est impossible d'avoir recours à la chaleur ou au rayonnement.

- Les désinfectants utilisés sur les objets, ils détruisent les microorganismes mais pas obligatoirement les spores bactériennes (exemple : éthanol).

- Les aseptisants sont des agents qui réduisent, mais peuvent ne pas éliminer, les populations microbiennes à des niveaux considérés comme sûrs. Il existe des aseptisants de contact alimentaire largement utilisés dans l'industrie alimentaire pour traiter les surfaces rencontrées dans les équipements de cuisine. Les aseptisants de contact non alimentaire utilisés pour traiter des surfaces tels que les comptoirs.

- Les antiseptiques et les germicides qui empêchent la croissance des microorganismes et sont suffisamment peu toxiques pour être appliqués sur des tissus vivants. La plupart de ces composés sont utilisés pour le lavage des mains ou pour traiter les blessures externes (exemple : peroxyde d'hydrogène).

Chapitre VI

Introduction à la mycologie

Les champignons ou *Fungi* (du latin *fungus,* champignon), parfois appelés mycètes ou *Mycota* (du grec *mykes*, champignon). Le terme champignon désigne les organismes eucaryotes, porteurs de spores, dépourvus de chlorophylle, dont la nutrition se fait par absorption et se reproduisent de façon sexuée et asexuée. Les scientifiques, qui étudient les champignons, sont des mycologues et la discipline scientifique concernée est la mycologie (Prescott, 2018).

Les champignons sont saprophytes, car ils se nourrissent de matières organiques mortes en sécrétant des enzymes hydrolytiques dans le milieu. Cela leur permet d'absorber les produits solubilisés. Ils sont des agents importants de décomposition.

Les champignons, en particulier les levures, sont indispensables à de nombreux procédés industriels impliquant une fermentation comme la fabrication du pain, du vin et de la bière (Prescott, 2018). Les mycètes jouent aussi un rôle important dans la préparation de certains fromages, de la sauce au soja ; dans la production commerciale de beaucoup d'acides organiques (acide citrique, acide gallique) et de certains médicaments (cortisone) et dans la fabrication de nombre d'antibiotiques.

En outre, les mycètes sont des outils de recherche importants dans l'étude des processus biologiques fondamentaux.

1. La structure des mycètes

Le corps végétatif d'un mycète est appelé thalle. Il varie en complexité et en taille depuis la cellule microscopique unique des levures jusqu'aux moisissures multicellulaires et aux champignons macroscopiques. Chez la plupart des mycètes, la cellule est emprisonnée dans une paroi de chitine. La chitine est un polysaccharide résistant mais flexible, il contient de l'azote et est constitué de résidus de N-acétylglucosamine. On distingue trois groupes majeurs de champignons :

1. 1. Une levure : c'est un mycète unicellulaire possédant un seul noyau **(Figure 1)** et se reproduisant soit de façon asexuée par bourgeonnement et division transversale soit de façon sexuée par formation de spores.

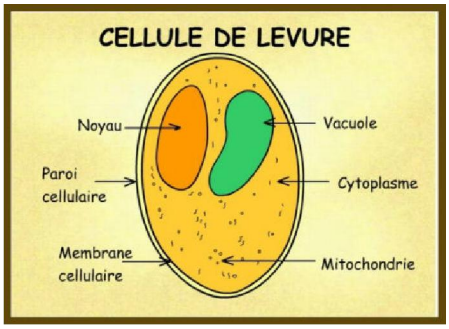


Figure 1 : La cellule de levure

Généralement les cellules de levures sont plus grandes que des bactéries, leur taille varie considérablement, elles sont généralement sphériques ou de forme ovoïde.

1. 2. Une moisissure : elle consiste en un filament longs, fins et ramifiés à structure cellulaire, appelés **hyphes** (du grec *hyphe* : tissu) qui forment un mycélium, c'est-à-dire une masse emmêlée ou un ensemble tissulaire. Chez certains mycètes, le protoplasme (cytoplasme + noyau) coule à travers l'hyphe sans être interrompu par des cloisons transversales. De tels hyphes sont dits siphons ou cœnocytes. Les hyphes des autres mycètes ont des cloisons transversales appelés septums, percés soit d'un pore unique soit de pores multiples ; ceux-ci permettent le passage du cytoplasme. De tels hyphes sont appelés septés (**Figure 2)**.

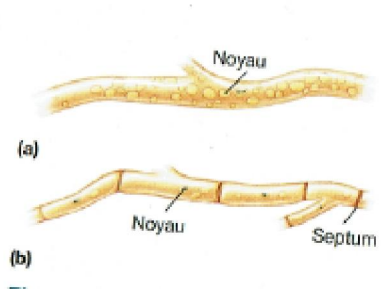


Figure 2 : Les hyphes. Dessins (a) d'hyphes coenocytiques (non septés) et (b) d'hyphes divisés en cellules par des septums

1. 3. Champignons macroscopiques : ce sont des basidiomycètes filamenteux qui présentent de grands carpophores (**Figure 3)**, parfois comestibles.

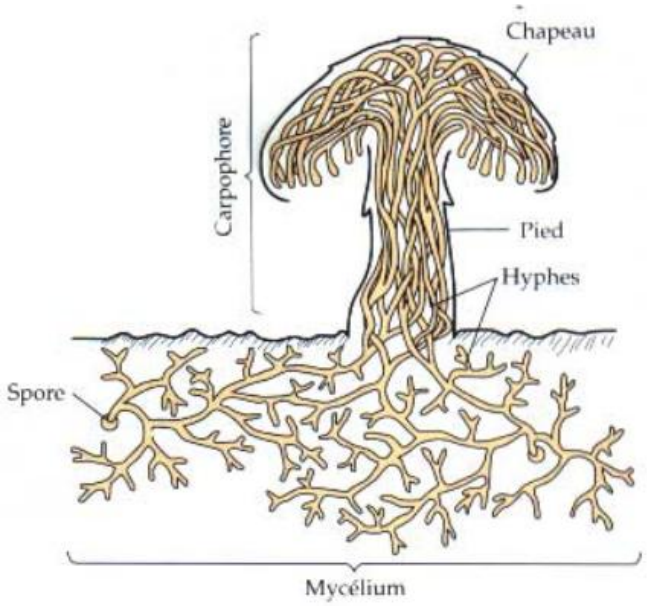


Figure 3 : Un carpophore

2. La reproduction chez les mycètes

Elle est asexuée ou sexuée.

2. 1. La reproduction asexuée : elle intervient quand les conditions deviennent défavorables. Elle se réalise de différentes façons (Prescott, 2018) (**Figure 4**) :

1. une cellule parentale se divise en deux cellules filles par constriction centrale et formation d'une nouvelle paroi cellulaire (**Figure 4a**).

2. Les cellules végétatives somatiques bourgeonnent pour produire de nouveaux organismes. Ceci est très fréquent chez les levures.

3. Le mode le plus commun de reproduction asexuée, est la production de spores. Il existe plusieurs types de **spores asexuées** :

a) Un hyphe se fragmente (par clivage de la paroi cellulaire ou du septum) pour former des cellules qui se comportent comme des spores. Elles sont appelées arthroconidies ou arthrospores (**Figure 4b**).

b) Si les cellules sont enveloppées d'une paroi épaisse avant séparation, elles sont appelées chlamydospores (**Figure 4c**).

c) Si les spores se forment dans un sac à l'extrémité de l'hyphe (sporange), elles sont appelées sporangiospores (**Figure 4d**).

d) Si les spores ne sont pas enfermées dans un sac mais sont produites sur les extrémités ou les côtés de l'hyphe, elles sont dénommées conidiospores (**Figure 4e**).

e) Les spores produites par bourgeonnement d'une cellule mère végétative sont appelées blastospores (**Figure 4f**).

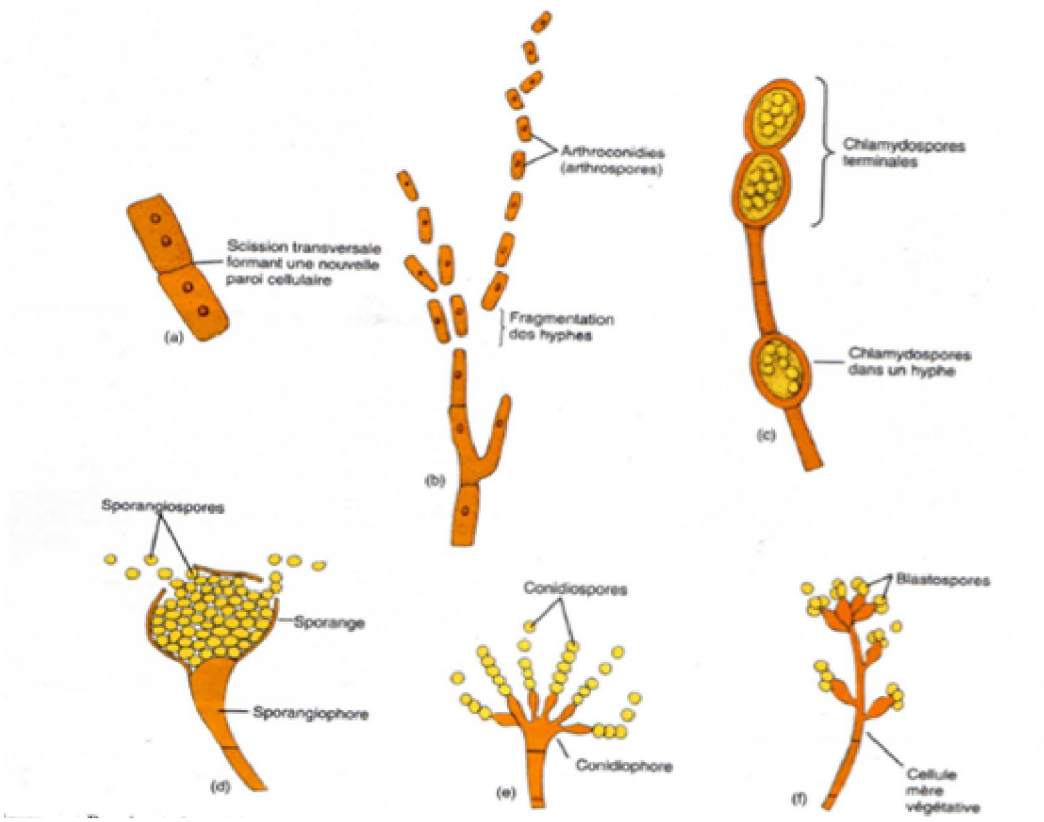


Figure 4 : La reproduction asexuée chez les mycètes et quelques spores (Prescott, 2018)

2. 2. La reproduction sexuée : chez les mycètes, elle résulte de la fusion d'un élément mâle et d'un élément femelle qui donne naissance à un zygote. Par divisions successives, il produit une série de spores unicellulaires appelées spores ou zygospores (on parle de Zygomycètes).
La taille, la forme, la couleur et le nombre de spores sont utiles à l'identification des espèces de mycètes.

- Si le développement ultérieur se fait à l'intérieur de l'œuf : celui-ci prend le nom d'asque et les endospores sont appelées ascospores (on parle d'Ascomycètes) (**Fig. V. 5)**.

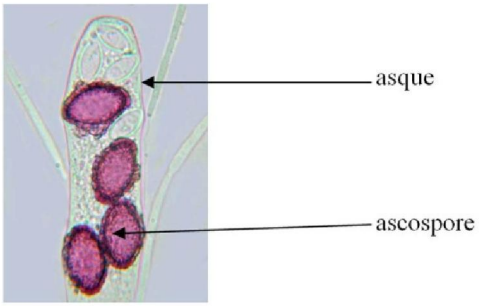


Figure 5 : La reproduction sexuée chez les Ascomycètes

- Si les spores sortent de l'œuf mais y restent attachées par des petits "tubes" (= stérigmates) : l'œuf porte le nom de baside et les spores sont appelées basidiospores (on parle de Basidiomycètes) (**Figure 6)**.

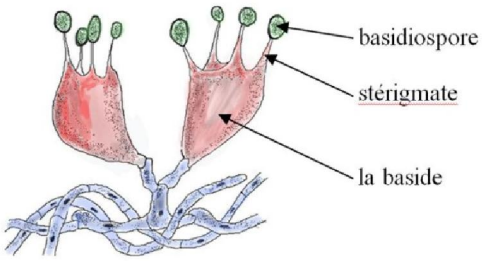


Figure 6 : La reproduction sexuée chez les Basidiomycètes

2. 3. Les cycles de reproduction

2. 3. 1. Chez la levure (Figure 7)

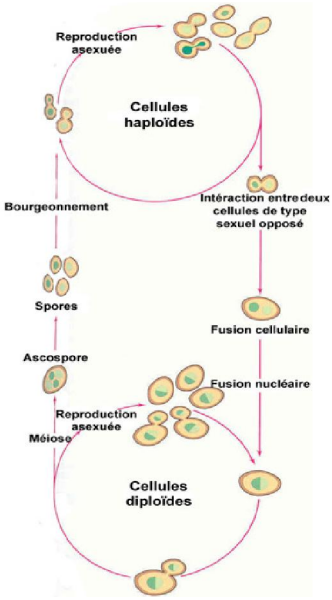


Figure 7 : Les cycles de reproduction chez les levures (Prescott, 2018)

2. 3. 2. Chez les moisissures

Exemple : Zygomycète (**Figure 8)**

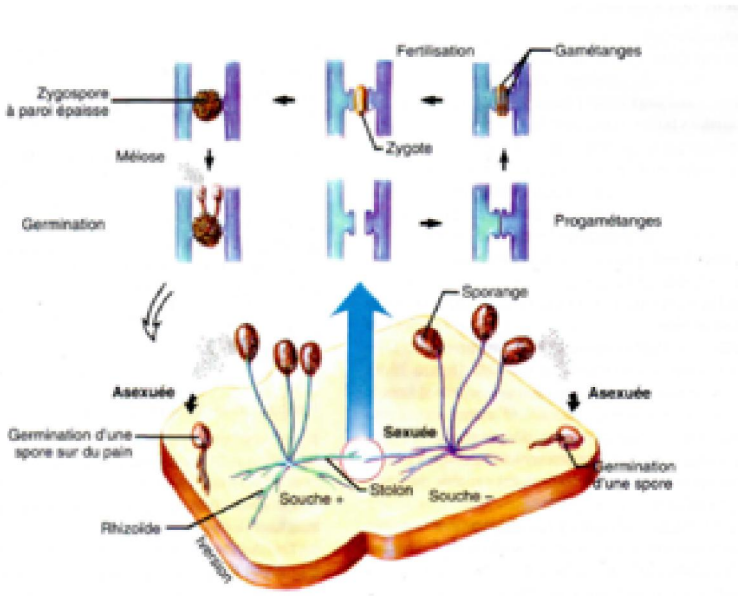


Figure 8 : Les cycles de reproduction chez les moisissures (Prescott, 2018)

2. 3. 3. Chez les champignons macroscopiques

Exemple : Basidiomycètes (**Figure 9**)

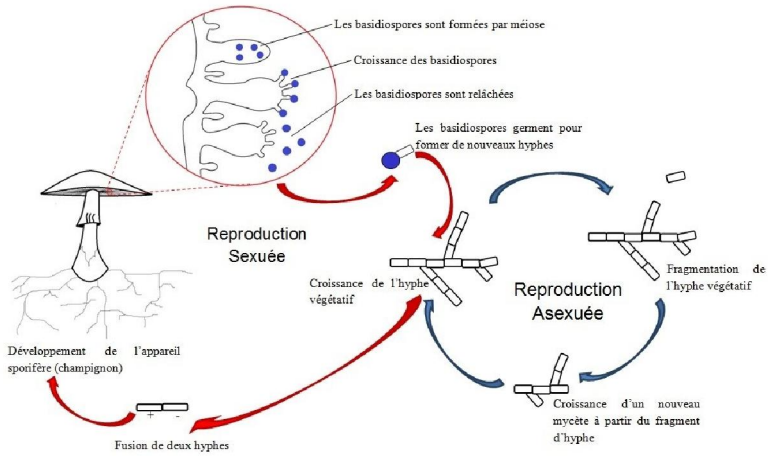


Figure 9 : Les cycles de reproduction chez les champignons supérieurs

3. Les embranchements des mycètes et les caractéristiques

Nous présentons ici les six groupes fongiques importants qui ont des représentants cultivés : les *Chytridiomycota,* les *zygomycota*, les *Glomeromycota*, les *Ascomycota*, les *Basidiomycota* et les *Microsporidia* montrés dans la figure 10 et résumé dans le tableau 1.

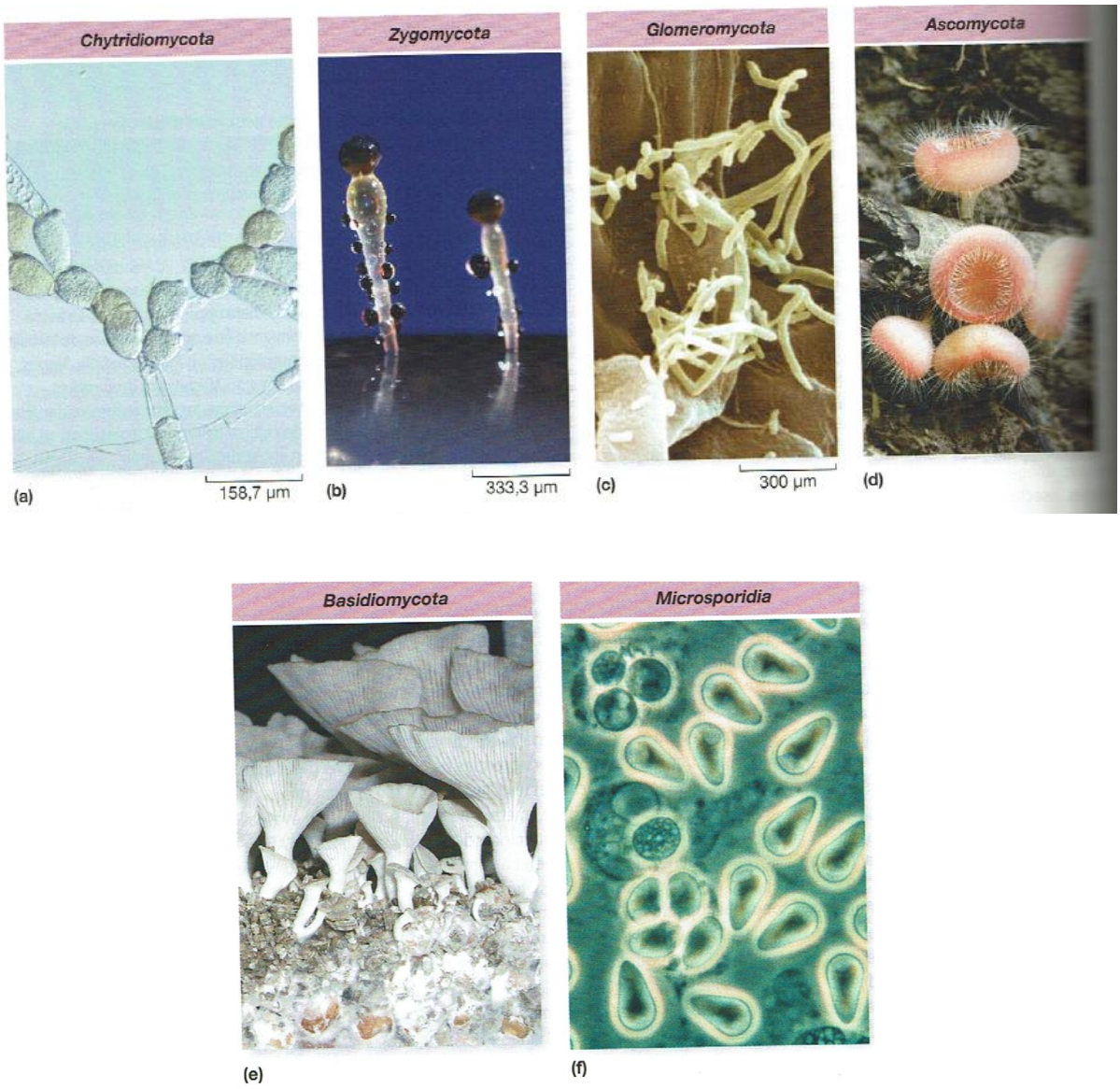


Figure 10 : Des représentants des groupes fongiques

Tableau 1 : Classification abrégée des champignons ou *Fungi*

Sous-classes	Caracéristiques	Exemples
Chytridiomycota	Cellules flagellées, reproduction sexuée, saprophyte ou *Amoebophilus* *Mucor* *Phycomyces* *Rhizopus* *Thamnidium* parasite.	*Allomyces* *Blastocladiella* *Coelomomyces* *Physoderma* *synchytrium*
Zygomycota	Thalles habituellement filamenteux et non septés, reproduction sexuée.	
Ascomycota	Reproduction sexuée et/ou asexuée (formation de conidiospores). Contient des formes saprophytes, parasites. Beaucoup ont des associations mutualistes avec des microorganismes phototrophes pour former des lichens.	*Aspergillus* *Candida* *Neurospora* *Penicillium* *Saccharomyces*
Basidimycota	Reproduction sexuée	*Agaricus* *Boletes* *Dacrymyces* *polyporus*
Gloméromycota	Filamenteux, formant des spores asexuées.	*Acaulospora* *Entrophospora* *Glomus*
Microsporidia	Généralement, parasites intracellulaires obligatoires des animaux.	*Ambylospora* *Encephalitozoon* *Enterocytozoon* *Nosema*
Cryptomycota	Cellules presque sphériques de 3- 5µm, flagellés, osmotrophes.	*Rozella*

Chapitre VII

Introduction à la virologie

La virologie étudie les virus, un groupe particulier d'agents infectieux dont les caractères distinctifs résident dans leur organisation acellulaire simple et leur mode de multiplication (Prescott, 2018). Les virus existent selon deux états : l'un extracellulaire et l'autre intracellulaire. Dans l'état extracellulaire, ils sont inactifs, car ils ne possèdent que peu ou pas d'enzymes et ne peuvent se multiplier indépendamment des cellules vivantes. Dans la phase intracellulaire, les virus se comportent principalement comme des acides nucléiques en réplication, qui forcent les cellules hôtes, à un certain stade du cycle viral, à synthétiser des composants viraux à partir desquels de nouveaux virions s'assemblent pour être finalement libérés (Prescott, 2018). Ce processus est appelé infection. La cellule infectée est appelée l'hôte (Madigan et Martinko, 2007).

1. Propriétés générales des virus

La particule virale, aussi appelée **virion**, est métaboliquement inerte et n'accomplit pas de fonctions. Quand il infecte une cellule, le virus réoriente les fonctions métaboliques de l'hôte pour permettre sa réplication et l'assemblage de nouveaux virions.

1. 1. Les génomes viraux

Les virus ont des génomes, soit à ADN, soit à ARN. Un groupe de virus utilise à la fois l'ADN et l'ARN comme matériel génétique mais à des étapes différentes de leur cycle (**Figure 1**).

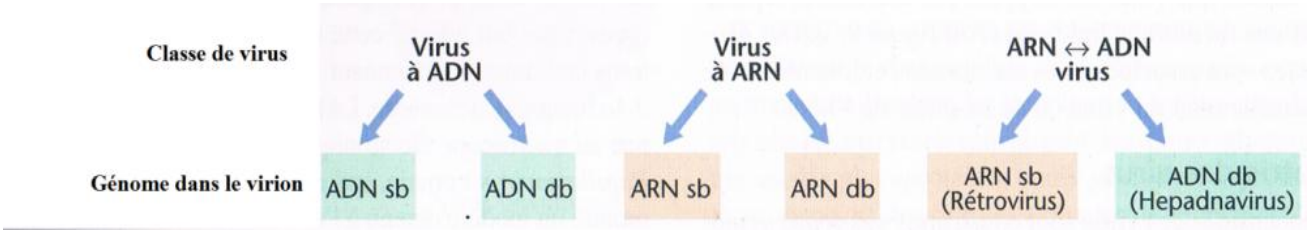


Figure 1 : Les génomes viraux (Madigan et Martinko, 2007)

Les virus peuvent être classés selon la nature de l'acide nucléique présent dans le virion et encore subdivisés selon que l'acide nucléique est simple brin ou double brin, linéaire ou circulaire (Madigan et Martinko, 2007).

1. 2. Les hôtes viraux et taxinomie

En plus de leur classement relatif au génome, les virus sont classés selon l'hôte infecté, et on a :

1. 2. 1. Les virus animaux (Figure 2)

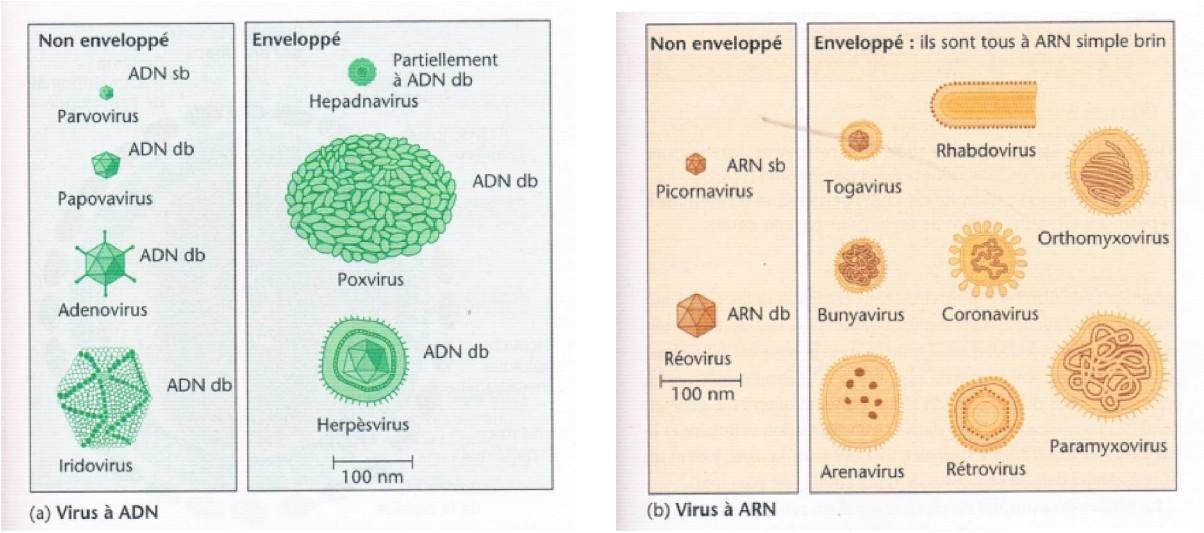


Figure 2 : Les virus animaux (Madigan et Martinko, 2007)

1. 2. 2. Les virus de plantes (tel le virus de la mosaïque de tabac) (Figure 3)

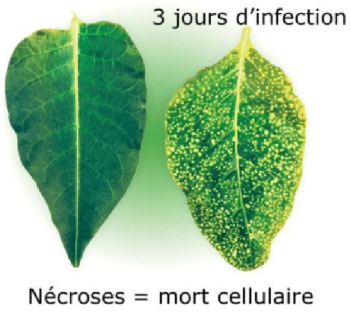


Figure 3 : Les virus de plantes

1. 2. 3. Les virus bactériens

Ils sont appelés également bactériophages (phage de *phagein*= manger) qui ont été étudiés comme système modèle pour la biologie moléculaire et la génétique de la reproduction virale.

Il existe un système formel de classification virale qui groupe les virus en taxa comme les ordres, les familles et parfois genre et espèce (Madigan et Martinko, 2007).

Le taxon famille est particulièrement utilisé. Les membres d'une famille de virus ont tous une morphologie et une structure génomique semblables. Les familles ont un nom qui inclut le suffixe : -*viridae* (exemple. : *Poxviridae*).

2. Les propriétés structurales générales

La taille des virions se situe entre 10 et 400 nm de diamètre. Les plus petits virus sont un peu plus grands que les ribosomes, alors que les mimivirus, les plus grands virus connus, ont des virions plus grands que certaines des plus petites bactéries et sont visibles au microscope optique (Prescott, 2018). Le virus *Smallpox* a une taille d'environ 200nm de diamètre, il est un des plus grands. Le *Poliovirus* est un des plus petits et mesure environ 28nm de diamètre (Madigan et Martinko, 2007).

2. 1. La structure des virions

Les structures des virus sont assez diverses, variant en taille, morphologie et en composition chimique.

L'acide nucléique est toujours à l'intérieur de la particule entouré par une structure protéique appelée capside. La capside est composée de molécules protéiques individuelles appelée sous unités structurales ou capsomères. L'ensemble formé par la capside et l'acide nucléique est appelé nucléocapside.

Certains virus sont nus tandis que d'autres sont dits enveloppés (**Figure 4**) et possèdent une nucléocapside entourée d'une membrane lipidique (exemple : *Influenza virus*). L'enveloppe virale consiste en une bicouche lipidique où sont ancrées des protéines habituellement des glycoprotéines.

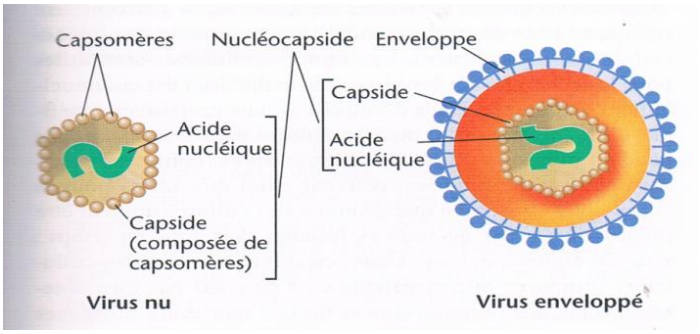


Figure 4 : Les virus avec et sans enveloppe (Madigan et Martinko, 2007)

2. 2. La symétrie des virions

La symétrie est la manière dont les capsomères sont arrangés au niveau de la capsule virale. Deux types de symétries sont reconnus chez les virus qui correspondent aux deux morphologies de base :

- Le cylindre : les virus en forme de cylindre ont une symétrie héliocoïdale (exemple : virus de la mosaïque de tabac VMT) (**Figure 5**).

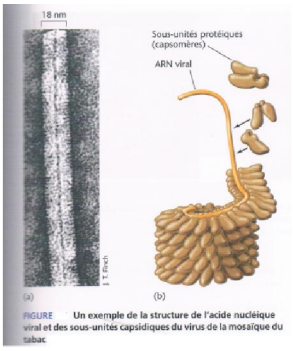


Figure 5 : Les virus de forme cylindrique (Madigan et Martinko, 2007)

- La sphère : ces virus ont une symétrie icosaédrique. Un icosaèdre est une structure symétrique avec 20 faces et apparait sphérique (**Figure 6)**.

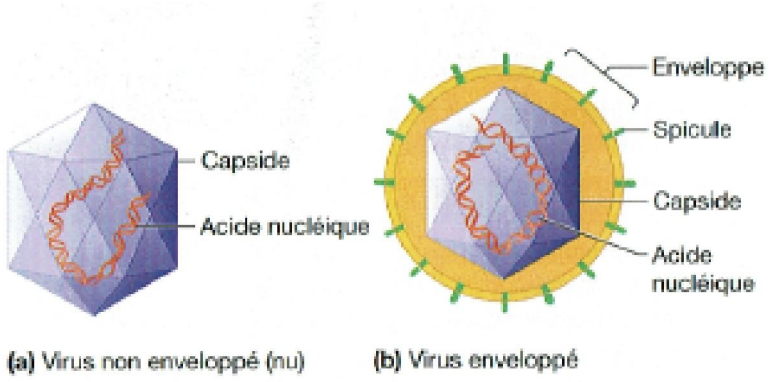


Figure : Les virus de forme sphérique (Prescott, 2018)

- Capsides à symétries complexes : l'asymétrie de la capside n'est pas totalement icosaédrique ou hélicoïdale. Ce sont les virus de bactérie ou bactériophages (**Figure 7)**.

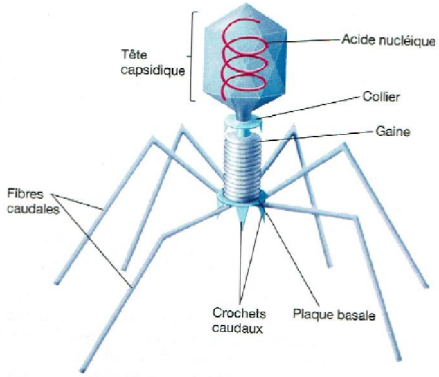


Figure 7 : La forme des virus bactériophages (Prescott, 2018)

3. L'infection virale

Les différentes phases de ce processus peuvent être classées en cinq étapes (**Figure 8)** :

- L'attachement (adsorption) du virion à une cellule hôte sensible ;
- La pénétration (injection) du virion ou de son acide nucléique dans la cellule ;

- La synthèse de l'acide nucléique et des protéines par le métabolisme cellulaire redirigé par le virus ;
- L'assemblage des capsomères et le remplissage des nouveaux virions par l'acide nucléique (l'encapsidation) ;
- La libération des virions matures de la cellule.

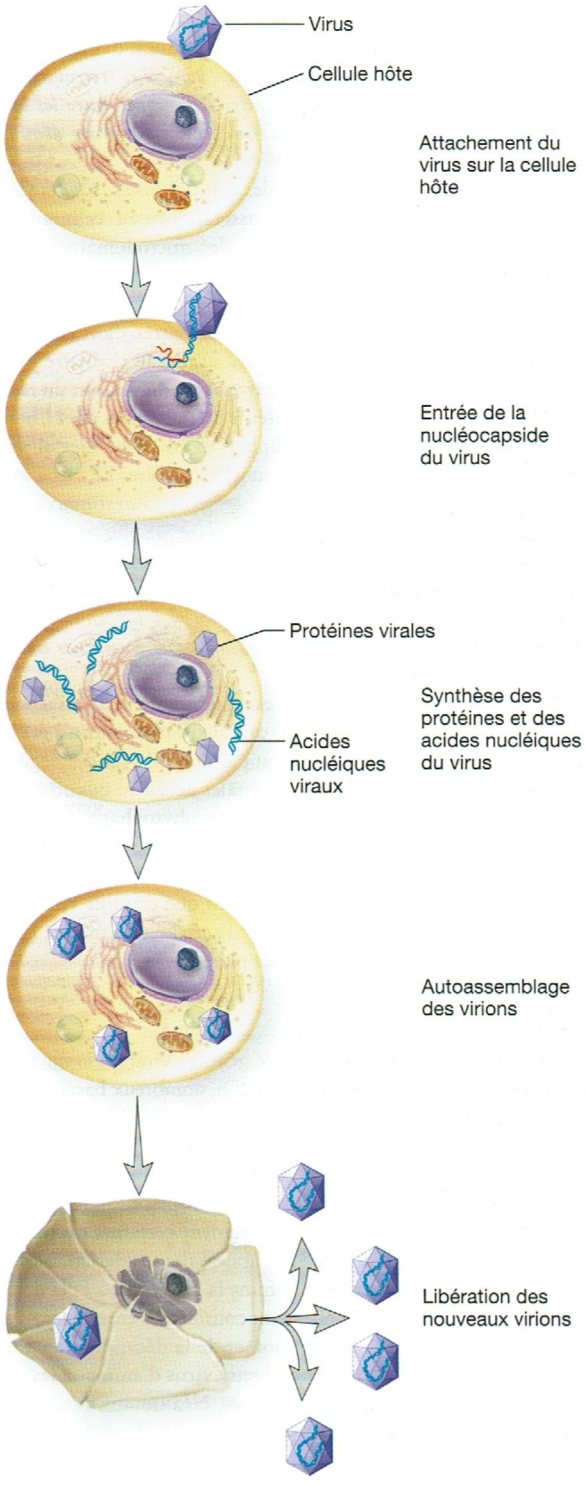


Figure 8 : Les différentes phases de l'infection virale

4. Conséquences de l'infection virale sur les cellules eucaryotes

Les effets possibles des virus animaux sur les cellules infectées sont représentés sur la figure 9. Les virus peuvent endommager les cellules eucaryotes hôtes de multiples manières. Une infection, qui provoque la mort de la cellule, est une infection cytocide. Cela peut se produire par lyse de la cellule (**Figure 9a**).

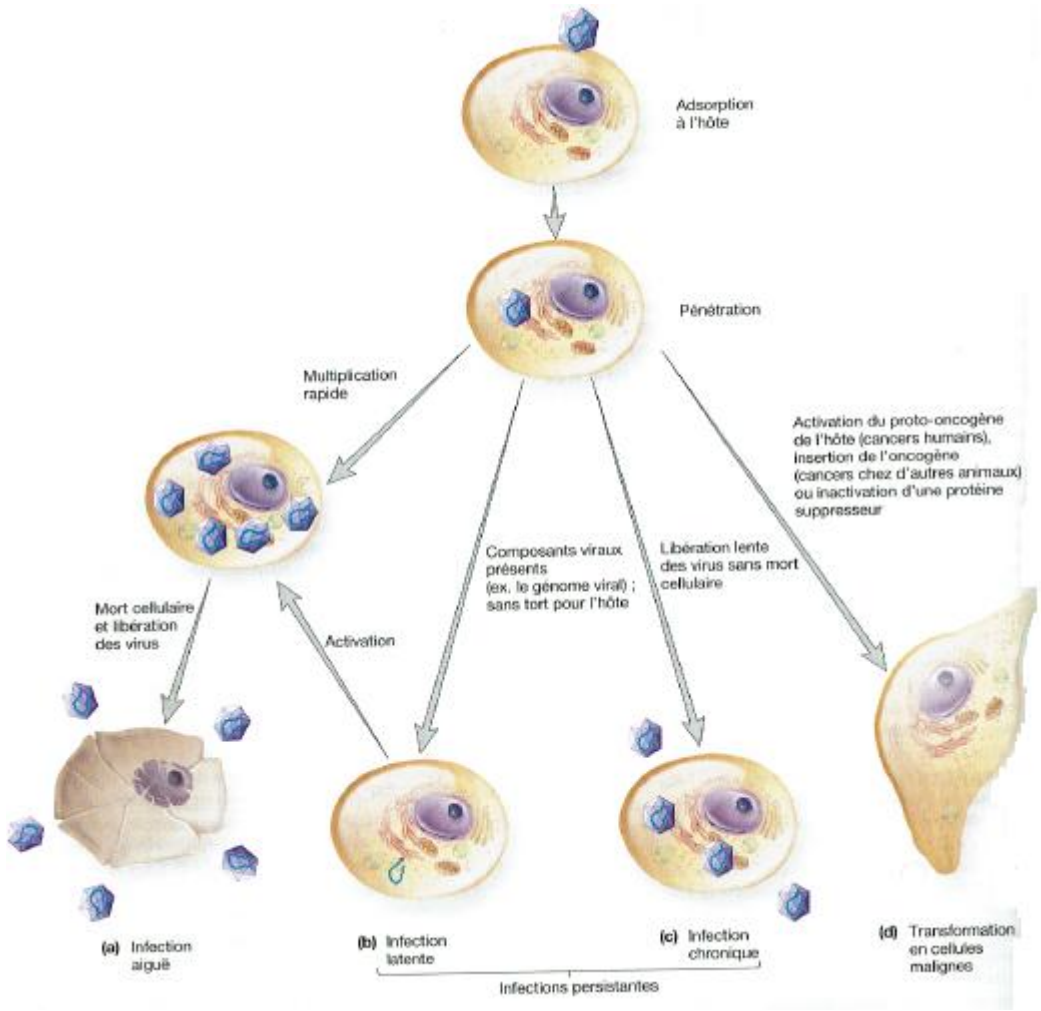


Figure 9 : Les conséquences de l'infection virale sur les cellules animales (Prescott, 2018)

L'infection virale ne conduit pas toujours à la lyse de la cellule hôte. Certains virus (ex. les herpès virus) peuvent établir des infections persistantes qui durent de nombreuses années (**Figure 9b, c**). Les virus d'eucaryotes peuvent provoquer des modifications dégénératives microscopiques et macroscopiques ou des altérations des cellules et des tissus hôtes différentes d'une lyse. On les désigne comme des effets cytopathiques. Un mécanisme à noter en particulier est que certains virus transforment la cellule hôte en une cellule maligne (**Figure 9d**) (Prescott, 2018).