

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université A. Mira de Bejaia

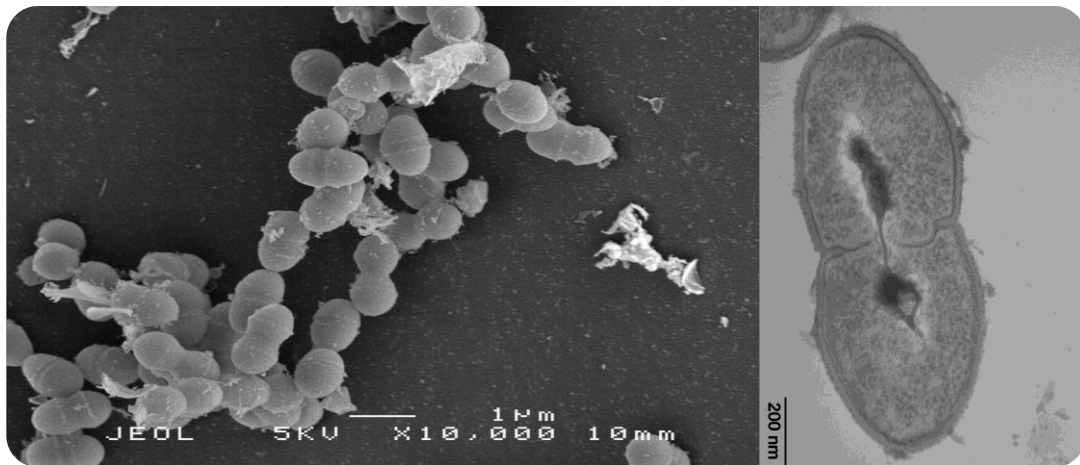
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Tronc Commun des Sciences de la Nature

Cours pédagogique au profit des étudiants de deuxième année SNV

NOTIONS DE BASE DE LA BACTERIOLOGIE GÉNÉRALE

Dr : LADJOUZI Rabia



Préambule

Le moins que l'on puisse dire sur les bactéries est, malgré leur petite taille, qu'elles forment un monde géant et mystérieux, ce qui rend leur étude fascinante. L'homme a d'abord étudié les organismes visibles à l'œil nu, puis la découverte et le développement de la microscopie, a permis la naissance de la microbiologie. La bactériologie est l'une des filières de la microbiologie, elle consiste à étudier les bactéries en long et en large. La connaissance des bactéries et la compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires, a permis une meilleure maîtrise de ces agents dans les thérapies cliniques et une meilleure exploitation dans les différents domaines tels que l'énergie, l'environnement, l'agriculture, l'industrie et la biotechnologie.

Dans ce contexte, ce polycopié de cours intitulé "*notions de base de la bactériologie générale*" a été élaboré. Il constitue un support pédagogique destiné à initier les étudiants de biologie ou de médecine à la microbiologie générale et notamment à la bactériologie de base. La pédagogie empruntée lors de l'élaboration de ce présent cours est basée sur l'utilisation d'un langage simple et basique, soutenu par des exemples. De plus, et afin de rendre le contenu plus accessible au public visé, beaucoup d'illustrations en forme de schémas simplifiés, de photos et de tableaux récapitulatifs ont été utilisés.

Les principaux chapitres développés dans ce cours traitent essentiellement le monde microbien en *grosso-modo*, la structure détaillée de la cellule bactérienne, la classification, la nutrition et la croissance des bactéries, les agents antimicrobiens et enfin un aperçu sur les rôles des bactéries dans l'environnement et leur impact sur l'homme et ses activités.

"Le rôle de l'infiniment petit dans la nature est infiniment grand"

Louis Pasteur

Table des matières

Préambule

Table des matières	1
Liste des figures	7
Liste des tableaux	9
Chapitre I : Le monde microbien	10
I- Introduction :	10
II- Historique	12
III- Place de microorganismes dans le monde vivant	14
IV- Caractéristiques générales de la cellule procaryote	16
Chapitre II : La cellule bactérienne.....	17
I- Techniques d'observation de la cellule bactérienne.....	17
I-1- Le microscope optique	17
I-1-1- Le microscope à fond clair :	17
I-1-2- Le microscope à fond noir	18
I-1-3- Le microscope à contraste de phase.....	18
I-1-4- Le microscope à contraste d'interférence différentielle	19
I-1-5- Le microscope à fluorescence.....	19
I-1-6- Le microscope confocal.....	19
I-2- Le microscope électronique	19
I-2-1- Le microscope électronique à transmission	20
I-2-2- Le microscope électronique à balayage	20
II- La préparation et la coloration des échantillons pour la microscopie optique	21
II-1- La fixation des échantillons.....	21

II-2-	La coloration des échantillons.....	22
II-2-1-	La coloration simple	22
II-2-2-	La coloration différentielle.....	22
III-	La morphologie cellulaire.....	23
III-1-	La taille.....	23
III-2-	La forme et associations cellulaires	23
IV-	Structure cellulaire d'une bactérie :	25
IV-1-	La paroi bactérienne	26
IV-1-1-	Composition chimique	26
IV-1-2-	Les parois des bactéries Gram-positives.....	28
IV-1-3-	Les parois des bactéries Gram-négatives	29
IV-1-4-	Coloration de Gram.....	32
IV-1-5-	Cas de parois particulières	33
IV-1-6-	Fonctions.....	34
IV-2-	La membrane plasmique	35
IV-2-1-	Structure et composition chimique	36
IV-2-2-	Fonctions.....	38
IV-3-	Le cytoplasme	41
IV-3-1-	Les ribosomes	41
IV-3-2-	Les corps d'inclusion et les substances de réserve	43
IV-4-	Le chromosome	44
IV-4-1-	Morphologie.....	44
IV-4-2-	Composition et structure	45
IV-4-3-	Réplication	45
IV-4-4-	Rôle :	46
IV-5-	Les plasmides	47
IV-5-1-	Structure et réplication	47

IV-5-2-	Transfert plasmidique	47
IV-5-3-	Propriétés	50
IV-6-	Les Pilis	50
IV-6-1-	Pilis communs	51
IV-6-2-	Pilis sexuels.....	51
IV-7-	La capsule.....	51
IV-7-1-	Composition et morphologie.....	51
IV-7-2-	Fonctions.....	52
IV-8-	Les cils et les flagelles.....	52
IV-8-1-	Mise en évidence.....	52
IV-8-2-	Structure et disposition	53
IV-8-3-	Fonctions.....	54
IV-9-	Les endospores bactériennes	55
IV-9-1-	Mise en évidence.....	55
IV-9-2-	Morphologie.....	56
IV-9-3-	Structure	57
IV-9-4-	Phénomène de sporulation	58
IV-9-5-	Propriétés de la spore bactérienne.....	59
IV-9-6-	Germination	60
Chapitre III : Introduction à la classification bactérienne.....		62
I-	Définition	62
II-	Types de classification bactérienne.....	62
II-1-	Classification phénétique	62
II-2-	Classification phylogénique	62
II-3-	Classification génotypique	63
II-4-	Classification de Bergey.....	63
III-	Les rangs taxonomiques	63

IV-	Critères et les techniques d'études de classification bactérienne.....	64
IV-1-	Les critères classiques	65
IV-2-	Les critères moléculaires	65
Chapitre IV : Nutrition bactérienne.....		67
I-	Besoins élémentaires	67
II-	Facteurs de croissance	67
III-	Types trophiques.....	68
IV-	Paramètres physico-chimiques	69
IV-1-	La température.....	69
IV-2-	Le pH.....	70
IV-3-	L'oxygène (O ₂)	71
IV-4-	Les solutés et l'activité de l'eau aW	71
IV-5-	La pression	72
V-	L'absorption des nutriments.....	73
VI-	La culture bactérienne et les milieux de culture	73
VI-1-	Notions	74
VI-2-	Les caractères cultureux	74
Chapitre V : Croissance bactérienne.....		75
I-	Définition	75
II-	Mesure de la croissance bactérienne	76
II-1-	Dénombrement au microscope.....	76
II-2-	Epifluorescence	76
II-3-	Compteur de particules.....	77
II-4-	Dénombrement après culture.....	77
II-5-	Mesure de la masse	78
II-6-	Mesure du trouble.....	79
II-7-	Filtration sur membrane	79

II-8-	Mesure des constituants cellulaires	79
II-9-	Mesure de l'activité cellulaire	80
III-	Cinétique de croissance	80
III-1-	Paramètres de croissance.....	80
III-1-1-	Temps de génération	80
III-1-2-	Taux de croissance	80
III-1-3-	Paramètres physico-chimiques.....	80
III-2-	Courbe de croissance dans un système fermé	80
III-2-1-	La phase de latence	81
III-2-2-	La phase exponentielle.....	81
III-2-3-	La phase stationnaire.....	82
III-2-4-	La phase de déclin.....	82
III-3-	La culture continue.....	83
III-3-1-	Le chémostat	83
III-3-2-	Turbidostat	83
Chapitre VI : Agents antimicrobiens		84
I-	Définition et notions.....	84
II-	Agents physiques.....	84
II-1-	Température	85
II-1-1-	Effet des hautes températures	85
II-1-2-	Effet des basses températures	85
II-2-	Radiations.....	86
II-3-	Pression	86
II-4-	Centrifugation.....	86
II-5-	Filtration	86
II-6-	Ultrasons.....	87
III-	Agents chimiques	87

IV-	Agents biochimiques et modes d'action	87
IV-1-	Définition	87
IV-2-	Cibles des antibiotiques.....	88
IV-3-	Modes d'action des antibiotiques.....	89
IV-3-1-	Inhibiteurs de la synthèse de la paroi	89
IV-3-2-	Inhibiteurs de la synthèse de la membrane cytoplasmique	89
IV-3-3-	Inhibiteurs de la réplication d'ADN.....	89
IV-3-4-	Inhibiteurs de la synthèse des protéines	89
IV-3-5-	Autres mécanismes	90
IV-4-	Spectre d'activité des antibiotiques.....	90
IV-5-	Association des antibiotiques	90
IV-6-	L'antibiogramme et CMI	91
IV-7-	Concentration minimale bactéricide.....	93
Chapitre VII : Aperçu sur les rôles des bactéries		95
I-	Bactéries et environnement naturel	95
I-1-	Les océans et les eaux douces	95
I-2-	Le sol et l'air.....	95
II-	Bactéries et santé.....	96
III-	Bactéries et agriculture	97
IV-	Bactéries et industrie	97
IV-1-	Industrie agro-alimentaire	97
IV-2-	Energie et environnement.....	98
IV-3-	Biotechnologie	98
Références bibliographiques		101

Liste des figures

Figure 1 : Les domaines de la microbiologie.	11
Figure 2 : La chronologie de l'évolution biologique et géologique.....	15
Figure 3 : L'arbre phylogénétique universel	15
Figure 4 : Un microscope optique à fond clair.....	18
Figure 5 : Photo d'un microscope électronique à transmission et à balayage	20
Figure 6 : <i>Enterococcus faecalis</i> observée sous un microscope électronique à transmission et à balayage.....	21
Figure 7 : Schéma simplifié d'une cellule bactérienne.....	25
Figure 8: La composition des sous-unités du peptidoglycane chez <i>Salmonella</i>	27
Figure 9 : Schéma simplifié de la structure du peptidoglycane.	27
Figure 10: Représentation de la paroi des bactéries Gram-positives.	28
Figure 11: La structure d'un acide téichoïque.	29
Figure 12: Représentation de la paroi des bactéries Gram-négatives.	30
Figure 13: La structure de lipopolysaccharides.....	31
Figure 14: Formation de protoplastes et de sphéroplastes.	35
Figure 15: La structure de la membrane cytoplasmique bactérienne	36
Figure 16: Structure des phospholipides membranaires.	37
Figure 17 : Modalités de transport membranaire passif.....	39
Figure 18 : Les trois systèmes de transport membranaire	39
Figure 19 : Les trois classes de transporteurs membranaires.	40
Figure 20: Composition des ribosomes procaryotes vs ribosomes eucaryotes	42
Figure 21 : Processus de biosynthèse des protéines par les ribosomes bactériens.....	42
Figure 22 : Le changement de conformation de l'ADN bactérien.....	44
Figure 23: La structure en double hélice de l'ADN.....	45
Figure 24 : Le mode semi-conservatif de la réplication d'ADN.	46
Figure 25 : Rôle de l'ADN dans l'expression des caractères héréditaires.	46
Figure 26 : Modes de transfert plasmidique.....	48
Figure 27 : Le transposon de la résistance à la vancomycine chez le genre <i>Enterococcus</i>	50
Figure 28: L'ultrastructure d'un flagelle de bactéries à Gram négatif et à Gram positif	53
Figure 29 : Résultats d'une coloration de Benito-Trujillo effectuée sur <i>Bacillus subtilis</i>	56

Figure 30 : Les différentes morphologies de l'endospore bactérienne.	56
Figure 31 : La structure d'une endospore bactérienne.....	57
Figure 32 : Le cycle sporal.....	58
Figure 33 : La germination d'une endospore.....	60
Figure 34 : Structure hiérarchique en taxonomie.....	64
Figure 35 : Influence de la température sur la croissance bactérienne.....	69
Figure 36 : Les bactéries et la température.....	70
Figure 37 : Les bactéries et le pH du milieu.....	70
Figure 38 : Les bactéries et la concentration de l'oxygène.....	71
Figure 39 : Etapes de la division cellulaire par scissiparité chez <i>Enterococcus faecalis</i> observées par un microscope électronique à transmission.....	75
Figure 40 : La cellule de Thoma et la cellule de Malassez.....	76
Figure 41 : Dénombrement après culture des bactéries.....	78
Figure 42 : Courbe de croissance dans un système fermé.....	81
Figure 43: Les différentes cibles des antibiotiques.....	88
Figure 44: Détermination de la CMI par la technique de dilution en tube.....	91
Figure 45 : Antibiogramme.....	92
Figure 46 : Détermination de CMI par le E-test.....	93
Figure 47 : Détermination de la CMB.....	94
Figure 48 : Impact des bactéries sur l'homme et ses activités ainsi que sur l'environnement naturel.....	100

Liste des tableaux

Tableau I : Quelques évènements importants dans le développement de la microbiologie.....	13
Tableau II : Les principales différences entre les cellules procaryotes et les cellules eucaryotes.....	16
Tableau III : Quelques types morphologiques fréquemment retrouvées chez les bactéries. ...	24
Tableau IV: Illustration des étapes de la coloration de GRAM.	33
Tableau V : Arrangement des flagelles chez les bactéries	54
Tableau VI : Récapitulatif des types trophiques chez les bactéries	68
Tableau VII : Les bactéries et les paramètres physico-chimiques	72

Chapitre I : Le monde microbien

I- Introduction :

Le terme de microbe peut être défini comme l'ensemble des êtres vivants dont la taille est invisible à l'œil nu. C'est leur seul point commun, car ils diffèrent et varient par leur morphologie, leur physiologie, leur mode de reproduction et leur écologie. Ces microbes comprennent les bactéries, les archéobactéries, les champignons microscopiques (levures et moisissures), les algues unicellulaires et les protozoaires. Les virus, quant' à eux, sont considérés comme des êtres non vivants, acellulaires qui dépendent entièrement de leurs cellules hôtes.

La microbiologie est la discipline qui s'intéresse à l'étude de ces microbes appelés également: micro-organismes (du grec : *mikrós* " petit "; et *organismós*, " organisme "). Elle se divise en deux grands domaines à savoir, la microbiologie fondamentale et la microbiologie appliquée.

La microbiologie fondamentale se consacre à l'étude et à la compréhension des mécanismes microbiens. C'est à dire, elle a pour but l'identification et la caractérisation des micro-organismes, l'étude de leur physiologie et leurs structures moléculaires, la compréhension des relations micro-organismes vs milieu naturel et enfin, l'étude de leur identité, leur origine et leur évolution. Grâce à la microbiologie fondamentale, beaucoup de sciences ont vu le jour, à l'instar de la **bactériologie** (l'étude des bactéries), la virologie (l'étude des virus), mycologie (l'étude des mycètes : levures et moisissures), parasitologie (étude des parasites)...etc.

La connaissance des caractéristiques des microorganismes a permis leur mise en application afin d'exploiter au mieux leurs activités. Donc, la microbiologie appliquée a pour objet l'utilisation des micro-organismes dans différents domaines; alimentaire, agroalimentaire, industriel, biotechnologique, clinique...etc.

Enfin, la microbiologie occupe une place centrale en biologie. En effet, elle contribue efficacement à comprendre l'évolution et les origines de la vie, la génétique, la biochimie et l'écologie. En outre, la microbiologie a servie de base pour le fondement de l'immunologie et l'évolution du domaine clinique et thérapeutique.

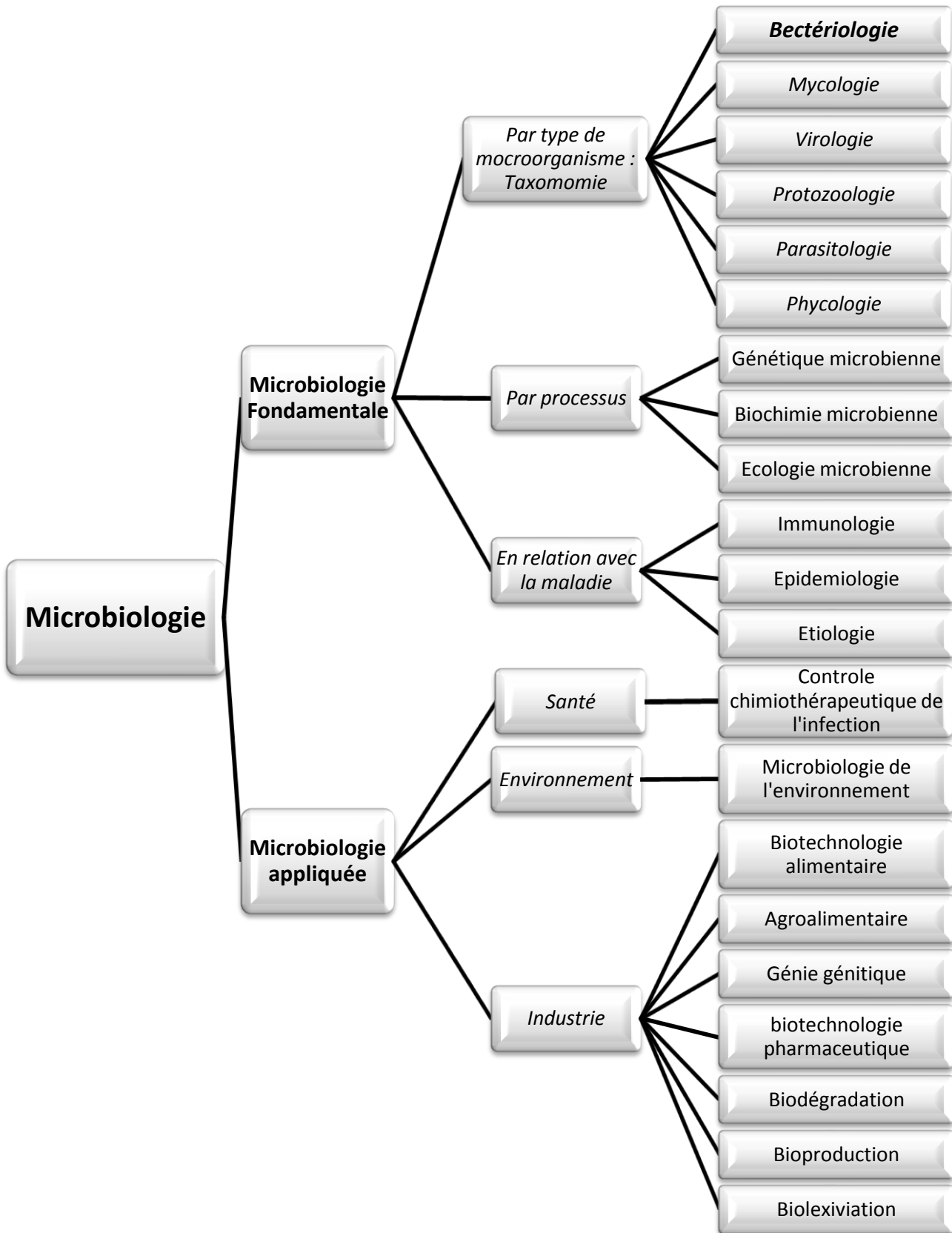


Figure 1 : Les domaines de la microbiologie d'après Black, 2012 modifié.

II- Historique

L'homme était incapable de soupçonner l'existence du monde des micro-organismes qui l'entourait vu leur petite taille. Tout a commencé par l'invention d'un outil qui a permis leur observation. Une des découvertes les plus importantes en biologie a eu lieu en 1665. A travers un microscope relativement simple, Robert Hooke, a rapporté au monde que les organes sont composés d'unités structurales très petites qu'il a appelé "petites boîtes". En utilisant sa version améliorée d'un microscope, Hooke a été en mesure de voir les cellules individuelles et développe la théorie cellulaire. Bien que le microscope de Hooke fût capable de montrer de grandes cellules, il lui manquait la résolution qui lui aurait permis de voir clairement les microbes. En 1673, le commerçant et scientifique néerlandais Anton van Leeuwenhoek a probablement été le premier à observer des micro-organismes vivants à travers les lentilles des microscopes qu'il a construites, pour décrire enfin, les structures de ces derniers qu'il a appelé "animalicules". Van Leeuwenhoek a fait des dessins détaillés des animalicules qu'il a trouvés dans l'eau de pluie, dans ses propres selles et dans le matériel utilisé pour nettoyer ses dents. Depuis, ces dessins ont été identifiés comme des représentations de bactéries et de protozoaires (Prescott *et al.*, 2003).

Depuis la découverte de Van Leeuwenhoek, le monde des micro-organismes a été révélé. Francesco Redi en 1688 vient pour contester la génération spontanée; une théorie largement admise par ses précédents et qui prétend que la vie apparaît spontanément à partir de la terre ou des matières organiques. Il fallait attendre l'arrivée de Louis Pasteur avec ses importantes découvertes pour réveiller la microbiologie (fermentations, pasteurisations, vaccins, fondement de l'immunologie....etc.). La période allant de 1857 à 1914 a été nommée l'âge d'or de la microbiologie. Pendant cette période, des progrès rapides, menés principalement par Pasteur et Robert Koch, ont conduit à l'établissement de la microbiologie comme étant une science. Les découvertes au cours de ces années comprenaient à la fois les agents de nombreuses maladies et le rôle de l'immunité dans la prévention et la guérison des maladies. Au cours de cette période productive, les microbiologistes ont étudié les activités chimiques des micro-organismes, amélioré les techniques de microscopie et de culture des microorganismes, développé des vaccins et des techniques chirurgicales (Tortora *et al.*, 2012). Certains des événements majeurs survenus pendant l'âge d'or de la microbiologie sont répertoriés dans le tableau I.

Tableau I : Quelques évènements importants dans le développement de la microbiologie (Madigane & Martinko, 2007; Cano & Borucki, 1995; Heidelberg *et al.*, 2000; Prescott *et al.*, 2003, 2013; Schulz *et al.*, 1999; Tortora *et al.*, 2012)

Année		Auteurs	Découverte
1500	1546	Girolamo Fracastoro	Suggère que des organismes invisibles soient la cause de maladies
	1590-1608	Zacharias Janssen	Développe des lentilles et le premier microscope
1600	1688	Francesco Redi	Conteste l'hypothèse de la génération spontanée
	1665	Robert Hooke	Première description d'une cellule biologique et le premier à utiliser le mot cellule
	1673	Antony Van Leeuwenhoek	Première observation d'animalcules grâce à sa découverte du compte-fils
1700	1735	Carl Linnæus	Fondement des bases du système moderne de la nomenclature binominale
	1798	Edward Jenner	Premier médecin à avoir introduit et étudié le vaccin contre la variole
1800	1835	Agostino Bassi	Mise en évidence du champignon qui affecte le ver à soie
	1840	Ignace Philippe Semmelweis	Démontre que le lavage des mains diminuait le nombre des décès causés par la fièvre puerpérale des femmes après l'accouchement
	1853	Heinrich Anton de Bary	Fondateur de la phytopathologie.
	1857	Louis Pasteur	Phénomènes de la fermentation
	1861	Louis Pasteur	Mis un terme à la théorie de la génération spontanée
	1864	Louis Pasteur	Pasteurisation
	1867	Joseph Lister	pionniers de l'antiseptie dans la chirurgie opératoire
	1876	Robert Koch *	la théorie microbienne (pathologique) proposant que de nombreuses maladies sont causées par des micro-organismes
	1879	Albert Neisser	Mise en évidence de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
	1881	Robert Koch *	Culture pure
	1881	Carlos Finlay	Fièvre jaune
	1882	Robert Koch *	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	1882	Fanny Hesse	milieu agar (solide)
	1883	Robert Koch *	<i>Vibrio cholerae</i>
	1884	Ilya Ilitch Metchnikov	Phagocytose
	1884	Hans Christian Gram	Coloration de Gram
	1885	Theodor Escherich	<i>Escherichia coli</i>
	1887	Julius Richard Petri	Boite de Pétri
	1889	Kitasato Shibasaburō	<i>Clostridium tetani</i>
	1890	Emil Adolf von Behring *	Antitoxine diphtérique
	1890	Paul Ehrlich *	Théorie de l'immunité
	1892	Sergueï Winogradsky	Cycle de soufre
	1898	Kiyoshi Shiga	<i>Shigella dysenteriae</i>
1900	1902	Ronald Ross *	Découvre le mode de transmission de la malaria
	1908	Paul Ehrlich *	Syphilis
	1910	Carlos Chagas	<i>Trypanosoma cruzi</i>
	1911	Peyton Rous *	Virus oncogènes (mais le prix Nobel en 1966)
	1928	Fleming , Chain, Florey *	Pénicilline
	1928	Frederick Griffith	Transformation bactérienne

L'âge d'or de la microbiologie

	1934	Rebecca Lancefield	Antigènes des streptocoques
1900	1935	Stanley, Northrup, Sumner *	Cristallisation de virus
	1941	Beadle et Tatum	Relation entre gène et enzyme
	1943	Delbrück et Luria *	Infection virale de bactérie
	1944	Avery, MacLeod, McCarty	l'ADN est le matériel génétique
	1946	Lederberg et Tatum	Conjugaison bactérienne
	1952	Selman A. Waksman *	Découverte de la streptomycine
	1953	Hans A. Krebs *	Découvre le cycle de Krebs (étapes de dégradation des carbohydrates)
	1953	Watson et Crick *	Structure de l'ADN
	1957	Jacob et Monod	Régulation de la synthèse protéique
	1959	Sarah Stewart	cause virale du cancer humain
	1962	Edelman et Porter *	Anticorps
	1964	Epstein, Achong, Barr	virus Epstein-Barr comme cause de cancer humain
	1971	Nathans, Smith, Arber *	Enzyme de restriction
	1973	Paul Berg	Génie génétique
	1975	Dulbecco, Temin, Baltimore	Reverse transcriptase
	1978	Carl Woese	Archaea
	1978	Peter Mitchell *	Mécanismes de chimioosmose
	1981	Lynn Margulis	Origine des cellules eucaryotes
	1982	Aaron Klug *	structure du virus de la mosaïque du tabac
	1983	Barbara McClintock *	Transposons
1988	Deisenhofer, Huber, Michel *	Photosynthèse des pigments bactériens	
1995	Cano RJ et Borucki MK	Identification et reviviscence des spores bactériennes de l'ère dominicaine de 25 à 40 millions d'années	
1997	Stanley Ben Prusiner *	Prions	
1997	Schulz <i>et al</i>	Découverte de bactéries géantes " <i>Thiomargarita namibiensis</i> "	
2000	Heidelberg <i>et al</i>	Découverte de deux chromosomes distincts chez <i>Vibrio cholera</i>	

(*) : Lauréats de prix Nobel

1857-1914 : L'âge d'or de la microbiologie

III- Place de microorganismes dans le monde vivant

Les micro-organismes existaient sur terre depuis des milliards d'années (figure 2). Selon l'ancienne classification, le monde vivant a été subdivisé en trois (3) règnes à savoir; le règne animal, le règne végétal et le règne des protistes. Ce dernier est, à son tour, divisé en protistes inférieurs (procaryotes) comprenant les bactéries et algues bleues et protistes supérieurs (eucaryotes) comprenant les champignons (levures et moisissures), les protozoaires et les algues autres que les algues bleues. Dans cette classification, ni les virus ni les archéobactéries ne sont classifiés. Actuellement, avec le développement de la biologie moléculaire, une nouvelle classification est proposée. Cette dernière est basée sur la comparaison des séquences d'ARN ribosomique (ARNr). Cette classification a permis de

tracer l'arbre phylogénétique universel qui comprend trois domaines à savoir; deux domaines procaryotes (**Bacteria** et Archaea) et un domaine eucaryote (Eucarya) (Figure 3).

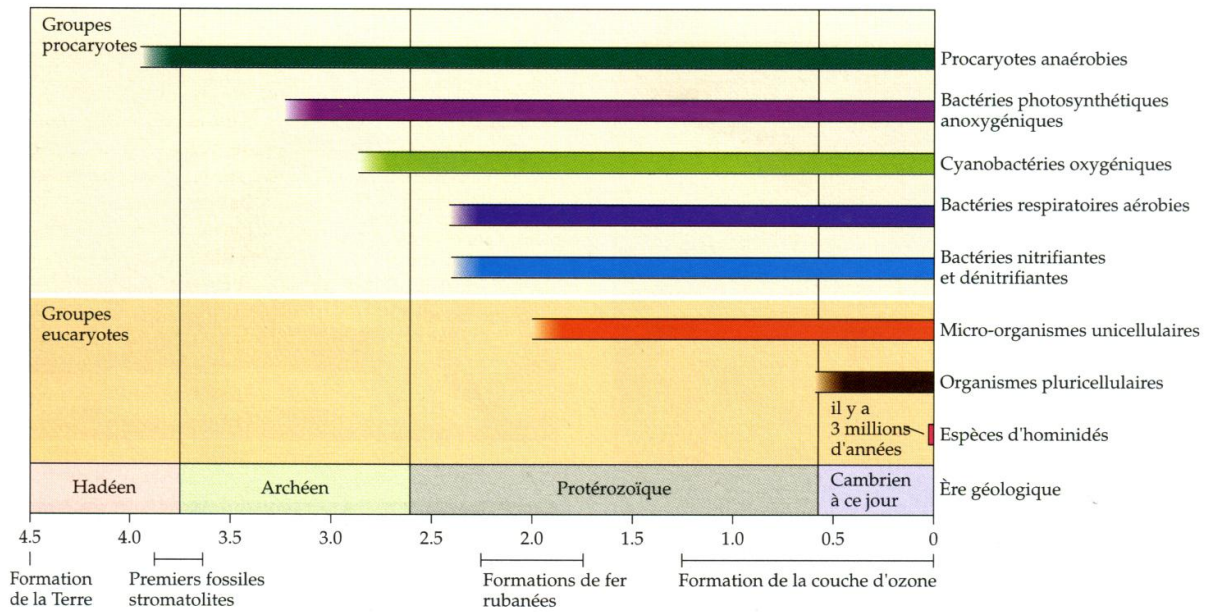


Figure 2 : La chronologie de l'évolution biologique et géologique d'après Madigane & Martinko, 2007.

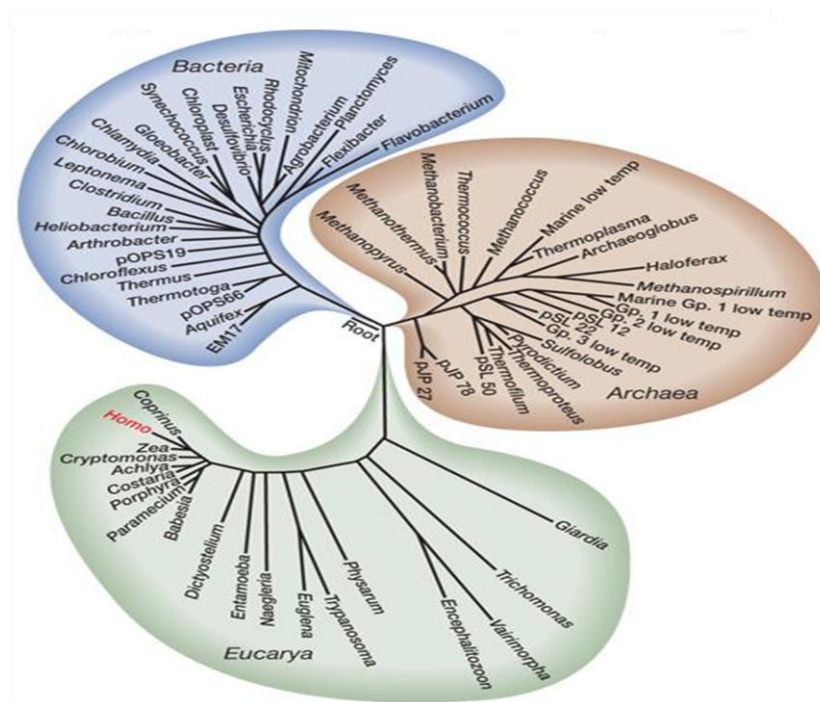


Figure 3 : L'arbre phylogénétique universel (Prescott *et al.*, 2013). Root étant le premier ancêtre commun

IV- Caractéristiques générales de la cellule procaryote

Contrairement à la morphologie complexe et la taille de la cellule eucaryote, la cellule procaryote est plutôt de petite taille et de morphologie simple avec un noyau non entouré par une membrane nucléaire. Généralement, la notion de compartimentation en utilisant des membranes pour délimiter chaque organe est une caractéristique des eucaryotes. Les cellules procaryotes, comprenant les bactéries et archéobactéries, sont délimitées uniquement d'une membrane cytoplasmique dans laquelle le chromosome, les ribosomes et les autres constituants baignent dans le cytoplasme. Le tableau 2 rapporte les principales différences entre les deux types de cellule procaryote et eucaryote.

Tableau II : Les principales différences entre les cellules procaryotes et les cellules eucaryotes.

	Cellule procaryote	Cellule eucaryote
Organisation génétique		
Enveloppe nucléaire	Absente	Présente
Nombre de chromosomes	Généralement 1 et circulaire	> 1 non circulaire
Nucléole	Absent	Présent
Structures cellulaires		
Réticulum endoplasmique	Absent	Présent
Appareil de Golgi	Absent	Présent
Lysosomes	Absents	Présents
Mitochondries	Absentes	Présentes
Chloroplastes	Absents	Présents chez les plantes
Microtubules	Absents	Présents
Paroi cellulaire avec peptidoglycane	Présente (<i>sauf chez mycoplasmes et archaeobactéries</i>)	Absente
Ribosomes	70 S	80 S (<i>sauf mitochondries et chloroplastes</i>)

Chapitre II : La cellule bactérienne

I- Techniques d'observation de la cellule bactérienne

Les dimensions des micro-organismes et des entités microbiologiques sont microscopiques, allant des virus dont la taille est de l'ordre de nanomètre (nm) jusqu'aux protistes dont les plus grands atteignent 200 micromètres (μm) de diamètre. Par conséquent, le microscope est d'une importance primordiale pour observer et comprendre les structures cellulaires. De plus, certains types de microscopes fournissent de précieux détails sur les fonctions des structures observées. Donc, la compréhension du fonctionnement d'un microscope ainsi que la maîtrise des méthodes de préparation des échantillons à examiner est particulièrement nécessaire pour un microbiologiste.

Actuellement, il existe plusieurs types de microscopes. Par ailleurs, considérant uniquement le type des ondes traversant l'échantillon; on distingue le microscope optique qui utilise les photons (lumière) et le microscope électronique qui utilise les électrons. Ces microscopes se différencient dans la résolution de l'image (agrandissement), les objectifs attendus ainsi que les techniques de préparation des échantillons.

I-1- Le microscope optique

Le principe d'un microscope optique repose sur le fonctionnement des lentilles convexes qui condensent et focalisent les rayons lumineux provenant d'une source éloignée à point (le foyer) d'une distance au centre de la lentille appelée; la distance focale.

En général, la limite de résolution d'un microscope optique est de $0.2\mu\text{m}$ (200 nm). Cependant, il permet un certain nombre d'avantages comme l'observation à l'état frais, l'utilisation de colorants, préparation facile d'échantillons...etc. Les microbiologistes utilisent divers microscopes optiques à utilité particulière. Parmi ces microscopes, on cite :

I-1-1- Le microscope à fond clair :

Le microscope à fond clair est utilisé en routine dans un laboratoire de microbiologie. Dans ce type de microscope, l'image apparaît foncée sur un fond clair d'où son appellation. Pour le décrire brièvement, Il est composé d'une source lumineuse (miroir ou lampe éclectique) située dans le socle, d'un condensateur (condense la lumière émise), d'une platine porte

échantillon réglable, des objectifs et deux oculaires dont le rôle est de grossir l'image. L'ensemble est tenu grâce à un corps métallique solide (figure 4).

NB : Les micro-organismes non pigmentés ne sont pas clairement visibles, il faut les colorer pour augmenté le contraste.

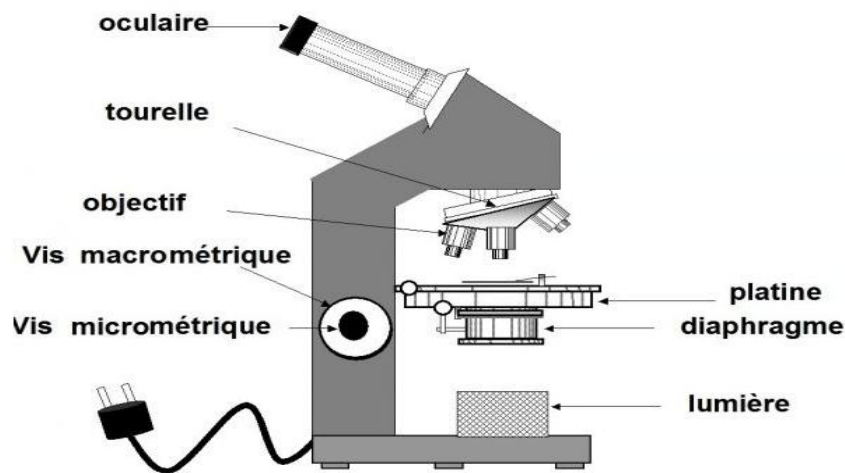


Figure 4 : Un microscope optique à fond clair (Genty, 2013).

I-1-2- Le microscope à fond noir

Les micro-organismes non pigmentés sont moins visibles dans un microscope à fond clair à cause de la faible différence de contraste entre la cellule et le milieu dans lequel est y mise (ex : l'eau). Afin de pouvoir observer ces micro-organismes, sans être obligé de les fixer ou de les colorer, le microscope à fond noir répond à ce problème. En effet, il permet d'observer des cellules vivantes non colorées en utilisant un con creux de lumière qui est dirigé vers l'échantillon de telle sorte à l'éclairer uniquement par les cotés (en lumière rasante). Donc, les seuls rayons qui atteignent la lentille sont ceux diffusés par l'échantillon lui même. Ceci donne comme résultat une image d'un échantillon lumineux sur un fond noir.

I-1-3- Le microscope à contraste de phase

Le principe d'un microscope à contraste de phase est la transformation de différences légères d'indice de réfraction et de densité cellulaire en différences d'intensité lumineuse bien observables. Le résultat de l'observation se traduit par un fond légèrement clair (formé par la lumière non déviée) et un échantillon non coloré qui parait sombre mais bien défini. Ce type de

microscope est spécialement utilisé pour voir la mobilité, la forme des cellules vivantes ainsi que certains constituants bactériens comme l'endospore et les corps d'inclusion.

I-1-4- Le microscope à contraste d'interférence différentielle

Le microscope à contraste d'interférence différentielle fonctionne avec le même principe que le microscope à contraste de phase. La différence réside dans l'ajout de prismes qui génèrent des rayons polarisés dans des plans perpendiculaires. Alors, la recombinaison et l'interférence des ces derniers, forme une image d'un l'échantillon vivant non coloré en trois dimensions avec des couleurs vives. Des structures comme la paroi cellulaire, les vacuoles, les endospores sont nettement visibles.

I-1-5- Le microscope à fluorescence

Dans la microscopie à fluorescence, les échantillons sont habituellement contrastés par un colorant appelé fluorochrome. L'échantillon est alors éclairé avec une lumière ultra-violette, violette ou bleue, permettant ainsi d'obtenir une image de l'objet résultante de la lumière fluorescente émise par l'échantillon.

I-1-6- Le microscope confocal

Le microscope confocal appelé plus précisément le microscope confocal à balayage laser (MCBL). Il est considéré comme un très bon moyen pour avoir un seul plan d'un échantillon tridimensionnel. Dans ce microscope, un rayon laser monochromatique illumine un échantillon habituellement rendu fluorescent. Grâce à une ouverture qui bloque tout autre rayon émis par les autres cotés de l'échantillon ou d'un l'échantillon en superposition, seule la lumière provenant du plan focal sert à créer une image nette.

I-2- Le microscope électronique

A l'inverse d'un microscope optique, caractérisé par une résolution limitée de 0.2 μ m, rendant l'observation des virus ou d'ultra-structures de bactérie impossible, un microscope électronique peut atteindre une résolution de 0.2nm. De plus, la microscopie électronique utilise les électrons au lieu des photons pour la construction de l'image. Grâce à ce dernier, des molécules comme les protéines ou les acides nucléiques sont nettement observables.

Il existe différents types de microscopes électroniques à savoir; Le microscope électronique à transmission, le microscope électronique à balayage, la cryomographie

électronique, le microscope électronique à balayage de sonde...etc. Pour l'ensemble de ces microscopes, l'échantillon observé est fixé (non vivant).

I-2-1- Le microscope électronique à transmission

Dans un microscope électronique à transmission (figure 5), les électroaimants fonctionnent comme les lentilles et le système fonctionnent sous vide total. De plus, il est équipé d'un appareil photo. Contrairement à la lumière visible, une source d'électron ne pénètre pas bien la cellule (elle est trop épaisse pour être observée). C'est pourquoi, des techniques spécifiques de coupes fines sont nécessaires pour préparer l'échantillon avant l'observation. Afin d'obtenir suffisamment de contraste, les coupes fines sont traitées par des colorants tels que l'acide osmique, les sels de plomb, de permanganate, d'uranium ou de lanthanum. En fin, l'image de l'échantillon apparaît en noir et blanc (figure 6).

I-2-2- Le microscope électronique à balayage

En microscopie électronique à balayage, la réalisation de coupes fine est inutile. Au contraire, les cellules sont intactes et peuvent directement être observées grâce à une technique appelée coloration négative. En effet, l'échantillon est recouvert d'une fine couche de métal lourd (ex: l'or). Les rayons d'électrons qui parcourent toute la longueur de l'échantillon dispersés par le métal, seront collectés sur un écran pour former une image (figure 5). A noter que les surfaces de plusieurs cellules de l'échantillon peuvent être observées à la fois (figure 6).



Figure 5 : Photo d'un microscope électronique à transmission (à gauche) et à balayage (à droite) (Bantegnies *et al.*, 2010).

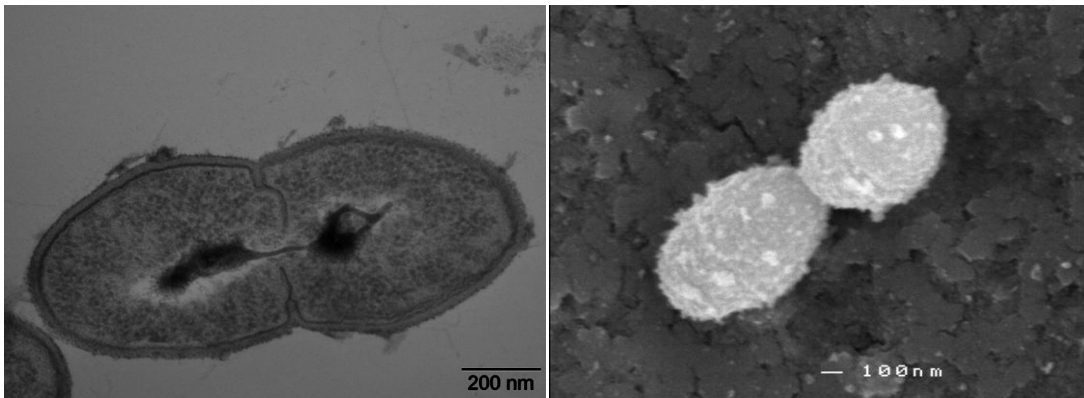


Figure 6 : *Enterococcus faecalis* (bactérie à Gram positif) observée sous un microscope électronique à transmission (à gauche) et à balayage (à droite) (Ladjouzi, 2013)

II- La préparation et la coloration des échantillons pour la microscopie optique

La préparation de l'échantillon pour un examen par la microscopie optique varie selon l'objectif visé. Il peut être directement observé à l'état frais entre lame et lamelle afin d'observer les cellules vivantes, leur mobilité ainsi que leur morphologie. Cependant, dans la plus part des cas, la visibilité est limitée notamment chez les espèces non pigmentées. Alors, il est souvent nécessaire de fixer les échantillons et les colorer pour augmenter la visibilité et mettre en évidence certaines particularités morphologiques.

II-1- La fixation des échantillons

La fixation est un procédé par lequel toutes les structures internes et externes de la cellule sont figées et conservées en place. Pour ce faire, deux méthodes sont utilisées à savoir; la fixation à la chaleur et la fixation chimique.

La fixation à la chaleur consiste à chauffer doucement une monocouche de bactérie séchée à l'air en le passant brièvement sur une flamme. Ce procédé préserve correctement la morphologie générale de la cellule mais pas les structures intracellulaires.

La fixation chimique est plus utilisée pour protéger les structures cellulaires fines et la morphologie de microorganismes plus gros et plus délicats. Les fixateurs chimiques pénètrent à l'intérieur des cellules pour inactiver les protéines et les lipides et les rendent insolubles et

immobiles. Les fixateurs couramment utilisés contiennent de l'éthanol, de l'acide acétique, du chlorure mercurique, le formaldéhyde et le glutaraldéhyde (Prescott *et al.*, 2013).

II-2- La coloration des échantillons

Les colorants utilisés en biologie sont constitués d'un groupement chromophore (couleur) et d'un groupement auxochrome (groupement ionisé). Ce dernier, attribut souvent une charge globale soit positive (colorants basiques), soit négative (colorants acides). La coloration se fait par une fixation permanente sur des constituants cellulaires de charges opposées. Certaines colorations sont compatibles avec la vie cellulaire, d'autres nécessitent la fixation des cellules. Il est à noter que certains colorants sont utilisés pour obtenir une coloration négative, c'est à dire, le fond est coloré mais pas la cellule (ex : encre de chine qui donne un fond noir et les cellules apparaissent brillantes non colorées).

Selon la charge des colorants on distingue :

Les colorants basiques : mettent en évidence des constituants cellulaires acides, dits basophiles tels que les acides nucléiques et de nombreuses protéines. Les colorants de ce type les plus utilisés dans les laboratoires de microbiologie sont ; le crystal violet (violet), le bleu de méthylène (bleu), la fuchsine basique (rouge), la safranine (orange), le vert de malachite (vert), le carmin (rouge)...etc.

Les colorants acides : révèlent des constituants cellulaires basiques, dits acidophiles. Les plus couramment utilisés sont ; éosine (rouge), rose bengale (rose), fuschine acide (rouge).

II-2-1- La coloration simple

La coloration simple est obtenue en utilisant un seul colorant acide ou basique à caractère général (pas d'affinité spécifique à une structure cellulaire particulière). Ce genre de coloration reflète la forme générale de la cellule.

II-2-2- La coloration différentielle

La coloration différentielle nécessite l'application d'un ou plusieurs colorants et réactifs. Ce type de coloration permet la mise en évidence de certaines structures particulières (comme la coloration négative de la capsule à l'encre de chine et la coloration de la spore au vert de malachite) ou la différenciation de groupes microbiens (comme la coloration de Gram pour

déterminer le type de la paroi de la bactérie, la coloration de Zielh Nielsen qui relève le groupe des mycobactéries...etc.).

NB : La coloration de Gram sera développée dans le cours sur la paroi

III- La morphologie cellulaire

Les cellules bactériennes sont caractérisées par leur taille, leur poids, leur morphologie et leur type de regroupement spécifique. Ce sont des caractères communs au sein d'une espèce voire même du genre bactérien.














III-1- La taille

Généralement, la taille approximative de la plupart des bactéries varie entre 0.2µm (ex : *Mycoplasma pneumoniae*, *chlamydia*...) et 18µm (ex : *Thiovulum majus*). Cependant, certaines espèces peuvent dépasser largement cet intervalle, à l'instar des certaines cellules de *Spirochaeta* qui avoisinent les 250 µm de long ou également l'espèce *Epulopiscium fishelsoni*, qui habite l'intestin du poisson chirurgical *Acanthurus nigrofuscus*, qui mesure plus de 600 µm (Angert *et al.*, 1993). Exceptionnellement, *Thiomargarita namibiensis* présente la plus grande dimension rapportée pour une bactérie (à ce jour) et dont certaines cellules mesurent jusqu'à 750µm (Schulz *et al.*, 1999).

III-2- La forme et associations cellulaires

Quant aux formes et au poids des cellules bactérienne, celles-ci diffèrent selon les espèces. Le poids d'une bactérie est d'environ 10^{-12} g. Concernant les formes, les plus retrouvées sont; les formes coques (sphériques), les formes bacilles (bâtonnets allongés), les formes coccobacilles (formes intermédiaires entre coques et bacilles, ovoïdes), les formes incurvées (vibrions), les formes spiralées dont certaines sont rigides (spirilles) et d'autres sont flexibles (spirochètes), les formes filamenteuses (mycélium des actinomycètes), les formes pédonculées (allongement dans l'extrémité) et enfin des formes pléomorphes (changent de formes). Toutes ces formes peuvent être retrouvées seules, associées par deux (diplococoques, diplobacilles), en chaînette (streptocoques, streptobacilles), en amas (groupées), en tétrades (par quatre), amas en grappe de raisin,...etc. Dans le tableau ci-dessous, les formes les plus retrouvées avec leurs caractéristiques, les groupements fréquents et les schémas correspondants de chaque forme sont rapportés (Tableau III).

Tableau III : Quelques types morphologiques fréquemment retrouvés chez les bactéries.

Formes	caractéristiques	Regroupement	Schéma	Exemple de genre bactérien
Coques	Forme sphérique généralement de 0.5 à 2 μm	Isolés		Genre <i>Micrococcus</i>
		Diplocoques		Genre <i>Enterococcus</i>
		Chaînettes		Genre <i>Streptococcus</i> Genre <i>Enterococcus</i>
		Amas réguliers, grappe de raisin		Genre <i>Staphylococcus</i>
		Tétrades		Genre <i>Sarcina</i> Genre <i>Deinococcus</i>
Bacilles (Bâtonnets)	Forme droite Jusqu'à 6 μm de long, 0.5 à 2 μm de large. Extrémités plates, arrondies ou carrées	Souvent isolés mais retrouvés également en paires ou en chaînettes (streptobacilles).		Genre <i>Bacillus</i> Genre <i>Lactobacillus</i> Genre <i>Pseudomonas</i> Genre <i>Chlostridium</i> Genre <i>Mycobacterium</i>
Coccobacilles	Forme intermédiaire entre les coques et les bacilles. Courts et larges, ressemblant à des coques	Isolés ou en paires		Genre <i>Brucella</i> Genre <i>Pasteurella</i>
Incurvés	Forme de virgule	Le plus souvent Isolés		Genre <i>Vibrio</i>
Spirilles	hélices rigides en spirale	Souvent en chaînettes		Genre <i>Spirulina</i> Genre <i>Rhodospirillum</i>
Spirochètes	hélices flexibles	Isolés		Genre <i>Treponema</i> Genre <i>Borrelia</i>
Filamenteuses	réseau de longs filaments (Mycélium)	Ramifié ou non ramifié (souvent en chaînettes)		Genre <i>Streptomyces</i>
Pléomorphes	Change de forme	Isolés		Genre <i>Haemophilus</i> Genre <i>Mycoplasma</i>
Pédunculées	Pédicule à grande capacité adhésive due aux polysaccharides	Isolés		Genre <i>Caulobacter</i>

IV- Structure cellulaire d'une bactérie :

Une cellule bactérienne est composée d'éléments constants qu'on retrouve chez la quasi-majorité des bactéries. Ces éléments de nombre cinq (5), sont de l'intérieure à l'extérieure ; un **chromosome** circulaire et des **ribosomes** qui baignent dans le **cytoplasme**, l'ensemble est entouré par une **membrane cytoplasmique**, elle même, entourée par une **paroi bactérienne**. Cependant, d'autres éléments de structure peuvent être retrouvés chez certaines bactéries mais pas chez d'autres, appelés "éléments inconstants". Parmi ces structures, on cite; la capsule qui entoure la paroi bactérienne, les plasmides, les pilis sexuel, les fimbriae, les flagelles, les spores et les corps d'inclusions (Figure 7). Le rôle et la composition chimique de chaque structure seront développés dans ce présent chapitre.

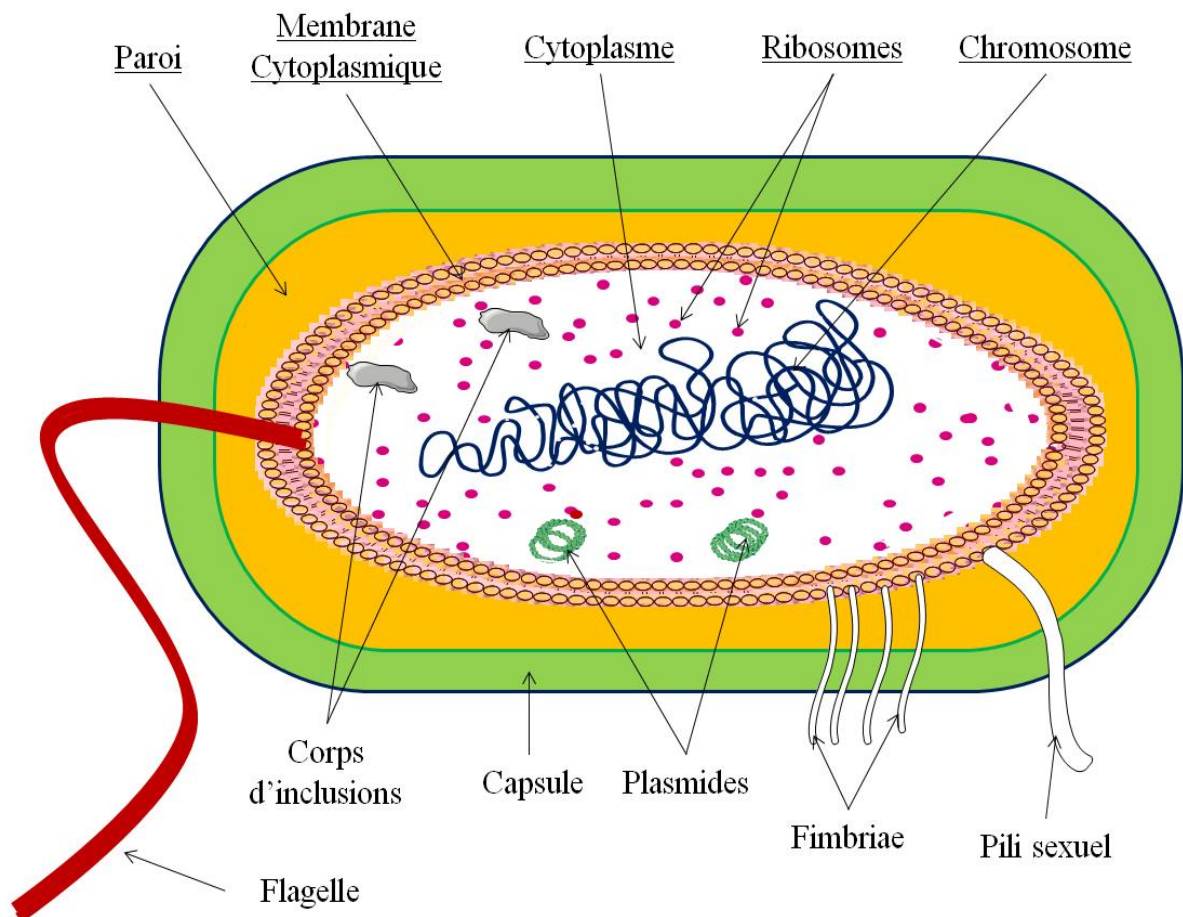


Figure 7 : Schéma simplifié d'une cellule bactérienne. Les structures soulignées représentent les éléments constants.

IV-1- La paroi bactérienne

La paroi bactérienne est un élément constant présent chez la plupart des bactéries. C'est un élément de structure **rigide** situé à l'extérieur de la membrane plasmique. Elle est simple de conception et à la fois sophistiquée et complexe dans son assemblage. Cette structure est si indispensable qu'elle est historiquement une cible privilégiée des thérapies antibactériennes (Betalactamines, fosfomycine, vanvomyicine, bacitracine...etc.)

IV-1-1- Composition chimique

Plusieurs éléments constituent la paroi bactérienne. Selon la nature chimiques, les composants suivants sont fréquemment retrouvés ; peptidoglycane, acides téichoïques et acides lipotéichoïques, lipopolysaccharides, protéines, lipides et lipoprotéines. La composition de la paroi n'est pas constante chez toutes les bactéries. En effet, dans le domaine des *Bacteria*, il existe deux types de parois que l'on rencontre chez les bactéries dites "à Gram positif" et les bactéries dites "à Gram négatif". Ces différences de structure bien visibles en microscopie électronique à transmission sont à la base de la coloration de Gram. Dans cette partie, la structure de la paroi des bactéries Gram(+) et Gram(-) seront développées séparément. Concernant les constituants de la paroi, la structure du peptidoglycane sera élucidée en premier car il s'agit d'un élément commun présent dans les deux types de paroi, puis les autres structures seront traitées selon leur présence dans le type de la paroi étudiée.

La structure du peptidoglycane

Le peptidoglycane, constituant clé de la paroi, est assez rigide pour fournir une intégrité physique à la cellule mais aussi suffisamment flexible pour permettre son expansion (Höltje, 1998). Brièvement, le peptidoglycane (appelé également mureine ou mucopeptide) est une structure macromoléculaire continue dont les principaux composants sont des chaînes linéaires de glycanes, reliées entre elles par des petites chaînes peptidiques. Ces unités répétées de glycanes sont composées de l'alternance d'unités de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). Toutes les liaisons entre les sucres sont de type β 1-4. Le groupement carboxyle de chaque NAM est substitué par une sous-unité peptidique de cinq résidus d'acides aminés (ex : L-Ala- γ -D-Glu- mDAP-D-Ala-D-Ala) (figure 9). Il est à noter que le dernier acide aminé de la chaîne est enlevé en fur et à mesure de l'élongation de la chaîne du peptidoglycane. Les trois acides aminés ; l'acide D-glutamique (D-Glu), la D-alaline (D-Ala) et l'acide méso-diaminopimélique (DAP), ne sont pas présents dans les protéines. Donc, ces acides aminés de la série D empêchent la dégradation par la plupart des peptidases qui reconnaissent que les isomères de la série L. La

synthèse du peptidoglycane nécessite plus de trente enzymes et a lieu dans différents compartiments de la cellule bactérienne (cytoplasme, membrane et paroi). Les chaînes de peptidoglycane voisines sont interconnectées (entre le 3^{ème} acide aminé d'une chaîne et le 4^{ème} acide aminé d'une autre chaîne voisine) soit par une liaison peptidique directe, soit par une courte chaîne d'acides aminés entre deux sous-unités peptidiques (ex : Gly-Gly-Gly-Gly-Gly). Bien que la composition des peptides puisse varier d'une espèce à l'autre, la composition du squelette carbohydrate est généralement considérée comme étant constante (figure 9).

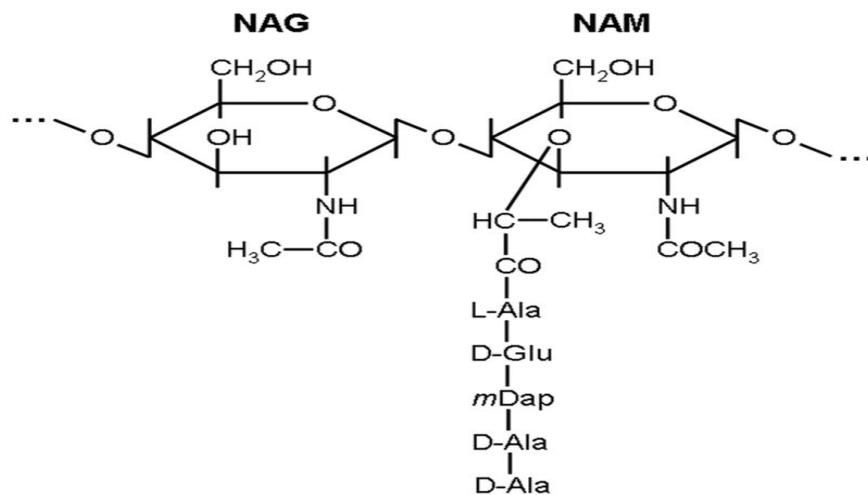


Figure 8: La composition des sous-unités du peptidoglycane chez *Salmonella* (Roujeinikova, 2008). NAG: N-acétylglucosamine, NAM : acide N-acétylmuramique, L-Ala: L-alanine, D-Glu: acide D-glutamique, mDAP: acide méso-diaminopimélique, D-Ala: D-alanine.

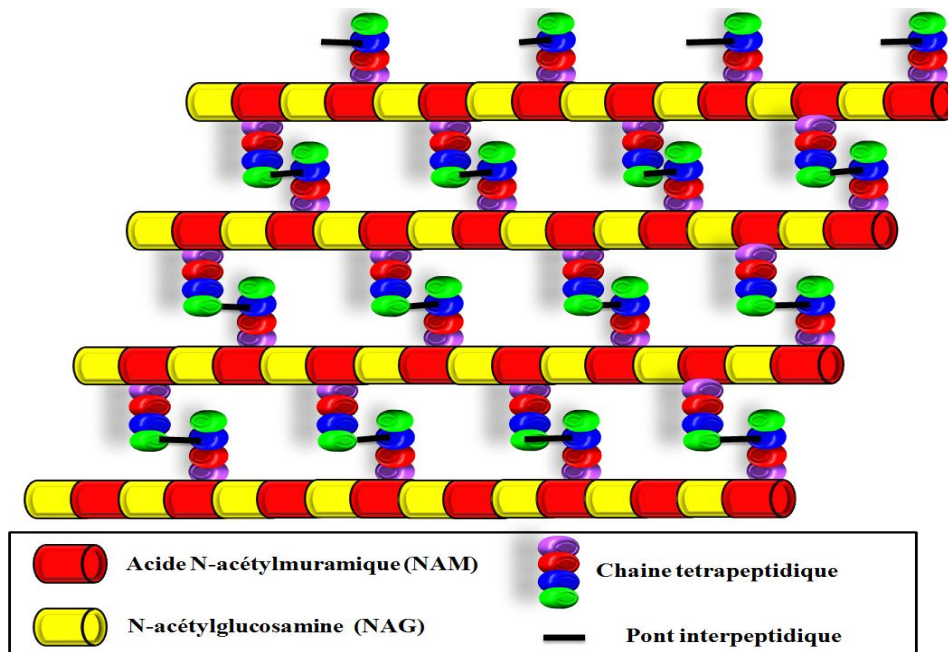


Figure 9 : Schéma simplifié de la structure du peptidoglycane.

IV-1-2- Les parois des bactéries Gram-positives

La plupart des bactéries à Gram positif présente une paroi épaisse constituée principalement de peptidoglycane (jusqu'à 80nm). De plus, elles contiennent généralement une grande quantité de polymères secondaires dont les acides téichoïques et les acides lipotéichoïques, et peuvent contenir également des protéines pariétales (ex: adhésines, couche S...etc.) (Figure 10). L'espace périplasmique, situé entre la membrane cytoplasmique et la paroi, est petit par rapport à celui des bactéries Gram-négatives et peu de protéines sont retrouvées fixées au coté extérieur de la membrane cytoplasmique. Il est admis que la plupart des protéines secrétées par les cellules traverse habituellement le peptidoglycane. Ces dernières sont considérées comme des exo-enzymes, car elles servent souvent à dégrader les substrats nutritifs trop grands pour être transportés à travers la membrane cytoplasmique.

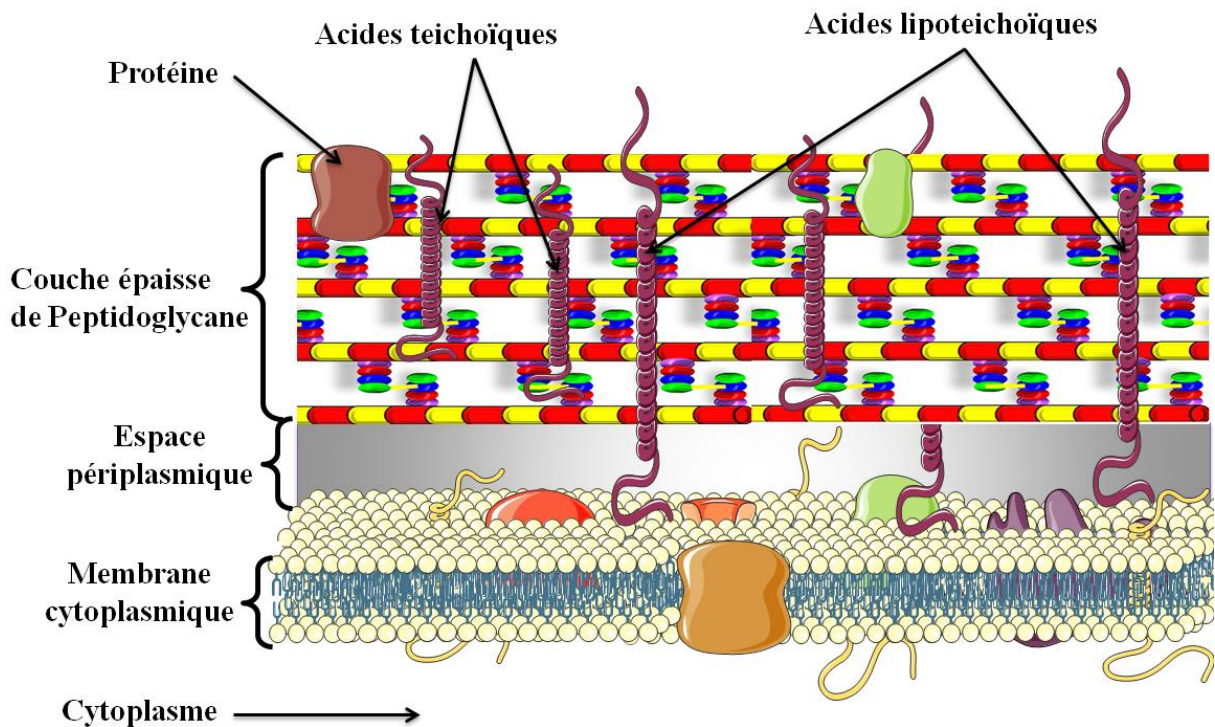


Figure 10: Représentation de la paroi des bactéries Gram-positives.

La structure des acides téichoïques et les acides lipotéichoïques

Les acides téichoïques (AT) et les acides lipotéichoïques (ALT) sont formés d'un squelette d'alditol (glycérol ou ribitol) connecté par des liaisons phosphates et sont reliés aux résidus N-acétylmuramique du peptidoglycane (AT) ou à la membrane plasmique (ALT).

D'autres molécules comme le glucose ou le D-alanine, peuvent se lier aux résidus de glycérol ou de ribitol (Figure 11)

Les AT et ALT sont considérés comme des éléments importants qui stabilisent davantage la structure de la paroi bactérienne. Par ailleurs, plusieurs fonctions ont été attribuées aux AT et ALT notamment leur implication dans la pathogénicité. Ces acides téichoïques contribuent à la résistance aux peptides antimicrobiens, la formation de biofilms, l'adhésion aux cellules eucaryotes et stimulent l'inflammation par exposition des cellules au complément (Fabretti *et al.*, 2006; Jett *et al.*, 1994).

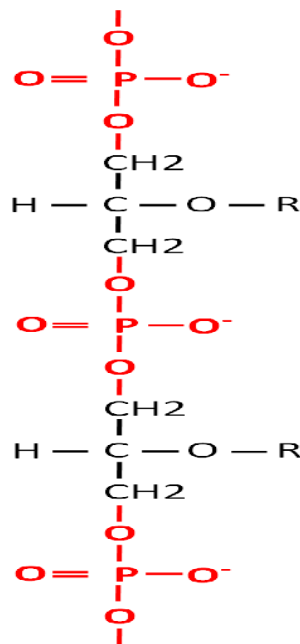


Figure 11: La structure d'un acide téichoïque. Un segment d'acide téichoïque comprenant des glycérols reliés par des molécules de phosphate. La chaîne R peut être du glucose ou de D-alanine.

Exemples de bactéries à Gram positif

Beaucoup de bactéries forment le groupe des bactéries à Gram positif à l'instar des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*....ect.

IV-1-3- Les parois des bactéries Gram-négatives

La paroi des bactéries Gram-négatives est plus complexe que celle des bactéries Gram-positives. Elle est composée d'une mince couche de peptidoglycane qui ne représente pas plus

de 10% du poids total de la paroi avec une épaisseur d'environ 2 nm chez certaine espèce comme *Escherichia coli* (Prescott *et al.*, 2013).

La particularité de la paroi des bactéries Gram-négatives est qu'elle est entourée par une membrane externe en plus de sa membrane cytoplasmique. Entre les deux membranes s'intercale le peptidoglycane qui est, lui même, attaché à la membrane externe grâce aux lipoprotéines (lipoprotéines de Braun). L'espace périplasmique est différent de celui des bactéries à Gram+, il couvre tout l'espace entre les deux membranes (Figure 12) et peut atteindre 71 nm voire 20 à 40% du volume cellulaire total (Prescott *et al.*, 2013). Cet espace contient des enzymes qui participent à la nutrition (hydrolases) et des protéines qui sont impliquées dans le transport de molécules à l'intérieur de la cellule.

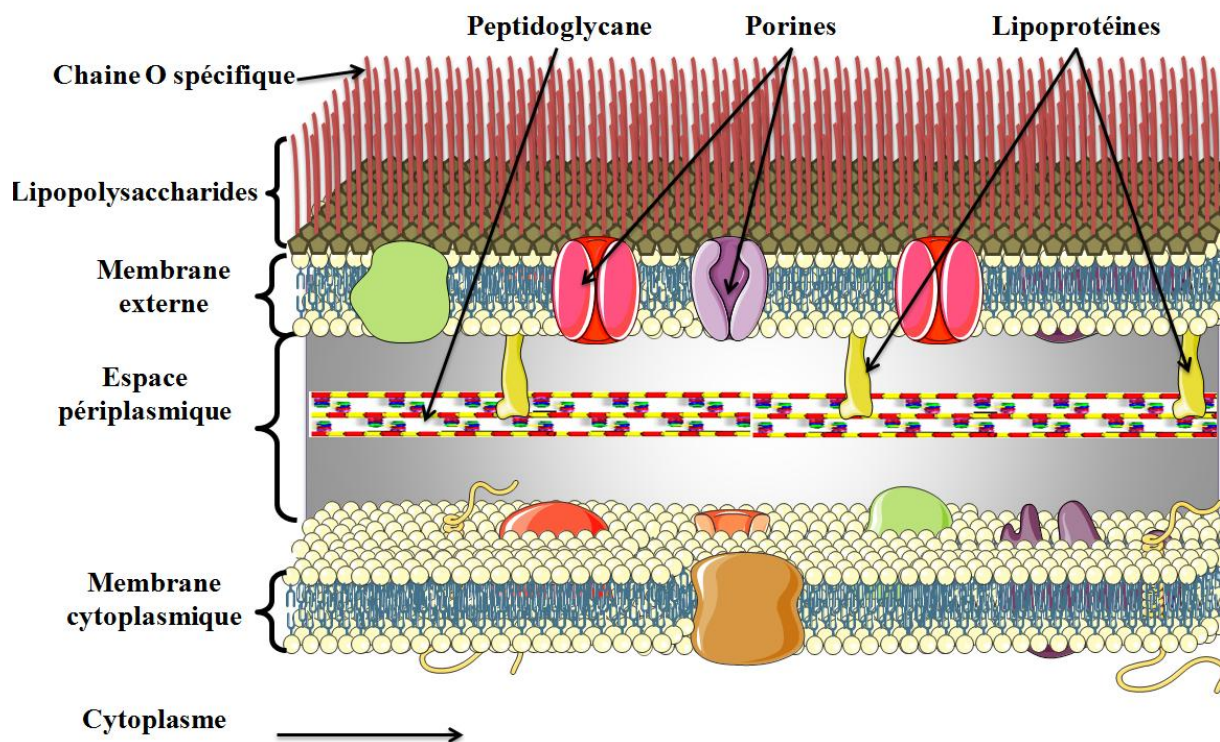


Figure 12: Représentation de la paroi des bactéries Gram-négatives.

La membrane externe est une double couche de phospholipides qui renferme plusieurs protéines et des lipopolysaccharides (LPS) (Figure 12). Ces dernières (LPS), sont de grandes molécules composées de trois parties; le *lipide A* enfoui dans la membrane externe, le *polysaccharide central* composé de glucides (10 glucides chez *Salmonella*) et la chaîne latérale O à l'extrémité appelée également *l'antigène O* qui est une courte chaîne de polysaccharides

particuliers dont la composition varie selon les espèces (spécifiques). Les LPS jouent plusieurs rôles. En effet, ils contribuent à la charge négative de la surface externe de la bactérie, il peut faciliter l'adhésion de la bactérie à des surfaces, il participe à la sélectivité de la membrane externe en empêchant la perméabilité de certaines molécules et enfin, il suscite une réponse immunitaire chez l'hôte *via* l'antigène O et agit également comme une endotoxine à cause de la toxicité du lipide A.

La perméabilité de la membrane externe est plus importante par rapport à celle de la membrane cytoplasmique et ce malgré le rôle des LPS dans l'imperméabilité de certaines molécules. Ceci est dû à la présence de protéines spéciales de forme d'un tube appelées "porines". Ces porines de caractère aqueux laissent rentrer des petites molécules inférieures à 600 daltons. Cependant, les plus grosses molécules traversent la membrane externe par les transporteurs spécifiques (ex : vitamine B12)

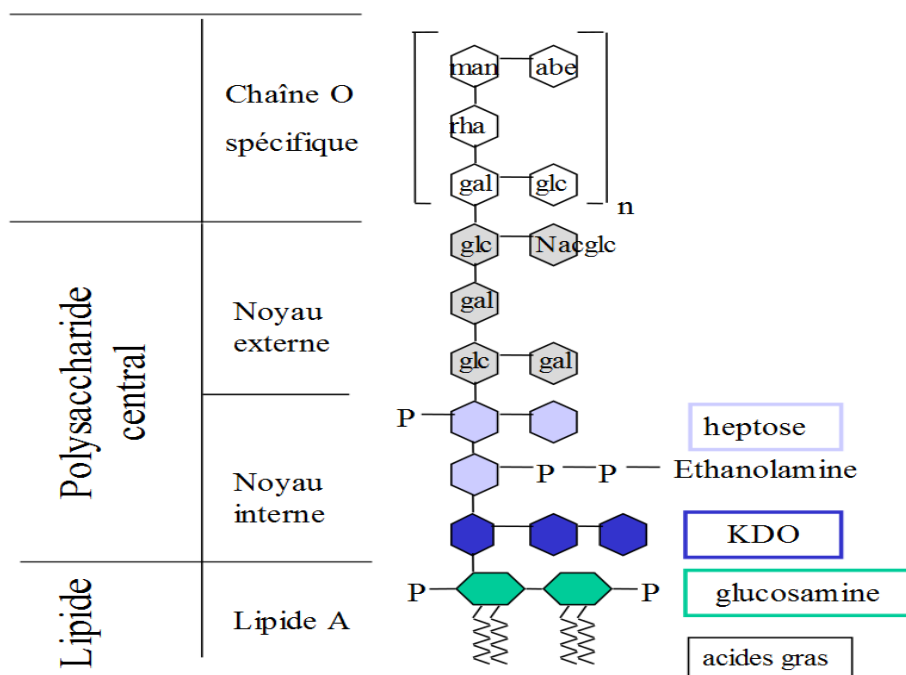


Figure 13: La structure de lipopolysaccharides (Julio, 2015)

Exemples de bactéries à Gram négatif

Beaucoup de bactéries forment le groupe des bactéries à Gram positif à l'instar des genres *Escherichia*, *Proteus*, *Klebseilla*, *Peudomonas*, *Aeromonas*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Neisseria*, *Rhizobium*, *Bordetella*....etc.

IV-1-4- Coloration de Gram

En 1884, le bactériologiste danois Hans Christian Gram a mis au point le protocole de la coloration de Gram. C'est une coloration différentielle qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne.



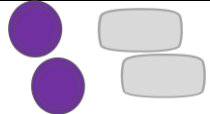
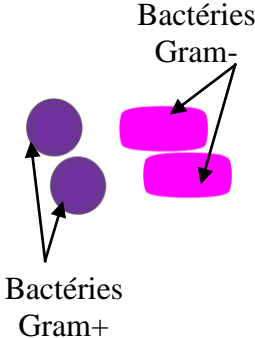
La coloration de GRAM est la base de la taxonomie bactérienne (Bergey & Holt, 2000); elle a permis de diviser les bactéries en deux groupes distincts à savoir; les bactéries à Gram positif, caractérisées par une paroi très riche en peptidoglycane (couche épaisse) et en acide teichoïques et lipoteichoïques (ce qui empêche la pénétration des solvants organiques tel que l'alcool et l'acétone), et les bactéries à Gram négatif, caractérisées par une paroi très riche en lipides et lipopolysaccharides grâce à la présence d'une membrane externe. Cependant, la couche du peptidoglycane est beaucoup moins importante par rapport aux bactéries Gram positives. Ce qui permet la pénétration des solvants organiques.

La méthodologie de la coloration de GRAM qui est rapide et précise, consiste à l'application, sur un frottis fixé, de deux colorants basiques séparés par une étape de décoloration (Tableau IV). Tout d'abord, recouvrir un frottis fixé avec le violet de gentiane ou avec le crystal violet. Puis, le lugol sera appliqué afin de fixer la première coloration. Ensuite, l'étape la plus importante qui distingue les deux types de parois (Gram+ et Gram-) est la décoloration à l'éthanol ou l'acétone (ou le mélange éthanol/acétone). Enfin, une contre coloration avec de la fuschine qui va colorer uniquement les bactéries décolorées avec de l'éthanol (Bactéries Gram-) qui vont apparaitre en rose. En effet, les bactéries non décolorées par l'éthanol (bactéries à Gram+) gardent toujours leur première coloration et paraissent alors en violet.

Il est à noter qu'un rinçage à l'eau est nécessaire après chaque étape pour enlever l'excès de colorant et une décoloration massive (long) peut entraîner la décoloration de certaines bactéries à Gram+.

NB : L'utilisation de bactéries vieilles (âgées) peut fausser le type de Gram de certaines bactéries Gram+ qui peuvent paraître en rose à cause de vieillissement de la paroi bactérienne.

Tableau IV: Illustration des étapes de la coloration de GRAM.

Étape	Observation	Résultats	Interprétation
Recouvrir le frottis préalablement fixé avec le violet de gentiane et laisser agir 1mn puis rincer à l'eau		Toutes les bactéries sont colorées en violet	violet de gentiane est un colorant basique qui colore toutes les structures chargées négativement
Appliquer le lugol et laisser agir 1mn puis rincer à l'eau		Toutes les bactéries restent colorées en violet	Le lugol est un fixateur et mordant de la première coloration.
Décoloration à l' éthanol pendant 20s puis rincer à l'eau		Les bactéries à Gram positif restent colorées en violet mais les bactéries à Gram négatif sont décolorées	A l'inverse des bactéries Gram-, La paroi des bactéries Gram+ sont imperméables aux solvants organiques.
Contre coloration avec de la fuschine puis rincer à l'eau		Les bactéries à Gram positif sont colorées en violet et les bactéries à Gram négatif sont colorées en rose.	Les bactéries à Gram- prennent la coloration de la fuschine (vu qu'elles étaient incolores), alors que les bactéries à Gram+ gardent toujours la première coloration.

IV-1-5- Cas de parois particulières

Les parois bactériennes ne sont pas toutes identiques à celles des bactéries Gram+ et des Gram- conventionnelles. Car certaines bactéries présentent des parois particulières voire même absentes. Chez les *Mycoplasmes*, la paroi bactérienne est absente. De ce fait, ils sont insensibles aux antibiotiques ciblant la paroi bactérienne. Vu l'absence de paroi, les mycoplasmes ont tendance à être pléomorphes.

Le genre *Chlamydia* par exemple, qui fait partie des bactéries à Gram-, le peptidoglycane est inexistant. Ce sont des parasites intracellulaires obligatoires. Chez l'homme,

Chlamydia trachomatis est responsable de l'urétrite (maladie sexuelle transmissible) et de la cécité évitable (trachome) (Prescott *et al.*, 2013).

Le genre *Mycobacterium* dont l'espèce *Mycobacterium tuberculosis* fait partie de ce groupe de bactérie Gram+, cependant en plus de peptidoglycane, leur paroi est très riche en acides mycoliques (lipide de la classe des cirides) qui résulte d'une estérification entre un acide gras long avec un alcool long). Ces bactéries sont dites "acido-alcool-résistantes" et elles sont mises en évidence par la coloration de Zielh Nielsen.

Parmi les parois anormales des bactéries; les protoplastes et les sphéroplastes. Ces deux appellations désignent respectivement des bactéries à Gram + et à Gram - ayant un peptidoglycane dégradé par un agent comme le lysozyme.

Les archéobactéries représentent un domaine à part très différent de celui des bactéries. Ces Archaea ne présentent pas de peptidoglycane habituel, mais certaines possèdent une pseudomureine composée de N-acétyl-alosaminuronique à la place de l'acide N-acétylmuramique (NAM).

IV-1-6- Fonctions

Afin de mettre en évidence les rôles de la paroi bactérienne, l'expérience au lysozyme a été utilisée. Le lysozyme clive les liaisons β (1-4) glycosidiques entre le NAG et le NAM. Il en résulte une destruction totale du peptidoglycane chez les bactéries Gram(+), et une fragmentation de celui-ci chez les Gram(-) car le peptidoglycane est moins accessible à cause de la membrane externe (Figure 14).

L'expérience démontre que l'hydrolyse du peptidoglycane par le lysozyme rend la bactérie sensible à la pression osmotique. Donc la mise en suspension de ces bactéries dans un milieu hypotonique engendre une lyse cellulaire. Cette sensibilité n'est pas retrouvée chez les bactéries ayant un peptidoglycane intact. Cependant, la mise en suspension des bactéries (Gram + et Gram -) ayant un peptidoglycane dégradé dans un milieu isotonique permet la formation des protoplastes (à partir des bactéries à Gram +) et des sphéroplastes (à partir des bactéries à Gram-).

Les protoplastes ne gardent plus les propriétés antigéniques de la bactérie, ne se divisent plus, ne fixent plus les bactériophages et sont immobiles. Alors que les sphéroplastes conservent toutes les propriétés initiales de la bactérie.

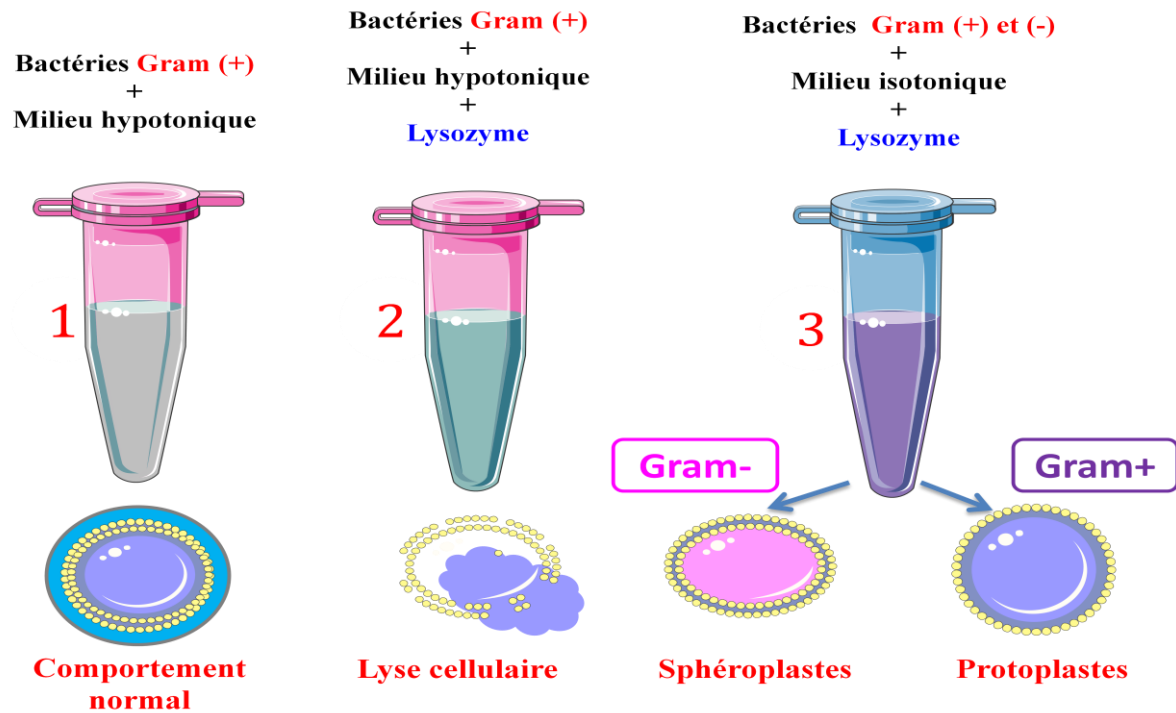


Figure 14: Formation de protoplastes et de sphéroplastes.

A partir de cette expérience, les rôles de la paroi bactérienne sont déduits. Grâce à la paroi, la bactérie peut résister à la pression de turgescence exercée par le cytoplasme bactérien (une pression d'environ 2 barres), ainsi qu'à diverses agressions du milieu environnemental. De plus, elle fournit la forme et la structure caractéristique à la cellule grâce à la rigidité et l'élasticité du peptidoglycane. D'autres rôles sont également attribués à la paroi, par exemple, elle permet la fixation des bactériophages, elle participe à la mobilité du fait qu'une bonne partie du flagelle est maintenue par la paroi, Elle joue un rôle de barrière à perméabilité sélective et enfin contribue à la toxicité. En effet, chez les bactéries à Gram -, le LPS est une endotoxine qui peut donner des fièvres et lésions.

IV-2- La membrane plasmique

La membrane plasmique (ou cytoplasmique) est un élément de structure fluide qui entoure le cytoplasme et se situe sous la paroi bactérienne. Généralement, c'est une couche fine de 7.5 à 8 nm d'épaisseur, organisée, asymétrique, flexible et dynamique. Plusieurs antibiotiques ciblent la membrane cytoplasmique de bactéries telles que les polymyxines et polypeptides antimicrobiens.

IV-2-1- Structure et composition chimique

Au microscope électronique, les membranes cytoplasmiques des bactéries apparaissent en triple feuillet; deux feuillets denses limitant une couche claire. De point de vu moléculaire, la membrane cytoplasmique bactérienne (Figure 15) est principalement constituée de lipides (de 30 à 40%) et de protéines (de 60 à 70%). Les glucides sont quantitativement des constituants mineurs et souvent associés aux lipides (glycolipides) ou aux protéines (glycoprotéines).

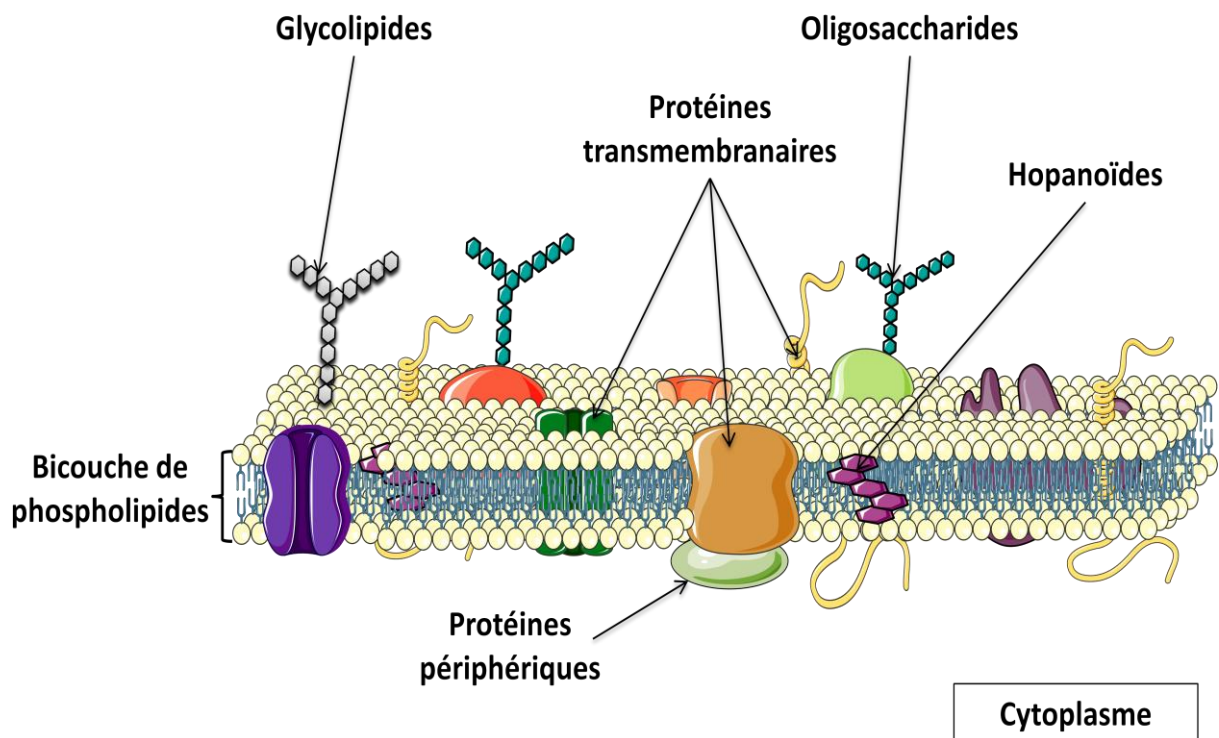


Figure 15: La structure de la membrane cytoplasmique bactérienne (modèle en mosaïque fluide).

Les lipides membranaires de bactéries

La fraction lipidique représente de 30 à 40% des molécules totale de la membrane. La nature chimique des lipides membranaires est essentielle pour qu'il soit capable de former une bicouche lipidique. La pluparts de ces lipides (ex : les phospholipides), présente une structure asymétrique avec deux extrémités à savoir une extrémité polaire qui interagissent avec de l'eau (hydrophile) et une autre non polaire (hydrophobe) (Figure 16).

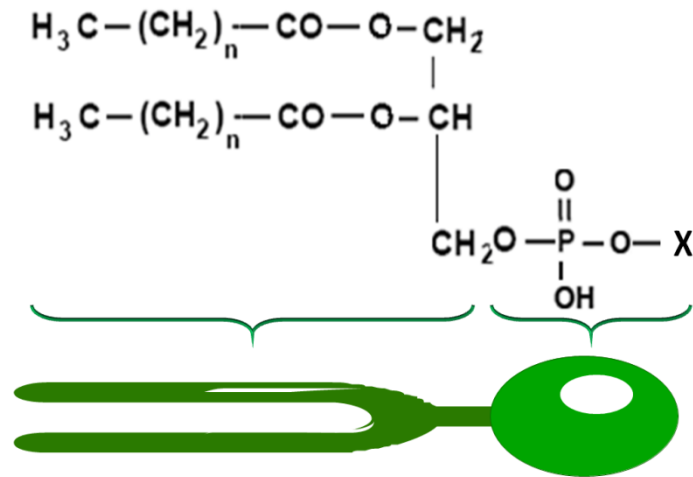


Figure 16: Structure des phospholipides membranaires.

Les phospholipides sont des molécules classées parmi les lipides complexes. Ils sont tous formés d'un acide phosphatidique qui renferme deux acides gras liés au carbone 1 et 2 du glycérol par des liaisons ester (ce qui forme la queue hydrophobe), et d'un acide phosphorique lié au carbone 3 avec le même type de liaison (ce qui représente le pôle hydrophile). D'autres molécules viennent se lier à l'acide phosphorique (le X montré sur la Figure 16) comme l'éthanolamine, la choline, la sérine l'inositol ou glycérol. A noter que le phosphatidyl-éthanolamine est le plus retrouvé dans les membranes bactériennes. Les phospholipides sont dits **amphipatiques** vu le caractère polaire est non polaire que présente chaque molécule.

La composition lipidique des membranes cytoplasmiques bactériennes varie selon la température du milieu du sorte qu'elle reste toujours fluide, c'est à dire, les bactéries qui se développent à basse température possèdent plus d'acides gras insaturés dans les phospholipides (car il présente un faible point de fusion). A l'inverse, aux températures élevées, il y a plus d'acide gras saturés dans les phospholipides (Prescott *et al.*, 2013).

A la différence des eucaryotes, les stérols (notamment le cholestérol) qui stabilisent la structure des membranes cytoplasmiques sont absents chez les procaryotes. Ce rôle est probablement assuré par des lipides appelées; **les hopanoïdes** tel que le bactériohopanetétrol.

Les protéines membranaires

Les protéines membranaires sont les molécules majoritaires de la membrane (60% à 70%). On distingue deux types de protéines membranaires à savoir; les **protéines**

périphériques (20% à 30% des protéines totales) qui sont associées avec des liaisons faibles à la membrane avec un caractère polaire (solubles dans l'eau), et les **protéines transmembranaires** (intrinsèques) qui présentent un caractère amphipatique. En effet, les régions hydrophobes sont enfouies dans la bicouche lipidique alors que les régions hydrophiles s'associent pour former des canaux. Ces régions polaires peuvent être également exposées sur les deux surfaces de la membrane (interne et externe), sur lesquelles des glucides sont souvent griffés sur la surface extérieure (Figure 15). Les protéines membranaires sont essentiellement des enzymes et des transporteurs tels que les enzymes de la chaîne respiratoire, les enzymes impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane, les perméases...etc.

IV-2-2- Fonctions

La membrane cytoplasmique sépare le cytoplasme de son environnement. Par conséquent, une déchirure de la membrane provoque une fuite du contenu cellulaire et ainsi la mort de la cellule. En plus de ce rôle protecteur, la membrane constitue une barrière perméable qui permet sélectivement l'entrée des nutriments, de l'eau et la sortie des déchets du métabolisme et beaucoup d'autres molécules. Donc, elle est responsable des échanges cellulaires grâce aux transports membranaires.

Le déplacement de l'eau à travers la membrane se fait par un phénomène physique appelé l'**osmose** par lequel l'eau se déplace du milieu moins concentré au milieu plus concentré. La molécule d'eau, vu sa petite taille, peut traverser la membrane bien que son passage soit facilité par des protéines spécifiques appelées aquaporines.

Concernant les nutriments (sucres, acides aminés, sels, nucléotides, vitamines etc.), le passage des molécules s'effectue par deux types de transport à savoir; le transport passif et le transport actif.

Le transport passif s'effectue dans le même sens du gradient de concentration et ne nécessite pas d'énergie. Les modalités de transfert par le transport passif impliquent le phénomène de diffusion soit d'une façon directe à travers la bicouche lipidique si la molécule transportée est hydrophobe et non chargée, soit une diffusion facilitée par un transporteur membranaire de nature protéique (Figure 17).

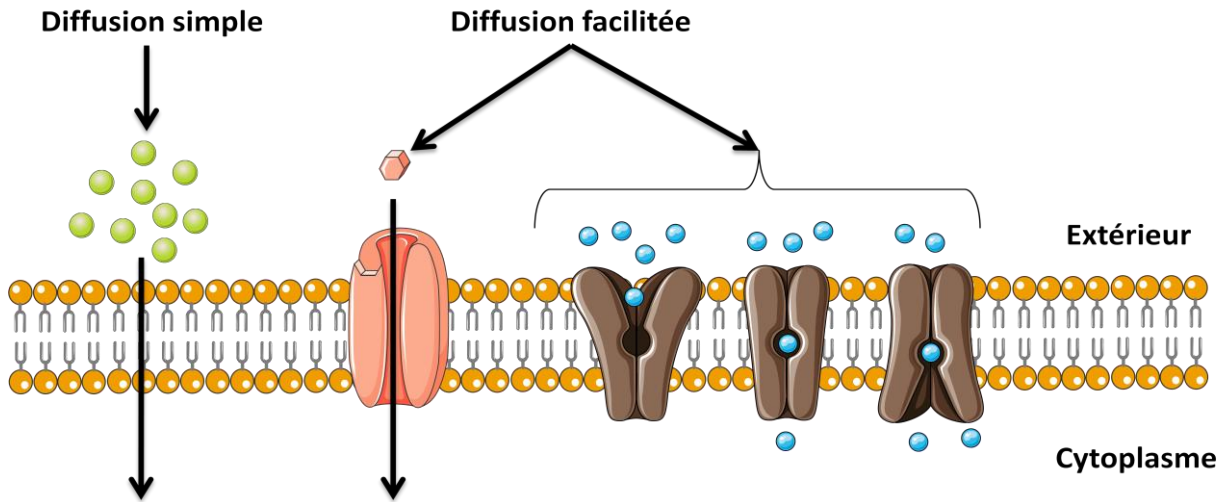


Figure 17 : Modalités de transport membranaire passif

Le transport actif s'effectue contre le sens du gradient de concentration et nécessite de l'énergie. Les modalités de transfert par impliquent trois systèmes de transport. Le transport simple, la translocation de groupe et le système ABC. Le transporteur simple requiert uniquement une protéine transmembranaire, alors que la translocation de groupe implique une série de protéines lors du transport. Quant au système ABC, il implique une protéine liant le substrat, un transporteur et une protéine hydrolysant l'ATP (Figure 18). L'ensemble de ces trois systèmes nécessite de l'énergie sous forme d'ATP, de force proton-motrice ou d'autres composés riches en énergie (Madigane & Martinko, 2007; Prieur *et al.*, 2011).

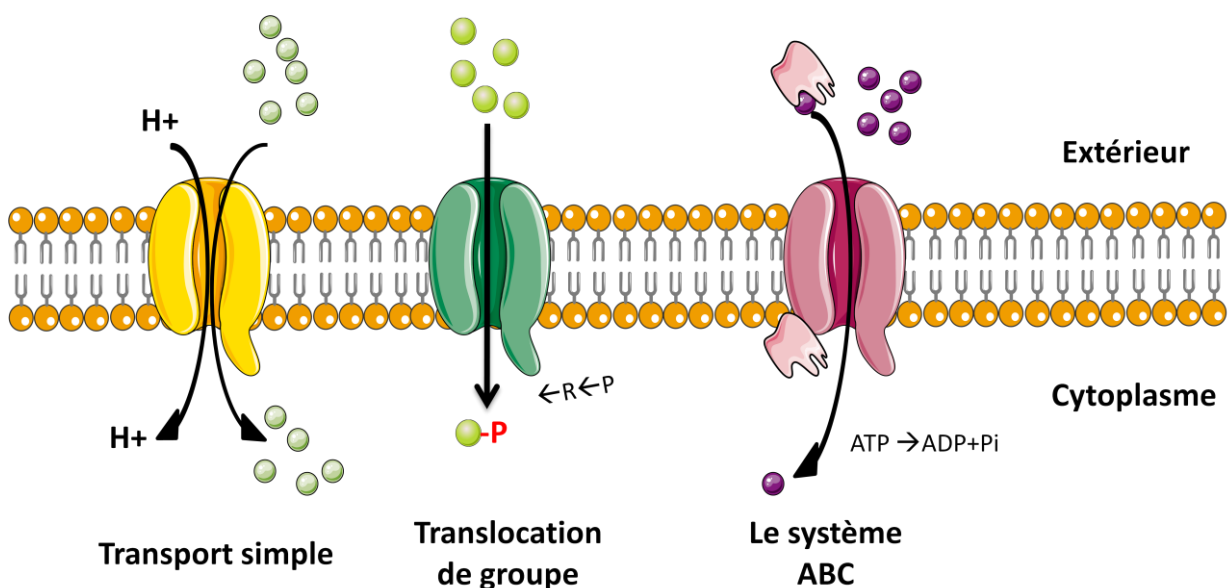


Figure 18 : Les trois systèmes de transport membranaire

Ces trois systèmes font intervenir des transporteurs protéiques regroupés en trois classes (Figure 19) : les uniports transportent une seule molécule dans une seule direction. Les antiports assurent le transfert de deux molécules différentes dans deux sens inverses. Les symports transportent deux molécules au même temps dans le même sens (Madigane & Martinko, 2007; Prieur *et al.*, 2011)

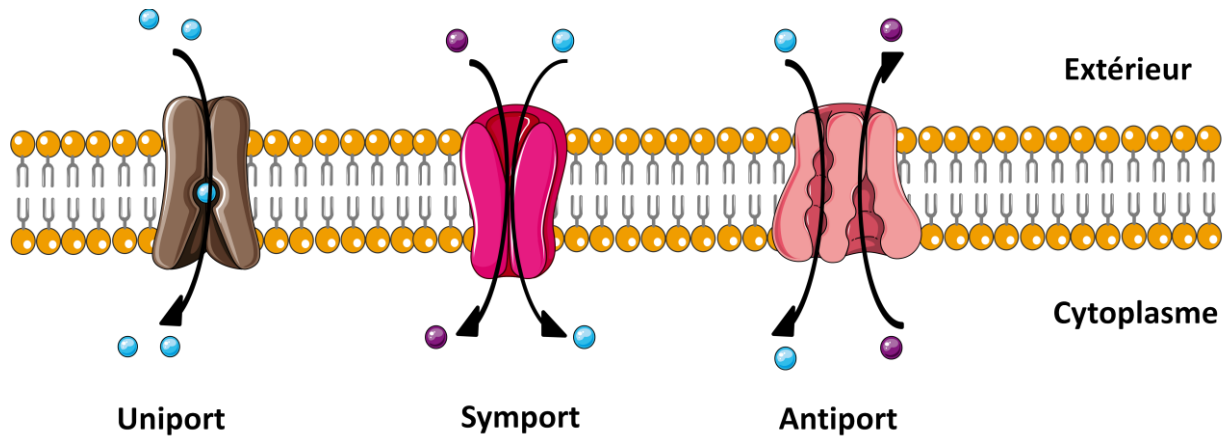


Figure 19 : Les trois classes de transporteurs membranaires.

Chez la bactérie *Escherichia coli*, le lactose est transporté selon le système du transport simple via une protéine symport appelée perméase lac qui transporte le lactose et l'ion H⁺ simultanément dans le même sens contre le gradient de concentration. Dans le cas de la translocation de groupe, la molécule est chimiquement modifiée au cours du transfert. Par exemple, le transfert des sucres tels que le glucose chez *E. coli* implique cinq protéines qui transportent de groupement phosphate du phosphoénolpyruvate jusqu'au glucose.

Le système ABC (*ATP-binding cassette* ou cassette de liaison à l'ATP) est principalement retrouvé chez les bactéries à Gram négatif qui possèdent un espace périplasmique entre les deux membranes (cytoplasmiques et externe). La protéine périplasmique se lie au substrat à transporter et traverse le transporteur transmembranaire puis, une autre protéine hydrolysant l'ATP en ADP et Pi fournit l'énergie de transport. Ce système est utilisé pour transporter certains sucres, des acides aminés, les phosphates, les sulfates ou les métaux lourds chez les bactéries à Gram négatif.

Les rôles de la membrane cytoplasmique bactérienne ne sont pas limités aux échanges cellulaires uniquement. En effet la membrane est impliquée dans la respiration cellulaire, dans la régulation de la division cellulaire et dans la réplication de l'ADN via le mesosome. De plus,

la membrane est le lieu de fixation des flagelles et de l'initiation de leur mouvement. Par ailleurs, elle est la cible de certaines substances telles que les détergents et les antibiotiques.

NB : *Le mesosome* est une invagination de la membrane cytoplasmique de forme vésiculaire, tubulaire ou lamellaire. Cette structure est en étroite liaison avec le matériel nucléaire et joue un rôle dans la division cellulaire et la naissance du septum séparant les deux cellules filles.

IV-3- Le cytoplasme

Le cytoplasme ou le cytosol est un élément constant présent chez toutes les bactéries. Il constitue un hydrogel fluide et aqueux caractérisé généralement d'un pH neutre (7,2). La membrane plasmique délimite ce cytoplasme dans lequel baignent les différents éléments cellulaires (ADN, ribosomes, inclusions, protéines, ions...etc.). Exceptionnellement, le cytoplasme de certaines espèces peut contenir d'autres structures particulières tels que des cristaux (chez *Bacillus thuringiensis*), des protéines "corps R" chez certaines bactéries parasites de protozoaires...etc. Dans cette partie (IV-3), les ribosomes ainsi que les substances de réserves (corps d'inclusion) seront décrits.

IV-3-1- Les ribosomes

Les ribosomes sont de petites granulations sphériques de 10 à 30 nm de diamètre. Ils sont très abondants dans le cytoplasme des bactéries en croissance (plus de 15000 ribosomes/bactérie). De point de vue composition, les ribosomes sont constitués d'ARN (63%) et de protéines (37%) et la cohésion est maintenue en présence d'ions Mg^{++} et d'autres liaisons telles que les liaisons hydrogène, ioniques et hydrophobes (Singleton & Dusart, 1999). Vu la charge négative des ARN et de certaines protéines, les ribosomes fixent les colorants basiques tel que bleu de Méthylène.

Deux sous unités composent le ribosome bactérien à savoir; une grande sous unité 50S et une petite sous unité 30S. Cependant, ils présentent une constante de sédimentation de 70S (Attention! $50S + 30S \neq 80S$). La figure 20 illustre la composition d'un ribosome procaryote (sous-unités, types d'ARNr, nombre de protéines) en comparaison à un ribosome eucaryote.

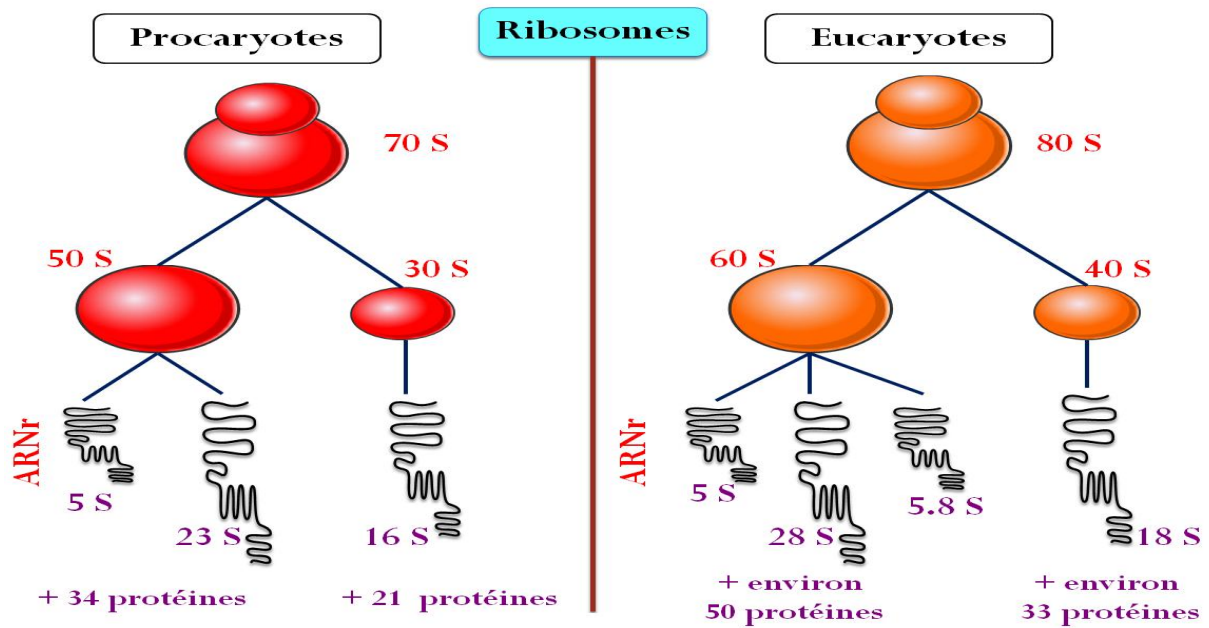


Figure 20: Composition des ribosomes procaryotes vs ribosomes eucaryotes

Rôle des ribosomes

Les ribosomes bactériens jouent un rôle fondamental dans la traduction de l'ARN Messager et la biosynthèse des protéines. Dans la plupart des cas, ils forment un polysome. La petite sous-unité 30S fixe l'ARNm en premier de son extrémité 5', puis la grande sous-unité se fixe en deuxième lieu sur la petite sous-unité pour mettre l'ARNm en "sandwich". La sous-unité 50S comporte deux sites; le site A (aminoacyl) qui accueille les ARNt et le site P (peptidyl) qui accueille la chaîne d'aminoacyl en cours de construction. Les acides aminés s'unissent les uns aux autres par des liaisons peptidiques pour former une protéine. La figure 21 illustre le processus de biosynthèse des protéines par le ribosome bactérien.

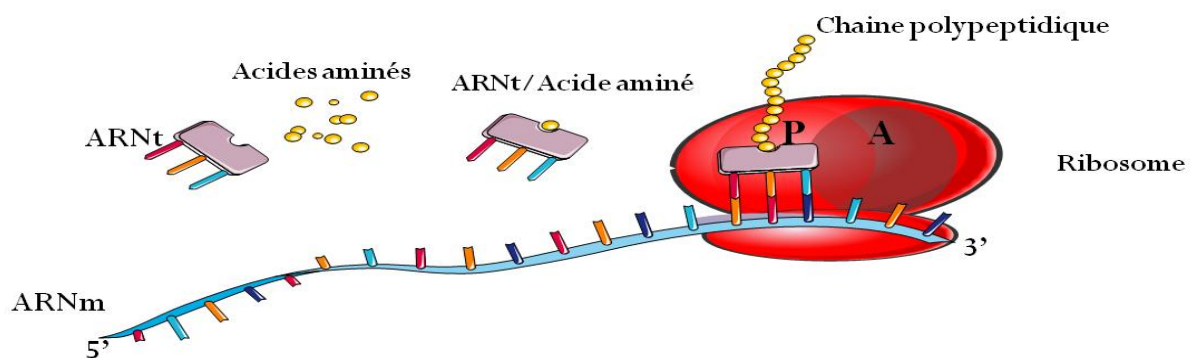


Figure 21 : Processus de biosynthèse des protéines par les ribosomes bactériens

NB : Plusieurs antibiotiques perturbent le fonctionnement des ribosomes tels que les Aminosides, les phénicolés, les tetracyclines, l'acide fusidique, l'oxasolidinole, la rifamycine.

IV-3-2- Les corps d'inclusion et les substances de réserve

Certaines bactéries accumulent au cours de leur croissance des produits de réserve qui forment des granulations, parfois visibles au microscope. Généralement, ces dépôts forment des granules en contact direct avec le cytoplasme, elles ne sont pas limités par une membrane sauf les granules de fer des magnétosomes (Stolz, 1993). Les principales substances de réserve retrouvées sont :

1- Le glycogène (ou l'amidon, moins fréquent): Ce type de réserve est fréquent chez les entérobactéries, les *Clostridium...etc.*

2- β -hydroxybutyrate: C'est un composé qui est utilisé pendant la maturation de la spore. On le rencontre donc en particulier chez les bactéries sporulantes comme *Bacillus megaterium*. Il peut être mis en évidence par des colorants spécifiques des graisses comme le noir Soudan.

3- Polyphosphates inorganiques: Ce sont des polymères linéaires d'orthophosphate. Ils constituent les granulations métachromatiques qui prennent une coloration pourpre en présence de colorants basiques comme le bleu de toluidine (présents chez les corynébactéries).

4- Fer et soufre : Les inclusions de Fer se trouvent chez les sidérobactéries: Le fer peut être sous forme d'hydroxyde de fer ou d'oxyde de fer (bactéries magnétiques pouvant être déplacées dans un champ magnétique). Quant aux inclusions de soufre, elles sont présentes chez les thiobactéries qui tirent leur énergie de l'oxydation de H_2S .

5- Chromatophores et pigments: Le chromatophore des bactéries photosynthétiques joue le rôle de chloroplaste des plantes supérieures. Ils contiennent des pigments photosynthétiques appelés bactériochlorophylles qui assurent la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique.

6- Vacuoles à gaz : Elles sont rencontrées chez les procaryotes photosynthétiques: bactéries pourpres, bactéries vertes, algues bleu-vert. Elles permettent à ces micro-organismes aquatiques de flotter et de remonter à la surface de l'eau.

IV-4- Le chromosome

Le chromosome bactérien est un ADN diffus dans le cytoplasme (non entouré par une membrane nucléaire). Il forme un filament unique d'ADN: circulaire, surenroulé, bicaténaire ayant une taille parfois 1000 fois plus long que la bactérie (ex *E. coli* : $1360 \mu\text{m} = 1,36 \text{ mm}$) et un poids moléculaire d'environ $\text{PM} = 3 \times 10^9$ Daltons pour les bactéries à tailles standards. La condensation et le dépliement de l'ADN bactérien se fait par des protéines spécifiques appelées les topoisomérases I et II respectivement (Figure 22)

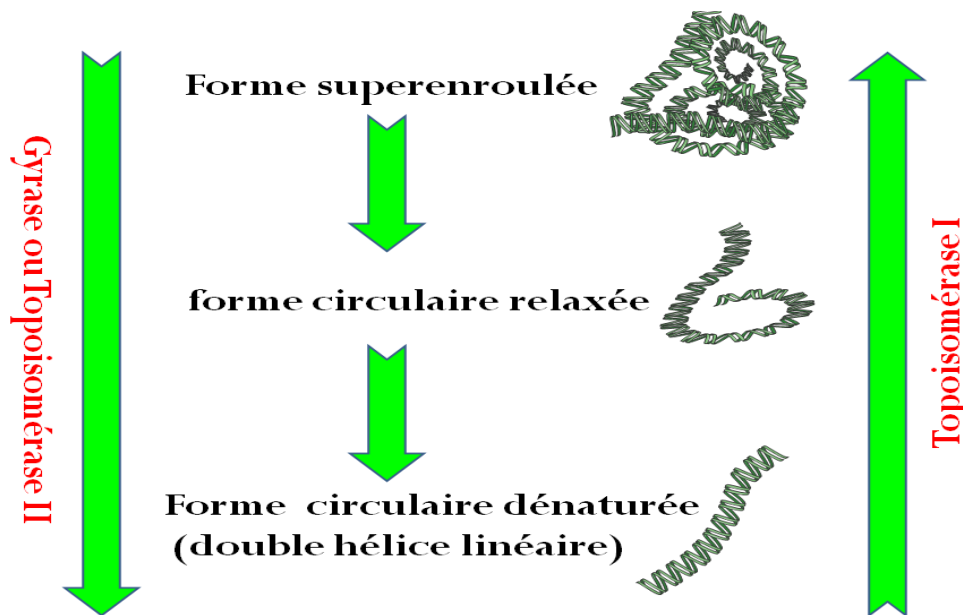


Figure 22 : Le changement de conformation de l'ADN bactérien

Mise en évidence :

L'ADN bactérien peut être mis en évidence par des méthodes cytochimiques en utilisant la réaction de Feulgen de la méthode de Stille et Piekarski (Bactéries + acide chlorhydrique dilué + réactif de Schiff) ou à l'aide de colorants basiques tels que le bleu de méthylène, la fuschine basique...etc.

IV-4-1- Morphologie

La morphologie de l'ADN bactérien diffère d'une bactérie à une autre en fonction de la phase de croissance du stade de la division bactérienne. Chez les formes cocci, il paraît une petite masse sphérique, alors que chez les formes bacilles, il paraît diffus dans le cytoplasme.

IV-4-2- Composition et structure

L'ADN= Acide Désoxyribo Nucléique est composé de deux chaînes complémentaires antiparallèles formée chacune d'un ensemble de nucléotides liés par des liaisons diester. Un Nucléotide est composé d'un phosphate, d'un sucre pentose (désoxyribose) et d'une base purique (A ou G) ou pyrimidique (C, T). La structure des chaînes de nucléotides est stabilisée grâce à des liaisons d'hydrogènes (A avec T et G avec C) pour engendrer une structure en double hélice (Figure 23). Le nombre et l'ordre des nucléotides (CTP, GTP, ATP et TTP) déterminent une séquence d'un gène particulier.

Le rapport de $A+T/ C+G = GC\%$ appelé le coefficient de Chargea. Ce rapport GC% varie selon les espèces mais reste constant chez les souches d'une même espèce (ex: 50% chez *Escherichia coli*, 30 à 40 % chez *Protes*, 25 à 45 % chez les *Clostridie*, 60 à 70% chez les *Pseudomonas*)

NB : Chez les eucaryotes: l'ADN est couplé à des protéines basiques (histones) tandis que chez les procaryotes, l'ADN est neutralisé par d'autres protéines basiques qui jouent un rôle dans la stabilisation de la structure condensée de l'ADN.

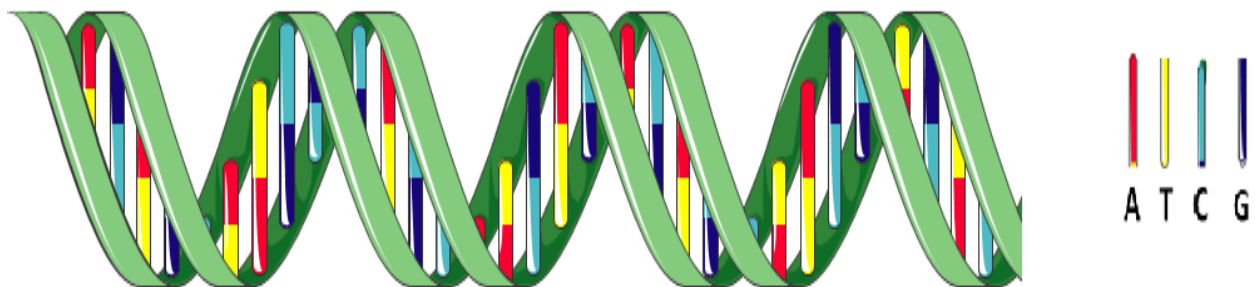


Figure 23: La structure en double hélice de l'ADN

IV-4-3- Réplication

La réplication de l'ADN bactérien se fait selon le mode semi-conservatif (Figure 24). La réplication se déclenche au niveau de l'origine de réplication et passe par trois phases. Tout d'abord, l'étape d'initiation qui se traduit par la reconnaissance de la séquence de l'origine de réplication, la formation du primosome, l'ouverture du double brin et stabilisation des brins,

l'accrochage de l'ADN polymérase et la synthèse d'une amorce ARN par la primase. Par la suite, il ya la phase de l'élongation de la réplication et enfin la phase de la terminaison en utilisant des facteurs protéiques spécifiques appelés respectivement, les facteurs d'élongation et les facteurs de terminaison telle que la protéine Tus (*Terminator Utilisation Substance*)

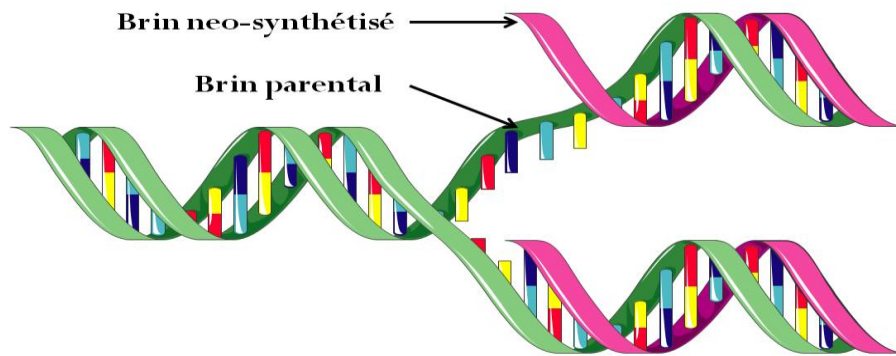


Figure 24 : Le mode semi-conservatif de la réplication d'ADN.

IV-4-4- Rôle :

Le chromosome bactérien est le vecteur des caractères héréditaires. Toute protéine synthétisée qui passe par la voie ribosomale est codée par un gène au niveau de l'ADN. Ce dernier est transcrit en ARNm et traduit en protéine par les ribosomes (Figure 25).

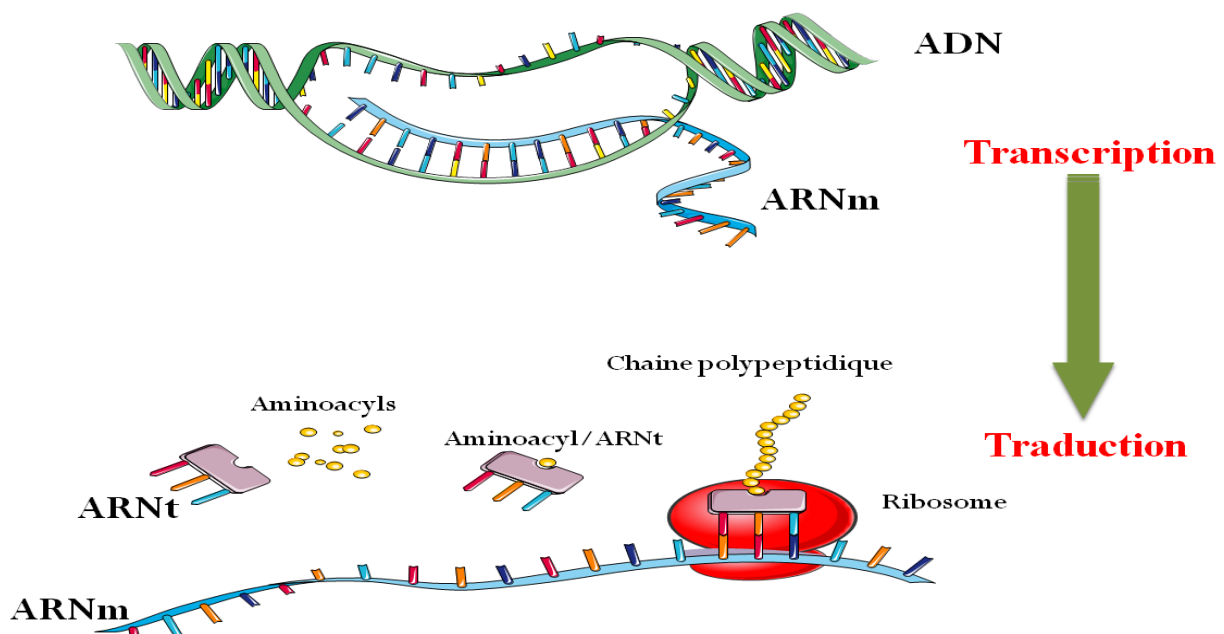


Figure 25 : Rôle de l'ADN dans l'expression des caractères héréditaires.

IV-5- Les plasmides

IV-5-1- Structure et répllication

Le plasmide bactérien est une molécule d'ADN bicaténaire et circulaire et de petite taille (5 à 4000 fois plus petit que le chromosome). Il adopte un enroulement serré (torsadé) afin de préserver l'espace cellulaire. Grâce à son origine de répllication, le plasmide se réplique d'une manière autonome. Par ailleurs, il n'est pas indispensable au métabolisme central de la cellule bactérienne. A noter qu'une bactérie peut posséder plusieurs plasmides différents (s'ils sont compatibles) ou également plusieurs copies d'un même plasmide. Les plasmides bactériens peuvent porter des gènes de résistances aux antibiotiques, de métabolismes ...etc. (voir le titre : propriétés des plasmides)

NB : Incompatibilité plasmidique signifie la non-possibilité pour deux plasmides de nature différente de coexister dans la même cellule

La répllication des plasmides bactériens est similaire à celle du chromosome. Par un mécanisme précis la répllication, le nombre de copies, la répartition équitable dans les cellules filles sont contrôlés.

IV-5-2- Transfert plasmidique

Les plasmides participent aux transferts horizontaux de gènes entre les populations bactériennes, et donc à la dissémination des gènes conférant des avantages sélectifs (par exemple des résistances aux antibiotiques ou des facteurs de virulence). Le transfert des plasmides d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse peut se faire par plusieurs modes de transfert telles que la conjugaison bactérienne (*via* un pili sexuel), la transduction (via un bactériophage), la mobilisation, la transformation (absorption d'un ADN nu) ou la transposition. La figure 26 illustre les transferts par conjugaison, transduction et transformation.

Transfert par conjugaison et mobilisation :

La conjugaison est le mode de transfert plasmidique le plus retrouvé chez des bacilles à Gram négatif. Il existe deux types de plasmide à savoir des plasmides conjugatifs et des plasmides non conjugatifs.

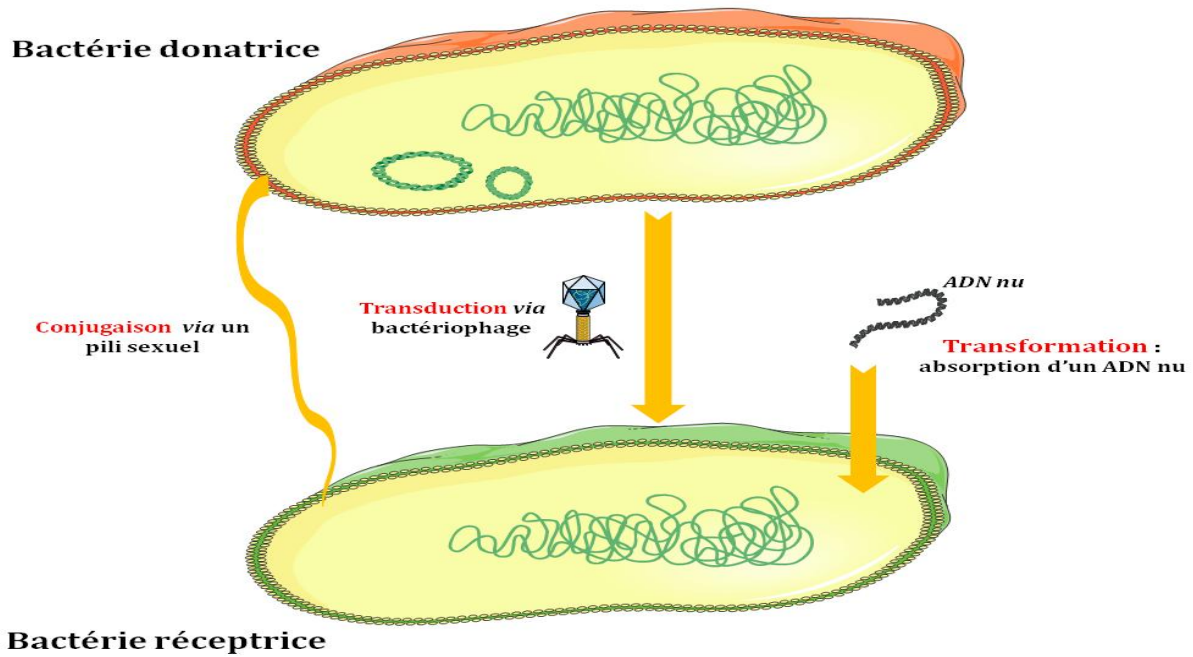


Figure 26 : Modes de transfert plasmidique (conjugaison, transduction et transformation)

Les plasmides conjuguatifs sont généralement d'une taille supérieure à 30 mégadaltons et d'un faible nombre de copies. Ce type de plasmide induit la synthèse de pili sexuel responsable de son transfert dans la cellule hôte.

Les plasmides non conjuguatifs sont présents en nombre élevé par cellule et leur transfert se fait par une mobilisation via un plasmide conjuguatif.

Transfert par transduction

La transduction concerne les bactéries proches phylogénétiquement et le transfert des plasmides (ou d'autre gènes) se fait par l'intermédiaire d'un bactériophage. Ce mode de transfert est souvent utilisé pour le transfert des caractères de résistance aux antibiotiques chez les genres *Staphylococcus* et *Streptococcus*

Transfert par transformation

La transformation est le transfert de gènes par résultat de l'absorption d'ADN nu. Certains genres bactériens comme *Bacillus*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pneumococcus* peuvent absorber de l'ADN à partir de l'environnement, et l'ADN absorbé peut être incorporé dans le chromosome ou dans le plasmide de la bactérie receveuse. Cependant, la transformation est affectée par certains facteurs comme la taille de l'ADN transformé et la compétence du

receveur. De plus, la transformation est sensible aux nucléases de l'environnement. Concernant l'ADN transformé, l'ADN double brin se transforme mieux que l'ADN simple brin et plus la taille d'ADN est petite mieux est la transformation. Quant à la compétence du receveur, certaines bactéries sont capables d'absorber de l'ADN naturellement à un moment précis de leur cycle de croissance. Elles produisent une protéine spécifique appelée facteur de compétence.

NB : La compétence peut être induite *in vitro* par traitement chimique (ex : CaCl_2) car la transformation est beaucoup utilisée dans le transfert des plasmides construits par génie génétique pour des utilisations biotechnologiques (expression de protéine recombinante, clonage de gène...etc.). Les plasmides sont transformés dans des cellules rendues compétentes (électrocompétentes ou thermocompétentes) et sont souvent modifiés pour être présents à un nombre de copies beaucoup plus élevé, de l'ordre quelques dizaines à quelques centaines, ce qui permet une amplification de la production d'ADN et/ou de protéines.

La transformation passe par deux étapes, la première étant l'absorption de l'ADN soit sous forme double brin chez les bactéries à Gram - ou en simple brin chez les bactéries à Gram+ (le brin complémentaire est synthétisé chez le receveur), et la deuxième est la recombinaison homologue. Cette recombinaison nécessite une homologie entre l'ADN donneur et du receveur.

Transfert par transposition :

La transposition est l'intégration directe d'une séquence de gènes (de taille limitée) au sein d'un ADN (chromosomique ou plasmidique). Un transposon (Figure 27) est limité par des séquences répétitives inversées (IR) appartenant à des séquences d'insertion (IS). Les IS portent les gènes nécessaires à la transposition (transposase, l'intégrase, éléments régulateurs de la transposition) tandis que le fragment central porte les marqueurs spécifiques comme la résistance aux antibiotiques. La figure 27 représente le transposon de la résistance à la vancomycine chez le genre *Enterococcus*.

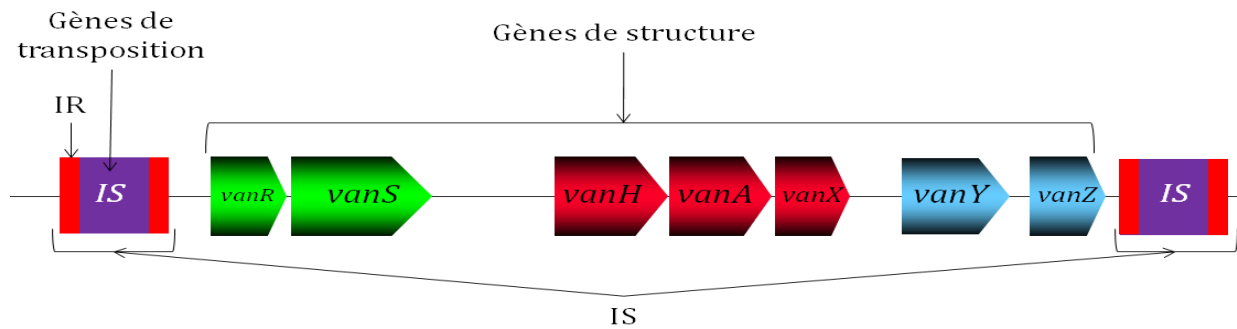


Figure 27 : Le transposon de la résistance à la vancomycine chez le genre *Enterococcus*.

IV-5-3- Propriétés

Les gènes portés par les plasmides peuvent coder des protéines d'intérêts biologiques divers telles que résistance aux antibiotiques (bêta-lactamines, aminosides, phénicolés, cyclines, macrolides); la résistance aux antiseptiques mercuriels et aux métaux lourds, la résistance aux bactériophages. D'autres gènes sont responsables de la virulence et ce, par la synthèse de bactériocines qui inhibent la croissance d'autres bactéries (ex. : colicines d'*Escherichia coli* létales pour les entérobactéries). Des gènes à intérêt métaboliques peuvent également être plasmidiques tels que l'opéron lactose chez les *Proteus*, la production de H₂S chez *E.coli*, la dégradation du toluène ou de l'octane chez les *Pseudomonas*...etc. Par ailleurs, des gènes qui assurent la répllication autonome sont présents sur tous les plasmides ainsi que des gènes qui assurent leur transfert par conjugaison chez les plasmides conjugatifs.

IV-6- Les Pilis

Les Pilis ou fimbriae sont de courts appendices protéiques fins et plus minces que les flagelles qui mesurent de 3 à 10 nm de diamètre et plusieurs µm de long. On les retrouve plus fréquemment chez les bactéries à Gram négatif que celles à Gram positif. Contrairement aux flagelles, les pilis ne sont pas impliqués dans le mouvement.

Il existe deux types de pili à savoir ; les pilis communs et les pilis sexuels. Les deux types sont composés des protéines appelées pilines (adhésine). Les sous unités de la piline sont séparées par chauffage ou traitement acide et reformées à froid ou à pH neutre

IV-6-1- Pilis communs

Le nombre de pilis communs varie de 2 jusqu'à 1000 fimbriae par bactérie et jouent un rôle d'adhésion et de pathogénicité en protégeant la bactérie contre la phagocytose (ex : gonocoque, *Salmonella*).

IV-6-2- Pilis sexuels

A l'inverse des pilis communs, les pilis sexuels sont plus longs, plus épais et moins nombreux (de 1 à 5 pilis par bactéries) et se terminent par un renflement. Les pilis sexuels permettent le contact et l'accouplement entre deux bactéries par le phénomène de conjugaison.

NB : Les streptocoques et staphylocoques (Gram +), possèdent une couche externe de protéines filamenteuses (Protéines M et A respectivement) qui jouent le rôle d'antigène de surface et d'adhésion au tissu de l'hôte.

IV-7- La capsule

La capsule est une structure inconstante organisée qui forme une couche visqueuse, localisée à l'extérieur de la paroi cellulaire. Cette couche ne peut pas être facilement enlevée de la cellule. Au laboratoire plusieurs méthodes permettent sa mise en évidence telles que la méthode à l'encre de Chine, la technique au cristal violet et au sulfate de cuivre, la technique de BORREL (bleu de Borrel) ou la technique immunochimique (phénomène de Neufeld) utilisant des anticorps anti-capsulaires qui induisent un gonflement capsulaire (Ex : pneumocoques).

NB : Une capsule peut entourer un ou plusieurs corps bactériens

IV-7-1- Composition et morphologie

Les constituants capsulaires sont le plus souvent de nature polysaccharidiques (Ex : *Streptococcus pneumoniae*) ou parfois polypeptidiques (Ex : *Bacillus anthracis*)

Les capsules « vraies » sont celles qui entourent la paroi comme les capsules de *Streptococcus pneumoniae*. Cependant, d'autres couches comme les couches « diffuses » les couches « slime » (biofilm) peuvent former une capsule (ex : *Staphylococcus epidermidis*)

La couche muqueuse ou slime est une couche diffuse, facilement séparable du corps bactérien. Certains polysides produits par des bactéries ont un intérêt industriel comme *Leuconostoc mesenteroides* qui produit des dextrans.

Le glycocalyx peut comprendre à la fois les capsules et les couches mucoïdes. Il constitue un réseau de polysaccharides recouvrant la surface des bactéries et d'autres cellules voisines.

La couche S est constituée de sous unités protéiques organisées de façon cristalline selon un système géométrique carré, hexagonal ou oblique. Cette couche est fréquente chez les archéobactéries mais aussi chez les bactéries (*Chlamydia*, *Treponema*, *Helicobacter*, *Bacillus*, *Clostridium* ...etc.)

IV-7-2- Fonctions

La capsule ne joue pas un rôle vital pour la bactérie mais elle peut être utile à la bactérie grâce à ses rôles. En effet, la capsule protège la bactérie contre les agents physiques et chimiques, la dessiccation, les UV et la fixation des bactériophages. De plus, elle joue un rôle dans le pouvoir pathogène car elle exerce un chimiotactisme négatif sur les leucocytes, elle s'oppose à la phagocytose en diminuant l'adhésion des bactéries aux macrophages et elle empêche la pénétration des antibiotiques. La capsule est considéré comme un facteur de virulence donc sa présence dans certaines bactéries les rendent virulentes (*Streptococcus pneumoniae*). Les capsules jouent également un rôle antigénique et les antigènes capsulaires (Antigène K : Kapsel) sont responsables de la spécificité sérologique (Ex : l'antigène Vi chez *Salmonella Typhi*). Quant à la couche S, elle joue un rôle de squelette, d'adhésion, de résistance aux protéases des macrophages et de protection vis à vis des bactériophages

IV-8- Les cils et les flagelles

Les cils et les flagelles sont des appendices locomoteurs rigides et fins de nature protéique (composés de flagelline) avec une structure hélicoïdale qui s'étendent de la membrane plasmique jusqu'à l'extérieur en traversant la paroi bactérienne. Ces structures qui caractérisent les bactéries mobiles dont le diamètre est d'environ 10 à 25 nm (ex: 12 nm chez *Proteus* et de 20 -25 chez *Pseudomonas*).

IV-8-1- Mise en évidence

Les cils et les flagelles sont des structures très fines pour être visibles au microscope optique. Au laboratoire, ils sont mis en évidence par la méthode de Rhodes qui consiste à appliquer le mordant de Rhodes pour 3mn sur un frottis de bactéries flagellées auquel les nitrates d'argent ammoniacal sont rajoutées. Après chauffage jusqu'à ébullition le frottis est

laissé 3 à 5 minutes en contact avec le mélange. Cette méthode très délicate permet de rendre la structure des flagelles plus épaisse et donc visible au microscope.

IV-8-2- Structure et disposition

La microscopie électronique à transmission a permis de montrer que le flagelle bactérien est composé de trois parties à savoir; le corps basal enfoui dans la membrane cytoplasmique, le filament qui s'étend à l'extérieur de la cellule et enfin, le crochet qui relie le corps basal au filament (Figure 28). De point de vu structural, le filament est composé de sous-unités de flagelline dont la masse molaire vari de 30000 à 60000 Da selon l'espèce bactérienne. Cette protéine s'organise pour créer un filament long creux et rigide. Le filament de certaines espèces est entouré également par une gaine de lipopolysaccharides telle que *Vibrio cholerae*. Le crochet et le corps basal sont plus larges est plus complexes que le filament. Le corps basal est ancré dans la membrane cytoplasmique et il est composé de disques (anneaux). Chez les bactéries à Gram négatifs, plusieurs disques sont retrouvés (C, MS, P et L) alors que les bactéries à Gram positif, deux anneaux uniquement sont présents (Prescott *et al.*, 2013).

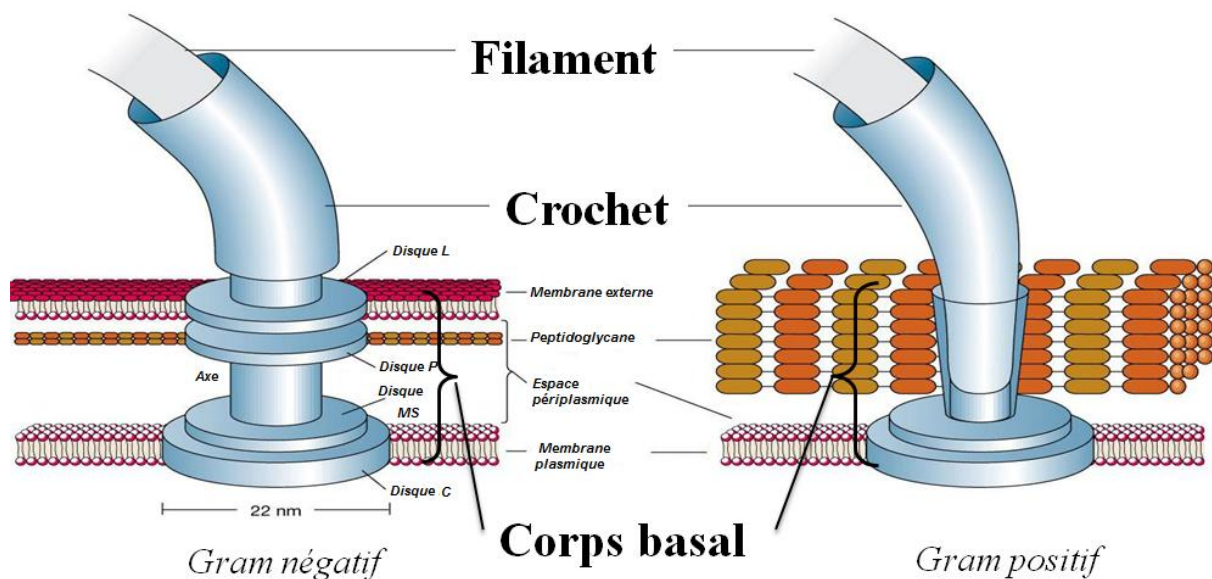
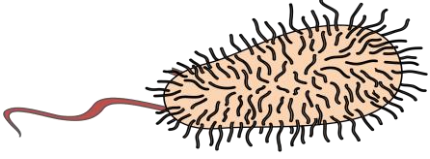
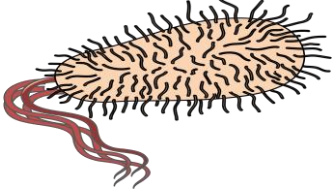
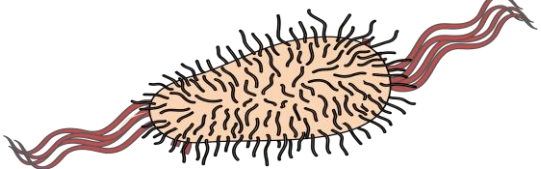
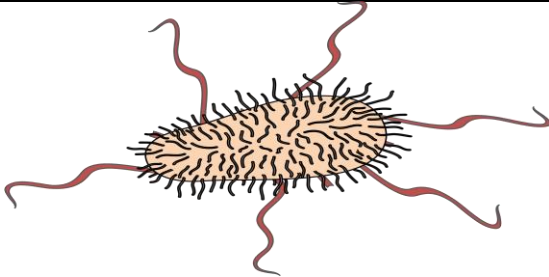


Figure 28: L'ultrastructure d'un flagelle de bactéries à Gram négatif (à gauche) et à Gram positif (à droite) (Prescott *et al.*, 2013)

Le mode de distribution des flagelles bactériens varie d'une espèce à une autre. Le tableau suivant résume l'arrangement des flagelles les plus retrouvés chez les bactéries à savoir, la flagellation monotriches, lophotriche, amphitriche et péritriches.

Tableau V : Arrangement des flagelles chez les bactéries

Type de flagellation	Représentation	Exemple de bactéries
<p>Monotriche</p> <p><i>Une seul ciliature polaire</i></p>		<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p><i>Aeromonas sp</i></p> <p><i>Vibrio sp</i></p>
<p>Lophotriche</p> <p><i>Une touffe de flagelles polaires</i></p>		<p><i>Pseudomonas fluorescens</i></p> <p><i>Spirillum sp</i></p>
<p>Amphitriche</p> <p><i>Des ciliatures dans les deux extrémités (soit un seul ou plusieurs flagelles)</i></p>		<p><i>Helicobacter sp</i></p> <p><i>Plesiomonas shigelloides</i></p>
<p>Péritriche</p> <p><i>Flagelles distribués sur toute la surface de la bactérie</i></p>		<p><i>Proteus vulgaris</i></p>

IV-8-3- Fonctions

Le rôle principal des flagelles est la mobilité. Les flagelles fonctionnent comme les hélices de bateaux, par conséquent, une rotation dans le sens opposé à celui des aiguilles d'une montre engendre un déplacement avant appelé la course. À l'inverse, une rotation dans le sens des aiguilles d'une montre engendre une culbute (elle se tourne sur elle-même afin de changer de sens). La mobilité permet aux bactéries d'envahir les tissus de l'hôte ce qui permet de considérer les flagelles comme des facteurs de virulence.

Les flagelles possèdent d'autres rôles autres que la mobilité tel que le chimiotactisme. Le système du chimiotactisme permet à la bactérie de sentir le milieu environnemental (attractif ou répulsif) et provoque une réponse par un changement de rotation des flagelles. Dans le cas des nutriments (substance attractive), les bactéries métabolisent les nutriments dans le

voisinage immédiat, créant un gradient chimique. Elles vont ensuite se déplacer suivant le gradient pour former un anneau de croissance.

Enfin, un rôle antigénique est attribué aux flagelles grâce aux flagellines qui sont antigéniques (antigène H) ce qui donne une agglutination en présence d'anticorps correspondants. En clinique, ce rôle est exploité notamment dans le sérodiagnostic de la fièvre typhoïde.

IV-9- Les endospores bactériennes

La grande majorité des bactéries se multiplie exponentiellement tant que la nourriture est à leur disposition, puis entrent en phase stationnaire quand les ressources sont épuisées, et enfin finissent par se lyser et mourir. Il existe cependant quelques espèces capables de se différencier en une cellule plus résistante au moment où leur croissance n'est plus possible. Ce phénomène est appelé la sporulation. La sporulation caractérise plusieurs genres de bactéries à Gram positif fréquemment ayant le sol comme habitat naturel. Parmi ces bactéries, les trois genres; *Bacillus* (forme bâtonnet), *Clostridium* (forme bâtonnet) et *Sporosarcina* (forme coque) sont principalement étudiés. Ces bactéries sporulées sont capables de former des structures en petites unités ovales ou sphériques appelées spores ou endospore (endo : intérieur, car leur formation est intracellulaire).

La plupart des bactéries capables de se sporuler sont impliquées dans la pathologie infectieuse par la production de toxines. Parmi ces pathologies, la gangrène gazeuse causée par *Clostridium perfringens*, le botulisme causé par *Clostridium botulinum*, le tétanos causé par *Clostridium tetani* et la maladie du charbon ou anthrax causée par *Bacillus anthracis*. Cette dernière a été utilisée dans le terrorisme biologique aux Etats Unis. Après les attentats du 11 septembre 2001, des attaques à l'aide d'enveloppes contaminées par *Bacillus anthracis* se sont enchaînées.

IV-9-1- Mise en évidence

Les endospores bactériennes apparaissent comme des corps réfringents au microscope optique. Etant imperméables à la plupart des colorants tel que le bleu de méthylène, les endospores apparaissent comme des zones incolores. Donc, afin de les colorer, des techniques spécifiques sont nécessaires comme la méthode de Benito-Trujillo. Cette dernière est une coloration différentielle qui consiste à appliquer deux colorants à savoir; le vert de malachite et

la fuchsine ou la safranine. Sur un frottis préparé, le vert de malachite est utilisé en premier lieu en chauffant jusqu'à émission de vapeur et en laissant pendant 3 à 6 min puis la safranine (ou la fuchsine) en deuxième lieu. A l'observation, les endospores apparaissent en vert et le corps bactérien apparaît en rose (Figure 29).

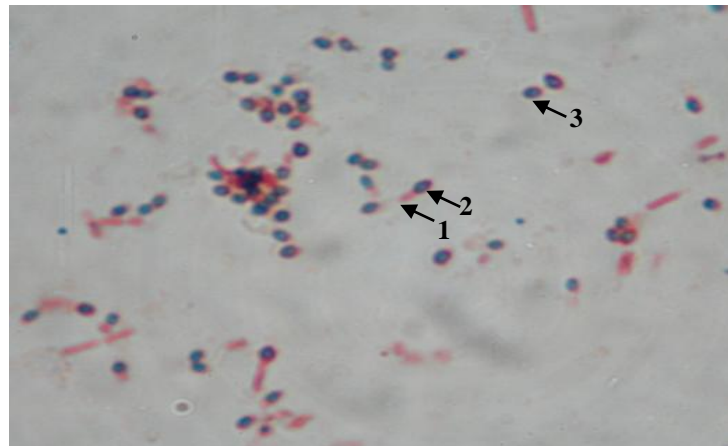


Figure 29 : Résultats d'une coloration de Benito-Trujillo effectuée sur *Bacillus subtilis*. 1: corps bacillaire, 2 : endospore sub-terminale, 3: spore mature libre en d'hors du corps bactérien.

IV-9-2- Morphologie

La forme et notamment la position de la spore sont recherchées dans un but taxonomique. En effet, elle peut être de forme sphérique, cylindrique ou ovoïde en position centrale, sub-terminale ou terminale. De plus, la spore peut déformer la structure du corps bactérien. La figure 30 illustre les différentes formes et positions de la spore bactérienne.








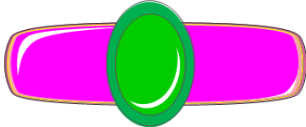
<p>Forme de la spore</p>	 <p>Sphérique</p>	 <p>Cylindrique</p>	 <p>Ovoïde</p>
<p>Position de la spore</p>	 <p>Centrale</p>	 <p>Sub-terminale</p>	 <p>Terminale</p>
<p>Déformation de la spore</p>	 <p>Non déformante</p>		 <p>Déformante</p>

Figure 30 : Les différentes morphologies de l'endospore bactérienne.

IV-9-3- Structure

La structure des endospores bactériennes est très différente de celle de la cellule végétative. En effet, l'endospore présente plusieurs enveloppes inexistantes dans la forme végétative. De l'intérieur à l'extérieur, la spore est composée d'un ADN bactérien (Nucléoïde) entouré par une membrane plasmique et une paroi sporale. Ce noyau appelé noyau protoplastique est entouré par d'autres enveloppes à savoir; un cortex, des tuniques (internes et externes) et l'exosporium (Figure 31).

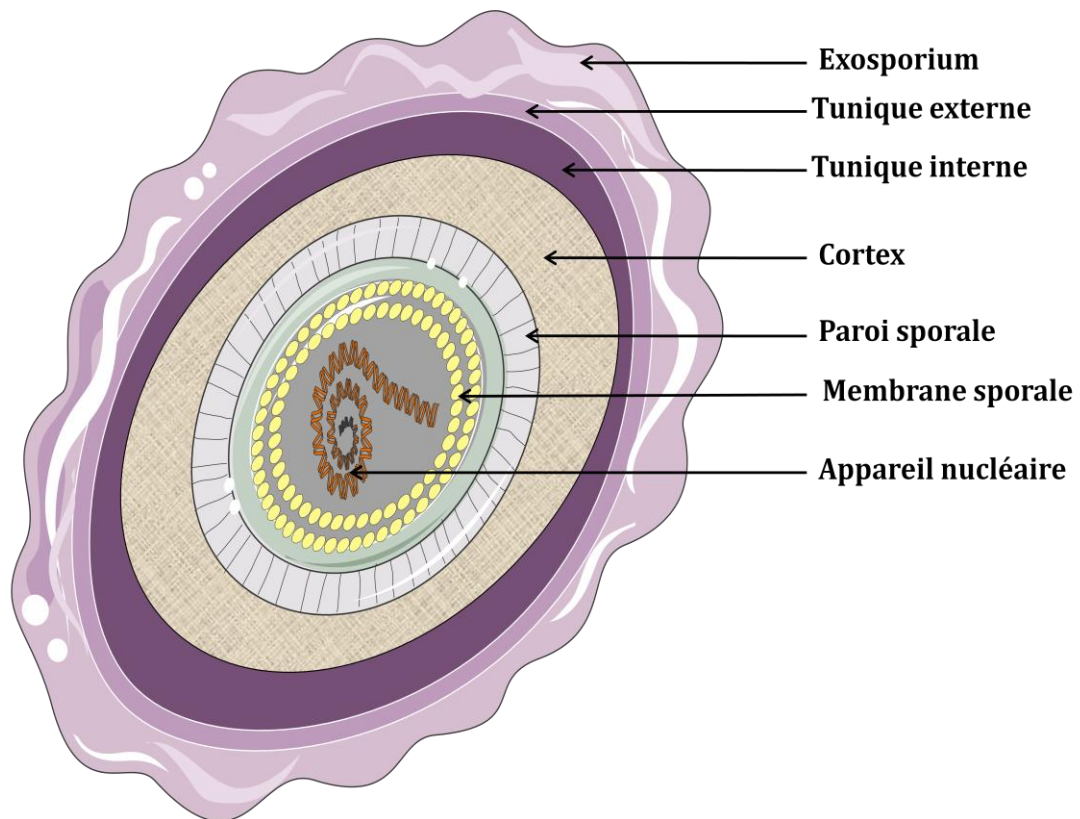


Figure 31 : La structure d'une endospore bactérienne

L'exosporium est une couche fine de lipoprotéines contenant 20% de sucres (Meyer *et al.*, 2000). Il n'est pas essentiel à la vie de la spore. Les tuniques (internes et externes) sont composées de protéines de type kératine très riches en ponts disulfure donnant la caractéristique d'imperméabilité aux agents chimiques. Le cortex peut occuper plus de la moitié de la spore, c'est une couche épaisse d'un aspect monomorphe composé de peptidoglycane inhabituel moins ponté et plus sensibles au lysozyme. Le noyau protoplastique possède les structures cellulaires normales tels que la paroi sporale, la membrane cytoplasmique, les ribosomes et le nucléoïde. Cependant, le protoplaste contient une très faible quantité d'eau et

donc inerte de point de vue métabolique. La paroi sporale est formée d'un peptidoglycane habituel ce qui devient la paroi de la cellule végétative après germination. En plus de ces constituants, le noyau protoplastique contient une quantité importante de l'acide dipicolinique. Ce dernier retrouvé sous forme de complexe calcique (dipicolinate de calcium), est présent chez toutes les endospores bactériennes et représente environ 10% du poids de la spore. De plus, il joue un rôle important dans la réduction de la biodisponibilité de l'eau, favorisant ainsi la déshydratation de la spore et s'intercale également entre les bases d'ADN empêchant sa dénaturation par la chaleur (Madigane & Martinko, 2007)

IV-9-4- Phénomène de sporulation

Le phénomène de sporulation désigne le passage de la cellule de la forme végétative à la forme sporale (spore). Ce phénomène ne se déroule pas lors de la phase exponentielle de croissance ou les nutriments sont disponibles, il se déclenche lorsque les conditions deviennent défavorables pour la croissance. Ces dernières peuvent être occasionnées par un manque de nutriments (notamment le carbone ou l'azote), manque d'eau, température de croissance défavorable, pression élevée, pH défavorable...etc. La sporulation est alors une stratégie de survie face aux conditions létales. La spore peut revenir à la forme végétative dès le retour des conditions défavorables formant ainsi un cycle. Ce chemin inverse est appelé germination (Figure 32).

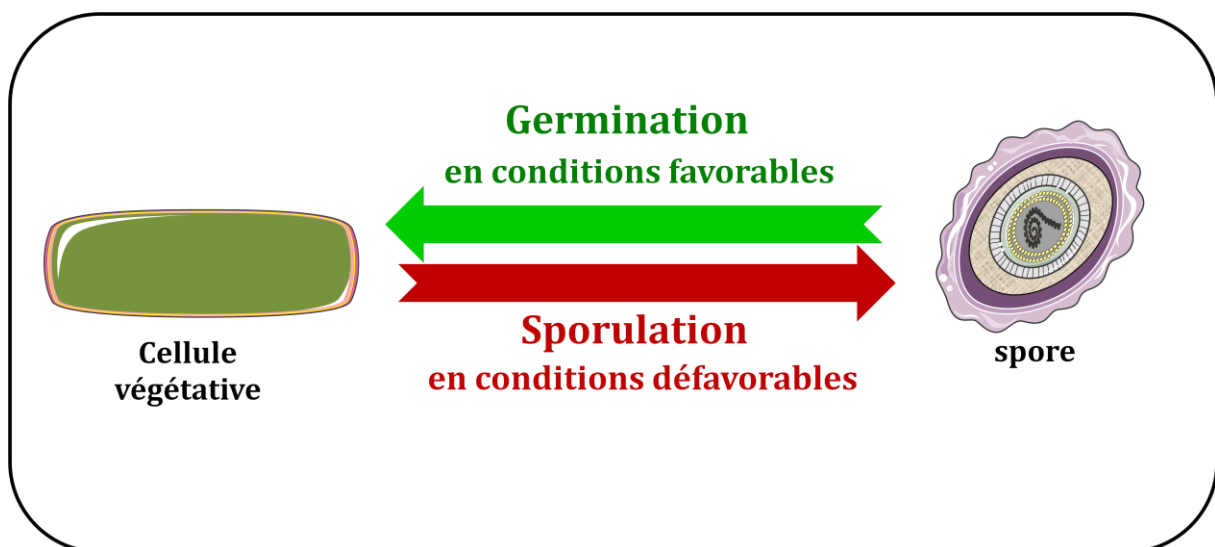


Figure 32 : Le cycle sporal; passage de la forme végétative à la forme sporale et *vice-versa*

La sporulation passe par plusieurs étapes et fait appel à une série d'évènements de différenciation cellulaire sous une régulation génétique complexe. Elle dure huit (8) heures chez *Bacillus subtilis* (Madigane & Martinko, 2007). En réponse à des modifications environnementales (conditions défavorables), la cellule stoppe la synthèse des ARN et des protéines de la forme végétative. Après sa réplication, l'ADN se dispose en filament chromatique axial, et la cellule déclenche alors une division asymétrique en installant septum transversal subpolaire qui fini par la formation d'une zone autonome: Cette zone contenant l'appareil nucléaire, le cytoplasme et une double membrane continue (externe et interne) est appelée la préspore. Par la suite, la spore s'entoure d'un certains nombre de téguments ou enveloppes qui mûrissent progressivement. Après maturation, il ya formation d'une double membrane sporale et synthèse des nouvelles couches à savoir; la paroi sporale, le cortex qui se forment entre la face interne de la double membrane, les tuniques et l'exosporium qui se disposent à l'extérieur. Souvent, après maturation, la spore mature se libère et l'autre partie du corps bactérien est lysée (Madigane & Martinko, 2007; Meyer *et al.*, 2000; Prescott *et al.*, 2013).

IV-9-5- Propriétés de la spore bactérienne

La spore bactérienne est une forme extraordinairement résistante qui peut persister dans le temps des millions d'années! Des spores bactériennes de l'ère dominicain de 25 à 40 millions d'années ont pu être identifiées et revivifiées (Cano & Borucki, 1995). Plus spectaculaire, des bactéries halophiles piégées dans des cristaux de sels datant de 250 millions d'année (l'ère permien) (Vreeland *et al.*, 2000)

Grace à leurs compositions, les endospores sont capables de résister à des températures extrêmes. Généralement la spore survie à des températures de 70 °C à 80 °C durant 10 minutes. Certains bactéries comme *Plectridium caloritolerans* résistent plus de 8h à 100°C et 5 minutes à 120°C (Meyer *et al.*, 2000). La thermorésistance des spores pose un problème de stérilisation dans les hôpitaux (salles de chirurgie) ainsi que dans les industries alimentaires (stérilisation des aliments en conserve). La thermorésistance des spores est en rapport direct avec le dipicolinate de calcium et, à un degré moins, à l'acide L-N-succinyl-glutamique. La déshydratation (moins de 20% d'eau dans une spore vs 80% d'eau dans une cellule végétative) joue également un rôle important dans la thermorésistance. C'est bien connu que des structures comme de l'ADN ou des protéines résistent plus à la dénaturation par chaleur à leur état anhydre (Meyer *et al.*, 2000).

La composition de la spore lui permet de résister aux agents physico-chimiques tels que les radiations (UV, rayons X), la pression, les antiseptiques, les désinfectants, les antibiotiques...etc. De plus, vu le métabolisme inerte des spores, elles supportent des déshydratations poussées, des carences en éléments nutritifs, vieillissement, manque d'oxygène ce qui fait de ces structures les formes les plus résistantes du domaine des *Bacteria*.

L'une des propriétés la plus importante des spores bactérienne est qu'elles sont capables de reprendre la forme végétative dès le retour des conditions favorables par le phénomène de la germination.

IV-9-6- Germination

Le processus de germination (Figure 33) qui permet la transformation d'une spore en une cellule végétative (retour de la dormance à la vie active) se fait en trois stades; l'activation, germination (ou initiation) et l'émergence (éclosion ou excroissance) (Madigane & Martinko, 2007; Meyer *et al.*, 2000)

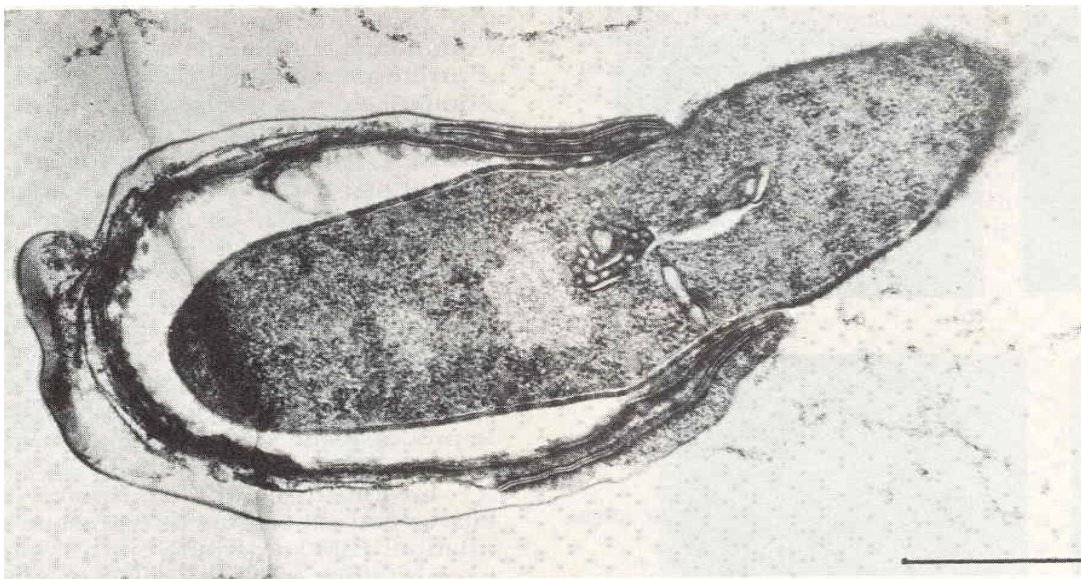


Figure 33 : La germination d'une endospore (Prescott *et al.*, 2013)

L'étape de l'activation correspond à une lésion des enveloppes sporales par des agents physiques (choc thermique), mécaniques (abrasion, choc) ou chimiques (acides, lysozyme...). L'activation est provoquée en industrie alimentaire par le procédé de la tyndallisation qui consiste à chauffer un produit, contenant éventuellement des spores bactériennes, à une

température de 65 °C à 95 °C ce qui permettra l'activation et la germination des spores (NB : un deuxième traitement thermique est nécessaire pour éliminer les formes végétatives issues de la germination).

Après l'activation des spores, l'étape de la germination débute en présence de conditions favorables telle que l'hydratation et les métabolites effecteurs (Alanine, Mg, adénosine...) qui pénètrent à travers les enveloppes endommagées. Puis des enzymes hydrolytiques dégradent les constituants de la spore en libérant le dipicolinate de calcium ce qui permet à la spore de s'imbiber d'eau et de gonfler.

Enfin, l'émergence de la cellule végétative en dégradant le cortex et téguments externes et la cellule entame une phase active de biosynthèse et de reprise graduelle de la croissance végétative. La paroi sporale devient la paroi bactérienne et la cellule double son volume initiale et se libère de la tunique sporale (Meyer *et al.*, 2000).

NB : Un grand nombre de bactéries sporulées peuvent synthétiser des métabolites tels que des toxines ou des antibiotiques. De ce fait, *Bacillus licheniformis* produit la bacitracine, *Bacillus polymyxa* élabore la polymyxine. Ces deux antibiotiques sont produits au moment de l'engagement irréversible dans le processus de la sporulation.

Chapitre III : Introduction à la classification bactérienne

I- Définition

Il existe environ 1.5 millions d'espèces connues, il y en aurait en tout entre 10 et 40 millions. Par conséquent, dès le XVII^e siècle, l'homme a senti le besoin de classer les espèces afin de mettre de l'ordre. Donc il était nécessaire de créer des méthodes d'étude de la diversité du monde vivant d'où la naissance de la taxonomie. La taxonomie (*taxis* : disposition; *nomos* : loi) a pour objet de décrire les organismes vivants et de les regrouper en entités appelées taxons (familles, genres, espèces, etc.) afin de pouvoir les identifier, les nommer et enfin les classer. C'est aussi la science des lois et des règles qui déterminent l'établissement des méthodes et systèmes de classement (systématique) permettant de comprendre la biodiversité. La taxonomie en microbiologie est très importante. Elle permet de répartir les micro-organismes en groupes significatifs, utiles, avec des noms précis, de sorte que les microbiologistes peuvent les étudier et communiquer efficacement avec un langage universel. Elle permet également de faire des prédictions et des hypothèses basées sur la connaissance d'organismes similaires pour la recherche de nouvelles espèces (identification).

II- Types de classification bactérienne

II-1- Classification phénétique

La classification phénétique consiste à regrouper les micro-organismes suivant la similitude de leurs caractères phénotypiques. C'est l'une des classifications anciennes utilisées pendant longtemps par les taxonomistes microbiens. Cette classification a réussi à mettre de l'ordre dans la diversité microbienne et a permis de relier certaines fonctions à des structures morphologiques (Ex : l'association des cils et flagelles avec la mobilité). Cette classification reste limitée et moins précise. Néanmoins, plus le nombre d'attributs comparés est élevé, plus la classification phénétique est meilleure. Ainsi, les micro-organismes qui partagent le plus de caractères sont groupés dans un même taxon (ou groupe phénétique).

II-2- Classification phylogénétique

La classification phylogénétique (ou phylétique) consiste à comparer les espèces sur la base des relations évolutives. Depuis l'apparition de la théorie de Darwin sur l'évolution des

espèces en 1859, Carl Woese et George Fox furent les premiers à avoir proposer d'utiliser les séquences de l'ARN ribosomique de la petite sous-unité du ribosome (ARN 16S chez les procaryotes et l'ARN 18S chez les eucaryotes), pour étudier la relation évolutive entre les espèces en 1977 (Woese & Fox, 1977). Depuis, ils proposèrent une réorganisation de la classification du monde vivant en trois domaines à savoir; *Eucarya*, *Bacteria* et *Archaea*.

II-3- Classification génotypique

La classification génotypique vise à comparer la similitude génétique entre les micro-organismes. Cette comparaison peut se faire entre des gènes individuels ou entre des génomes entiers. Actuellement, avec l'avancée des approches moléculaires, plusieurs techniques permettent de réaliser efficacement la comparaison génotypique alors qu'avant, un seuil de similitude de 70% était suffisant pour classer des micro-organismes dans le même taxon. Par conséquent, les archées et les bactéries étaient regroupées faussement dans le même taxon vue l'homologie des génomes supérieures à 70%.

II-4- Classification de Bergey

Actuellement, plusieurs classifications des micro-organismes existent. On cite ; la classification selon Cavalier-Smith, l'arbre simplifié de Gupta, l'arbre résumé d'après Skophammer *et al.*, la classification de Wu *et al.* et la classification de *Bergey's*. Cette dernière est largement acceptée par les microbiologistes. La première publication de David Bergeys "*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*" fut en 1923. Depuis plusieurs éditions sont publiées. Cette classification qui sert de guide de référence pour l'identification des bactéries est basée sur les caractéristiques à la fois physiologiques, morphologiques, écologiques et notamment phylogénétiques. Chaque volume de ce manuel couvre un groupe spécifique de bactérie et il est écrit par des experts dans le domaine (Bergey & Holt, 2000).

III- Les rangs taxonomiques

Les rangs taxonomiques sont une organisation hiérarchisée non chevauchante. Le rang le plus élevé représente le domaine (chez les bactéries, le domaine *Bacteria*), qui comprend des phylums qui groupent de classes semblables. Chaque classe regroupe des ordres semblables regroupant à leurs tours des familles de micro-organismes. Les familles sont formées de genres, eux mêmes formés d'espèces (Figure 34). Une espèce bactérienne est définit comme un ensemble de souches qui partagent de nombreuses propriétés stables et diffèrent de façon

significative d'une autre espèce. Plusieurs souches peuvent exister à l'intérieure d'une même espèce. Elles se diffèrent par quelques caractéristiques soient biochimiques ou physiologiques (dites biovars), morphologiques (dites morphovars) ou par leurs propriétés antigéniques (dites sérovars).

Afin de nommer un micro-organisme, les microbiologistes utilisent le système binominal de Charles Linné. Dans ce système, chaque espèce est désignée par le nom des deux derniers taxons à savoir le **genre** et l'**espèce**. Le nom complet s'écrit en italique (ou souligné) dont le genre s'écrit avec une première lettre en majuscule et l'espèce complètement en minuscule (ex : *Escherichia coli* ou Escherichia coli).

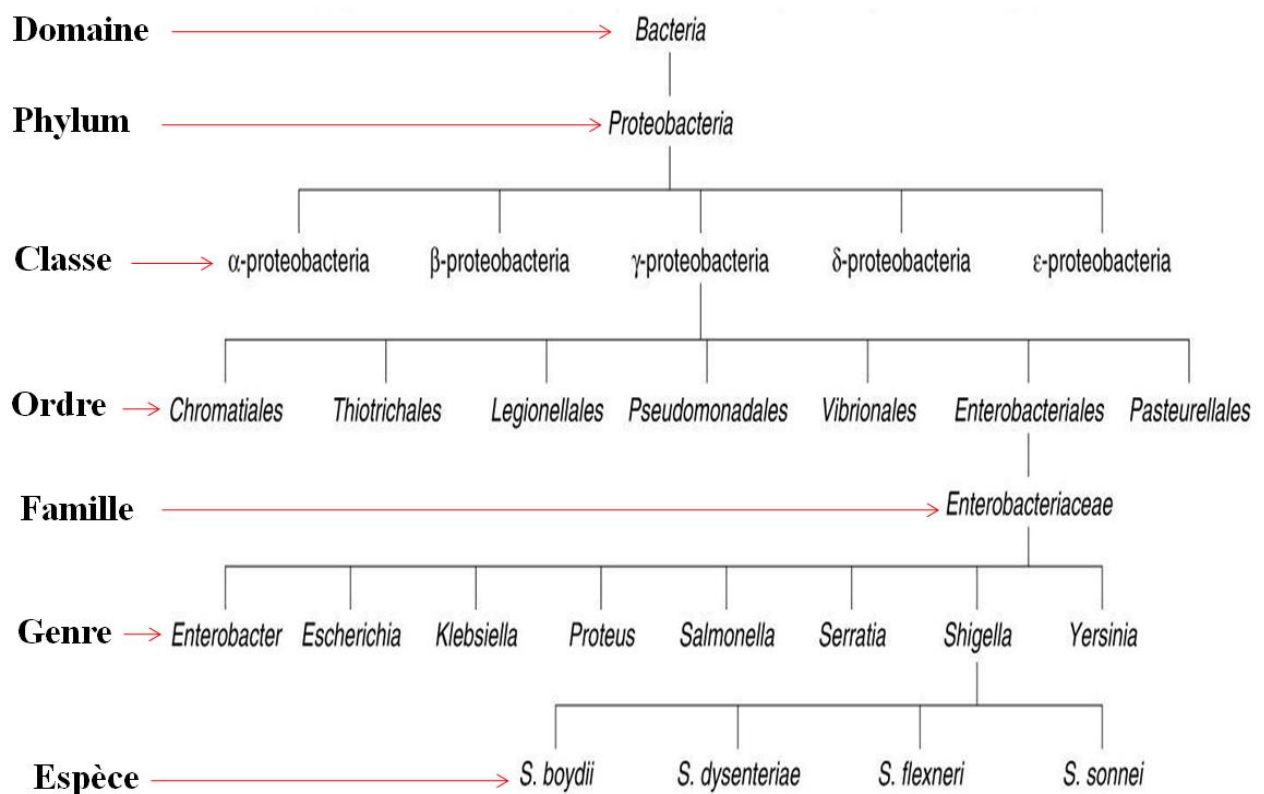


Figure 34 : Structure hiérarchique en taxonomie (Prescott *et al.*, 2013)

IV- Critères et les techniques d'études de classification bactérienne

Afin de pouvoir classer les micro-organismes notamment les espèces du domaine *Bacteria*, plusieurs critères sont pris en considération.

IV-1- Les critères classiques

Les critères classiques de la classification bactérienne s'intéressent aux caractères morphologiques (phénotypiques), physiologiques, biochimiques et écologiques (habitat).

La similarité morphologique est un bon indicateur d'une parenté phylogénétique. En effet, les caractères structuraux dépendent de l'expression de nombreux gènes qui sont habituellement stables. Les comparaisons morphologiques des espèces bactériennes, notamment les plus petites d'entre elles sont limitées par la résolution du microscope optique. C'est plutôt les microscopes électroniques (à transmission et à balayage) qui ont beaucoup contribué à l'étude morphologique et anatomique des micro-organismes par un pouvoir de résolution plus poussé.

Les caractéristiques physiologiques et métaboliques renseignent sur la nature des enzymes et des protéines de transport. Donc, elles permettent indirectement de faire une analyse des génomes du fait que ces protéines sont des produits d'expression génétique.

La caractéristique biochimique la plus importante en taxonomie consiste à analyser le profil des acides gras par la technique de FAME (*fatty acids methyl-ester*) qui peut relever des différences significative d'une espèce à une autre.

Enfin, les propriétés écologiques sont d'un grand intérêt pour la taxonomie bactérienne. En effet, les caractéristiques de l'habitat (comme le pH, la température, l'oxygène, la pression osmotique..) renseignent sur les préférences et les exigences des bactéries pouvant partager des liens de parenté.

IV-2- Les critères moléculaires

Avec l'arrivée de la biologie moléculaire, des critères moléculaires se sont imposés afin d'éclaircir certaines ambiguïtés retrouvées en utilisant uniquement les critères classiques. Les critères moléculaires se basent notamment sur les acides nucléiques (leur composition en base, leur hybridation, leur séquençage, empreintes génomiques) ainsi que sur l'analyse des protéines.

La composition en base des acides nucléiques et notamment le contenu en GC% ($GC\% = [G+C] \cdot 100 / [G+C+T+A]$) détermine sa température de fusion T_m (T_m : une température à laquelle les deux brins d'ADN se séparent). Généralement, la variation du CG % à l'intérieur d'un genre bactérien est inférieure à 10% ce qui représente un bon paramètre de classification.

Hybridation des acides nucléiques (ADN-ADN) a pour but de mesurer la similitude entre des génomes. Cette technique consiste à incuber des brins d'ADN (non radioactif) fixés sur un filtre de nylon avec un ADN radioactif dont on veut comparer. Les fragments d'ADN radioactifs s'hybrident et le taux d'homologie est reflété par le taux de la radioactivité.

Séquençage des acides nucléiques et plus précisément le séquençage des gènes ADN codant pour l'ARN ribosomique de la petite sous-unité du ribosome (ARN 16S) constitue la base de l'arbre phylogénétique proposé par Carl Woese et George Fox (Woese & Fox, 1977). Donc, l'ARN 16S est considéré comme une carte d'identité moléculaire. Le gène codant pour l'ARN 16S est vital et n'admet pas de mutations importantes ce qui fait que ce gène change très peu au cours du temps (évolution).

A titre d'exemple, les expériences d'hybridation ADN-ADN et l'analyse des séquences de l'ARNr 16S, menées en 1984, ont permis de montrer que les espèces *Streptococcus faecium* et *Streptococcus faecalis* étaient suffisamment distinctes des autres streptocoques pour justifier la création du genre *Enterococcus* (Schleifer *et al.*, 1984)

D'autres techniques appelées "prise d'empreintes génomique" (*fingerptinting*) contribuent également de façon efficace, précise et rapide à la taxonomie bactérienne. Parmi ces techniques, l'analyse de séquence multilocus (MLSA) et l'analyse de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP). La MLSA consiste à comparer 5 à 7 gènes domestiques de diverses souches (du même genre ou de genre différent) et permet d'établir des liens entre les souches taxonomiquement plus proches. Quant à la RFLP, cette technique consiste à couper séparément des séquences d'ADN des espèces dont on souhaite comparer par des enzymes de restriction (endonucléases qui reconnaissent des sites spécifiques). Après une migration sur un gel d'électrophorèse, les profils des ADN sont comparés donnant ainsi des informations sur le degré d'homologie des ADN examinés.

Enfin, le séquençage des protéines est aussi utilisé en taxonomie. La similitude des séquences protéiques présentant une même fonction suggèrent que les organismes qui les possèdent soient étroitement apparentés. Les protéines les plus utilisés en phylogénie sont les cytochrome et d'autres transporteurs d'électrons, les protéines du choc thermique, les histones, protéines de transcription et de traduction et beaucoup d'autres protéines (Prescott *et al.*, 2013).

Chapitre IV : Nutrition bactérienne

Les bactéries expriment continuellement un besoin de multiplication et de division permettant la continuité de l'espèce. Une cellule d'*Escherichia coli* se divise au bout de 20 à 30 mn pour donner naissance à deux cellules filles semblables. Pendant cette période relativement courte, la bactérie doit se nourrir afin de s'offrir les éléments et l'énergie, nécessaires à la division cellulaire.

I- Besoins élémentaires

Parmi les besoins courants chez les microorganismes généralement et chez les bactéries notamment, on distingue; les macro-éléments (macro-nutriments) et les Oligo-éléments (micronutriments). Les macro-éléments comme le carbone, l'oxygène, l'hydrogène, l'azote, le soufre, le phosphore, le potassium, le calcium, le magnésium et le fer sont nécessaires en quantités importantes. Alors que les Oligo-éléments comme le manganèse, le zinc, le cobalt, le molybdène, le Nickel et le cuivre, sont nécessaires en très faibles quantités. Cependant, certaines bactéries, en plus des besoins élémentaires (macro et micro-éléments), elles dépendent de certains nutriments spéciaux pour assurer leur croissance (ex: acide salicylique chez les diatomées, ions sodium chez des bactéries halophiles, etc.). Généralement les besoins en carbone, hydrogène et oxygène sont fréquemment satisfaits ensemble (exemple une molécule de glucose $C_6H_{12}O_6$). Les besoins en azote, phosphore et soufre sont nécessaires pour la synthèse de molécules importantes comme les acides aminés et les acides nucléiques.

II- Facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des composés organiques essentiels (ou leurs précurseurs sont essentiels) qui ne peuvent pas être synthétisés par le microorganisme. Ils doivent être fournis par l'environnement afin d'assurer la survie et la reproduction de ce dernier.

Les facteurs de croissance peuvent être soit des acides aminés nécessaires à la synthèse des protéines, soit des bases purines et pyrimidines nécessaires à la synthèse des acides nucléiques ou bien des vitamines qui jouent un rôle de cofacteurs enzymatiques

III-Types trophiques

Il existe différents types trophiques basés sur le type de nutriments, de la source de carbone, sources énergétiques, sources du pouvoir réducteur. Selon :

- Les nutriments, on distingue les bactéries *prototrophes* qui peuvent synthétiser leurs propres nutriments, et les bactéries *auxotrophes* qui nécessitent un apport extérieurs d'un élément particulier (facteur de croissance).
- La source de carbone, on distingue les bactéries *autotrophes* qui utilisent le CO₂ comme source de carbone, et les bactéries *hétérotrophes* qui nécessitent une matière organique comme le glucose.
- La source d'énergie, on distingue les bactéries *phototrophes* qui utilisent la lumière comme source d'énergie, et les bactéries *chimiotrophes* qui extraient leur énergie à partir d'un élément chimique (minéral ou organique)
- La source du pouvoir réducteur, on distingue les bactéries *lithotrophes* qui utilisent les composés inorganiques pour réduire les oxydants et les bactéries *organotrophes* qui utilisent plutôt des composés organiques.

Tableau VI : Récapitulatif des types trophiques chez les bactéries

Source d'énergie	Source du pouvoir réducteur	Source de carbone	Type trophique
Lumière <i>Photo</i>	Composé organique <i>organo</i>	Composé organique <i>hétérotrophe</i>	Photoorganohétérotrophe
		CO ₂ <i>autotrophe</i>	Photoorganoautotrophe
	Composé inorganique <i>litho</i>	Composé organique <i>hétérotrophe</i>	Photolithohétérotrophe
		CO ₂ <i>autotrophe</i>	Photolithoautotrophe
Composé chimique (organique ou inorganique) <i>Chimio</i>	Composé organique <i>organo</i>	Composé organique <i>hétérotrophe</i>	Chimioorganohétérotrophe
		CO ₂ <i>autotrophe</i>	Chimioorganoautotrophe
	Composé inorganique <i>litho</i>	Composé organique <i>hétérotrophe</i>	Chimiolithohétérotrophe
		CO ₂ <i>autotrophe</i>	Chimiolithoautotrophe

IV-Paramètres physico-chimiques

La nutrition chez les micro-organismes dépend de plusieurs paramètres physico-chimiques. Ces derniers influent directement la physiologie et donc la croissance des micro-organismes. Parmi ces paramètres, on cite la température, la quantité d'oxygène (O₂), l'activité de l'eau et la pression.

IV-1- La température

La croissance de chaque micro-organisme dépend des températures dites cardinales. La température minimale est la température la plus basse qui permet une croissance, la température optimale est la plus favorable pour une meilleure croissance et enfin la température maximale est la limite supérieure de toute croissance possible (Figure 35).

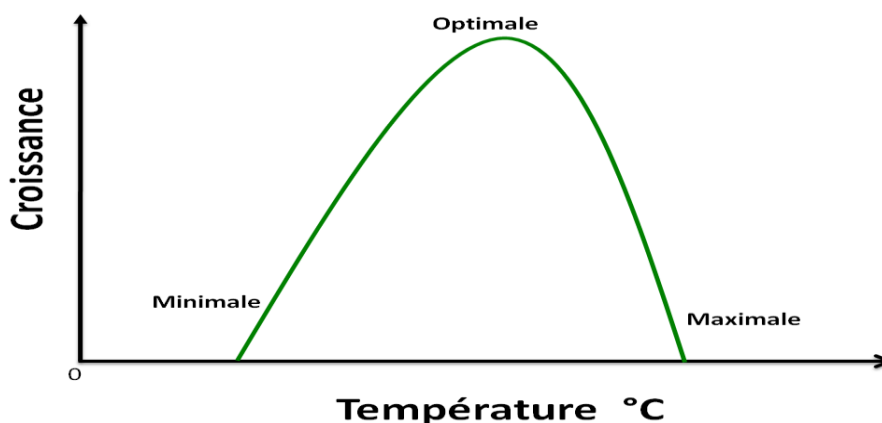


Figure 35 : Influence de la température sur la croissance bactérienne

Les bactéries sont qualifiées par un nom, selon l'intervalle de température de croissance dans laquelle elles poussent. Ainsi les bactéries vivant dans des températures basses sont dites psychrophiles ou psychrotrophes (ex : certaines bactéries du genre *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium* et *Psychrobacter*), celles qui vivent dans des températures allant de 15 °C à 45°C sont dites mésophiles (ex : les bactéries de la flore intestinale de l'homme) et les bactéries qui supportent des températures élevées sont appelées thermophiles ou hyperthermophiles (ex : *Thermus aquaticus* est une bactérie thermophile; la haute résistance thermique de son ADN polymérase est utilisée pour la réaction de polymérisation en chaîne PCR) (Figure 36).

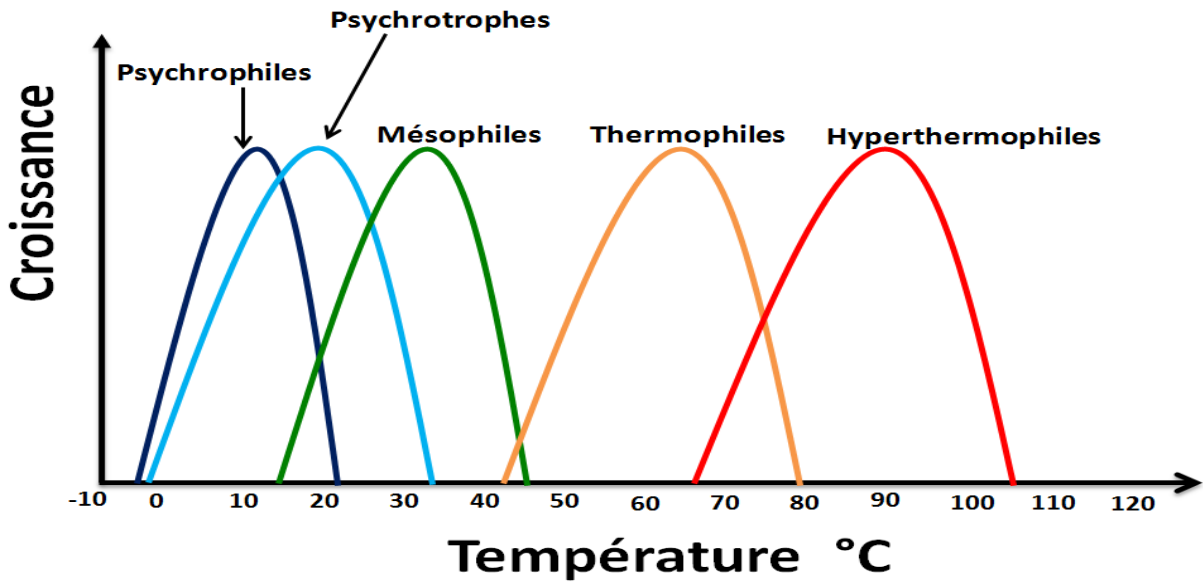


Figure 36 : Les bactéries et la température

IV-2- Le pH

La nutrition bactérienne est directement influencée par le pH du milieu dans lequel elle se trouve. Selon le pH optimal de croissance, on distingue les bactéries acidophiles vivant dans des pH très acides (ex : certaines cyanobactéries, peuvent coloniser des milieux hyperacides caractérisé par des pH proches de 0 comme les lacs acides des volcans), les bactéries neutrophiles retrouvées dans des pH plus ou moins neutres (ex: Les bactéries de la flore intestinale de l'homme sont généralement des neutrophiles) et les bactéries alcalophiles pouvant croître dans des pH très alcalins (ex : *Bacillus alcalophilus*) (Figure 37)

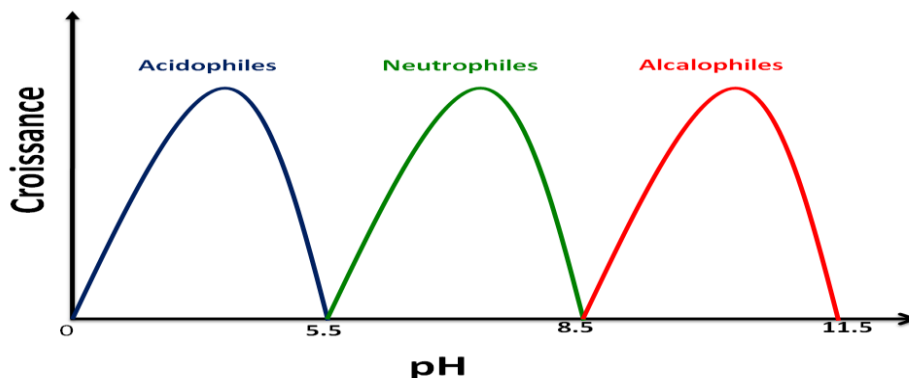


Figure 37 : Les bactéries et le pH du milieu

NB : La plupart des acidophiles et des alcalophiles maintiennent un pH interne près de la neutralité. Plusieurs micro-organismes peuvent altérer le pH de leur environnement en

produisant des déchets acides ou alcalins (ex: les bactéries lactiques). Au laboratoire, la plupart des milieux de culture utilisés possèdent des tampons pour prévenir l'inhibition de croissance par la variation de pH.

IV-3- L'oxygène (O_2)

La quantité de l'oxygène dans l'environnement bactérien affecte la nutrition et la croissance bactérienne. Selon l'exigence de la bactérie en oxygène, on distingue les aérobies strictes (*Bacillus Subtilis*), les bactéries microaérophiles, les bactéries aéro-anaérobies facultatives (*Enterococcus faecalis*) et les bactéries anaérobies strictes (*Clostridium perfringens*) (Figure 38)

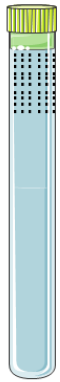
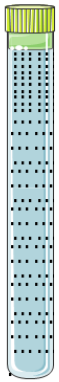
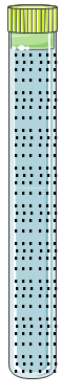
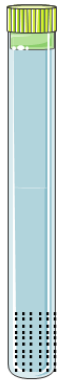
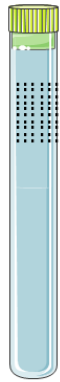
Concentration d'oxygène	Besoin d'oxygène	Préfère l'oxygène	Ignore l'oxygène	Fuit de l'oxygène	Nécessite 2 à 10% d'oxygène
Résultats de la croissance bactérienne					
Le type respiratoire	Aérobie strict	Anaérobie facultatif	Anaérobie aéro-tolérant	Anaérobie strict	Micro-aérophile

Figure 38 : Les bactéries et la concentration de l'oxygène

IV-4- Les solutés et l'activité de l'eau a_w

L'activité de l'eau (a_w) est la disponibilité de l'eau (eau libre) exprimée de façon quantitative. Elle est réduite par des interactions de l'eau avec des molécules de solutés. Une concentration élevée du soluté implique une faible a_w . L'activité de l'eau est inversement proportionnelle à la pression osmotique exercée par un soluté (NaCl, saccharose...). Elle est également réduite par l'absorption sur des surfaces (effet matrice).

Plus l'activité de l'eau est faible, moins la croissance bactérienne est favorable. Les habitants de la Kabylie en Algérie, ont su conserver les viandes avec des concentrations élevées de chlorure de sodium (NaCl) ce qui réduit énormément l'eau disponible empêchant ainsi les contaminations bactériennes. Par le même principe, plusieurs conserves et confitures sont préparés. Actuellement, l'activité de l'eau dans les aliments de conserve sont limités par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé).

Selon la tolérance des concentrations de NaCl, on distingue les bactéries non halophile, les bactéries halotolérantes, les bactéries halophile modérées et les bactéries extrême-halophiles qui peuvent supporter des concentrations élevées de chlorure de sodium (tableau VII).

IV-5- La pression

Il existe des micro-organismes barotolérants affectés de façon défavorable par une augmentation de pression, mais pas autant que les bactéries non tolérantes. Les micro-organismes barophiles présentent une croissance plus rapide à des pressions élevées.

Le tableau ci-dessous résume l'influence des bactéries par les paramètres physico-chimiques (tableau VII).

Tableau VII : Les bactéries et les paramètres physico-chimiques

T°	Psychrophiles	Psychrotrophes	Mésophiles	Hyper-Thermophiles thermophiles
pH	Acidophiles	Neutrophiles		Alcalophiles
O₂	Anaérobies	Micro-aérophiles		Aérobies
	Aéro-anaérobies facultatifs			
aW (NaCl)	Non halophiles	Halo-totérantes	Halophiles modérées	Halophiles extrêmes
Pression	Baro-nontolérants	barotolérants		Barophiles

V- L'absorption des nutriments

Les micro-organismes utilisent des mécanismes au niveau de leur membrane cytoplasmique pour assimiler les nutriments. Les plus fréquents sont: la diffusion facilitée, le transport actif (uniport, antiport, symport), les transporteurs ABC et la translocation de groupe (voire le cours de la membrane cytoplasmique)

VI-La culture bactérienne et les milieux de culture

La microbiologie, et notamment la bactériologie, a connu son plein développement suite à la découverte des méthodes et outils permettant la culture bactérienne. Le microscope à lui seul, est insuffisant pour identifier la bactérie. La culture bactérienne et sa caractérisation est rendue possible par l'utilisation des milieux de culture.

Les milieux de cultures sont des préparations utilisées pour faire croître, reproduire, transporter et conserver des micro-organismes. Ils contiennent des éléments nutritifs nécessaires à la nutrition et la croissance bactérienne. Ils peuvent être liquides, solides ou semi solides. Généralement, les milieux liquides sont solidifiés avec de l'agar-agar (1.5%). On distingue différents types de milieux de culture à savoir;

1- Milieux de culture à utilisation générale : Qui supportent la croissance de différents micro-organismes (ex : gélose au soja, gélose nutritive)

2- Milieux enrichis: Qui sont des milieux de culture à utilisation générale auxquels on ajoute des nutriments spéciaux afin de favoriser le développement d'hétérotrophes fastidieux (ex : gélose au sang)

3- Milieux sélectifs: Qui favorisent la croissance de certains micro-organismes particuliers tout en inhibant la croissance d'autres espèces ou d'isolats d'une même espèce (ex : Géloses Mac Conkey, éosine-bleu de méthylène qui sélectionnent les bactéries Gram-négatives).

4- Milieux différentiels: Qui permettent de distinguer différents groupes de bactéries et même d'identifier des micro-organismes sur la base de leurs caractéristiques.

Ex : 1) Gélose au sang : Bactéries hémolytiques versus non-hémolytiques

2) Gélose Mac Conkey : Bactéries qui fermentent ou pas le lactose

VI-1- Notions

Colonie bactérienne : Une colonie est constituée d'individus tous semblables nés d'une seule cellule, c'est une culture pure.

Isolement : Isoler une bactérie d'un mélange c'est l'obtenir en culture pure. Ça consiste à provoquer la formation de colonies isolées. La technique d'isolement repose sur le principe d'épuisement de la suspension bactérienne. Il existe plusieurs méthodes d'isolement telles que la méthode des quadrants, méthodes des stries...etc.

Ensemencement: L'ensemencement a pour but de porter des microorganismes sur un milieu de culture neuf, solide ou liquide.

VI-2- Les caractères cultureux

L'aspect macroscopique des colonies est le caractère primaire utilisé pour orienter l'identification bactérienne. Les critères comme la taille des colonies, leur forme (punctiforme, ronde régulière, dentelée irrégulière...) et leur aspect sont recherchés. L'aspect *rough* "R" est attribué aux colonies rugueuses à surface irrégulière, l'aspect *Smooth* "S" pour les colonies lisses, brillantes et régulières et l'aspect muqueux "M" pour les colonies grasses et coulantes.

La forme et l'aspect des colonies dépend des facteurs intrinsèques à la bactérie comme la mobilité, morphologie (taille, forme, contour), production d'une capsule, pigmentation, présence de fibrine...etc., et des facteurs extrinsèques tels que les gradients de solutés créés autour de la colonie et la présence de colorants dans le milieu de culture.

Chapitre V : Croissance bactérienne

I- Définition

La définition de la croissance tout comme la reproduction diffère entre les procaryotes et les eucaryotes. En effet, l'organisme procaryote est composé d'une seule cellule avec généralement un type de reproduction appelé scissiparité. Donc, si on considère la croissance d'une seule cellule bactérienne, elle peut être définie par l'augmentation de la taille, de la masse et du volume bactérien. Cependant, si on associe la croissance bactérienne au phénomène de division cellulaire, celle-ci est alors définie par l'accroissement du nombre de cellules (nombre d'individus) d'une population. La scissiparité est une division cellulaire relativement simple qui nécessite une réplication du chromosome, allongement de la cellule, augmentation de la taille et de la quantité des constituants cellulaires et finalement la mise en place d'un septum au milieu de la cellule parentale divisant équitablement son contenu en donnant naissance ainsi à deux cellules filles (Figure 39)

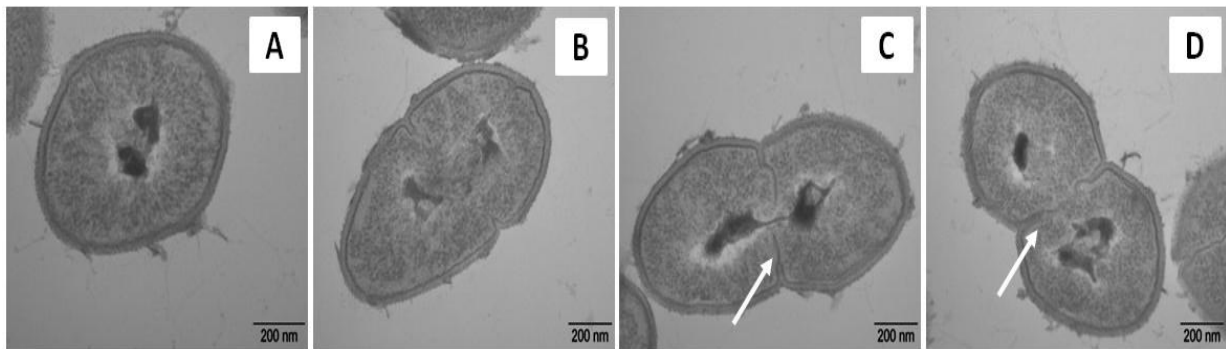


Figure 39 : Etapes de la division cellulaire par scissiparité chez *Enterococcus faecalis* observées par un microscope électronique à transmission. A: réplication de l'ADN chromosomique, B: Augmentation de la taille et de la quantité des constituants cellulaires, C: Apparition du septum (flèche), D: Septum mis en place (flèche) entre deux cellules filles.

D'autres types de reproduction ont été décrits chez les bactéries. Certaines bactéries du genre *Streptomyces* forment des filaments multinucléés qui se divisent pour donner des spores mononucléées. D'autres bactéries comme certaines cyanobactéries, subissent des divisions multiples et les cellules filles appelées baeocytes sont maintenues dans la paroi de la cellule parentale et finissent par être libérées. Quelques bactéries comme le genre *Hyphomonas*, se reproduisent en formant un bourgeon à l'extrémité de leur prosthèque (Prescott *et al.*, 2013).

II- Mesure de la croissance bactérienne

Lors de la croissance bactérienne, le nombre et la masse cellulaire augmente. Il existe plusieurs méthodes qui permettent la mesure et le suivi de ce processus.

II-1- Dénombrement au microscope

Le dénombrement au microscope est une technique de comptage direct des bactéries. Elle est plus adaptée pour les microorganismes de grandes tailles (plusieurs μm). Le comptage se fait sous observation microscopique en utilisant des lames spécifiques ayant des quadrillages et des puits microscopiques permettant de dénombrer le nombre de cellules se trouvant dans une surface et un volume donné, puis déduire la concentration cellulaire. Les cellules utilisées pour ce type de dénombrement sont les cellules de Malassez, de Thoma, de Petroff-Hausser de Breed ...etc (Figure 40). Enfin, cette technique est directe et rapide mais peu sensible. En effet, elle ne distingue pas entre les cellules mortes et celles vivantes.

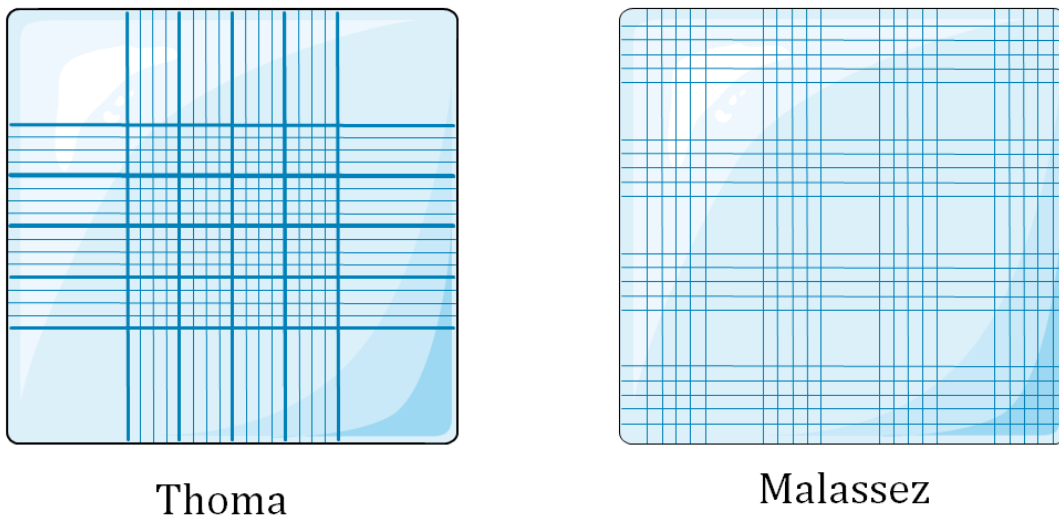


Figure 40 : La cellule de Thoma et la cellule de Malassez

II-2- Epifluorescence

La technique de l'épifluorescence implique l'application d'une coloration par un fluorochrome (ex : acridine orange) qui se fixe sur l'ADN donnant ainsi une fluorescence sous la lumière ultra-violette. Cette méthode est plus appropriée aux cellules bien séparées et donc inapplicable aux microorganismes formant des chaînettes ou des mycéliums (Meyer *et al.*, 2000). La couleur verte reflète les cellules vivantes alors que la couleur rouge reflète les

cellules mortes (ADN dénaturé). Cependant, la cellule vivante en pleine réplication subit une dénaturation de son ADN ce qui reflète une couleur rouge et rentre en confusion avec les cellules mortes.

II-3- Compteur de particules

Le compteur de particule est un appareil qui réalise automatiquement le dénombrement des cellules en suspension dans une solution électrolytique. Le principe repose sur un déplacement de volume de solution conductrice dans un microorifice (tube cylindrique) se trouvant entre deux électrodes reliées à un générateur électrique. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle compte toutes les particules (cellules) ayant relativement la même taille y compris celle mortes.

II-4- Dénombrement après culture

Le dénombrement après culture est une méthode classique appliquée en routine dans les laboratoires de microbiologie. Elle présente l'avantage de dénombrer uniquement les cellules vivantes qui peuvent former des colonies visibles à l'œil nu. Elle est d'une grande utilité dans les tests de survie aux antibiotiques où seules les bactéries qui échappent à l'action létale de l'antibiotique peuvent survivre et donner des colonies. Le procédé expérimental consiste tout d'abord à la réalisation d'une série de dilutions décimales selon la concentration de la solution mère contenant l'échantillon dont le dénombrement est souhaité. Plus la solution mère est concentrée en bactéries, plus le nombre de dilutions nécessaires est élevé. Par la suite, un volume précis est mis dans une boîte de Pétri contenant un milieu nutritif. Après isolement (soit en surface ou en masse), les boîtes sont incubées à une température favorable pour la croissance de l'échantillon. Enfin, chaque bactérie isolée formera une UFC (unité formant colonie) visible à l'œil nu (Figure 41). Le nombre total de bactéries est calculé par le nombre d'UFC multiplié par le volumeensemencé et l'ensemble est divisé par la dilution dans laquelle le nombre d'UFC est calculé. Cependant, la rigueur oblige d'ensemencer deux boîtes par dilution et le nombre est calculé selon la formule de la moyenne pondérée.

$$N = \frac{\sum c}{V \times [n1 + (0,1 \times n2)] \times d}$$

N : nombre de microorganismes/ml de suspension

Σc : la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de 2 dilutions successives (les boîtes retenues doivent avoir entre 15 et 300 CFU).

V : le volume de l'inoculum ensemencé en ml. (Généralement 1 ml)

$n1$: le nombre de boîtes retenues à la première dilution

$n2$: le nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution

d : la dilution correspondant à la première dilution retenue

NB : Il est à noter que cette technique est valable uniquement pour les micro-organismes viables et cultivables. En effet, certains micro-organismes sont viables mais non cultivables.

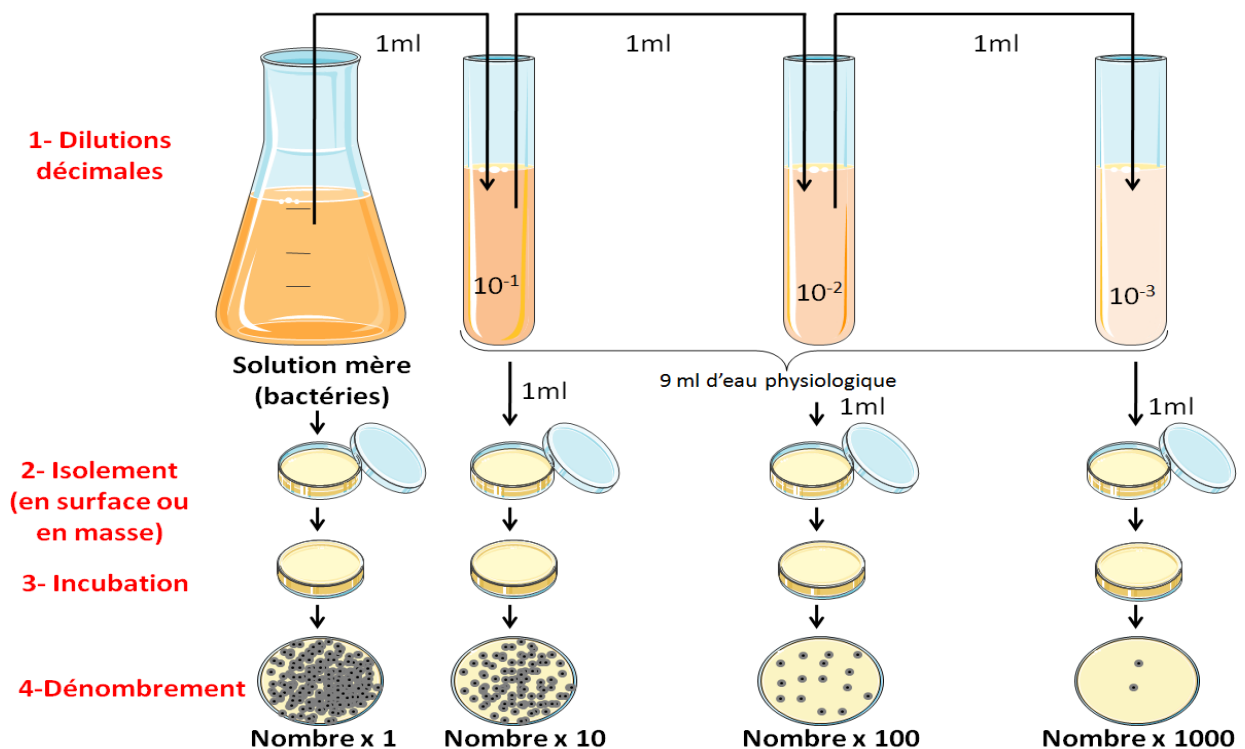


Figure 41 : Dénombrement après culture des bactéries

II-5- Mesure de la masse

Afin de mesurer la biomasse bactérienne, les bactéries sont récupérées soit par centrifugation ou par filtration (1-5 μm). Après un lavage à l'aide d'un tampon approprié (ex: 0,9% NaCl), le culot ou le filtrat est séché à 100-110°C puis pesé après refroidissement. Cette technique est peu précise car il n'y a pas de distinction entre les cellules mortes et celles vivantes néanmoins, elle permet la détermination de paramètres spécifiques (vitesse de croissance, taux de production de métabolites).

II-6- Mesure du trouble

La mesure du trouble ou de turbidité bactérienne est une méthode optique de référence. Le principe repose sur la dispersion de la lumière incidente par l'échantillon. L'absorbance ($A = \text{Log}(I_0/I)$) est proportionnelle à la concentration de l'échantillon.

$$\text{Log}(I_0/I) = K.C.L$$

I_0 : intensité de la lumière incidente. I : Pourcentage de la lumière absorbée.

K : Coefficient d'absorption. C : La concentration de l'échantillon.

L : La longueur de la cuve (généralement 1 cm).

La mesure du trouble est une technique simple, rapide et facile. Cependant, et comme le principe est basé sur l'absorption de la lumière, les milieux colorés ne sont pas pratiques pour une telle mesure. De plus, cette technique ne distingue pas les cellules vivantes de celles mortes.

II-7- Filtration sur membrane

Les bactéries peuvent être filtrées sur des membranes spécifiques ayant des diamètres beaucoup plus petits que la taille de la plupart des bactéries. Il s'agit d'un procédé de séparation physique se déroulant en phase liquide. Le but est de purifier, fractionner ou concentrer des micro-organismes dissous ou en suspension dans un solvant à travers d'une membrane.

II-8- Mesure des constituants cellulaires

La mesure des constituants cellulaires est l'une parmi plusieurs techniques moléculaires qui permettent de détecter et dénombrer des cellules viables mais non cultivables. Cette technique rapide et sensible, repose sur le dosage d'un constituant cellulaire (marqueur) de choix qui caractérise uniquement les cellules vivantes (ex : ATP). Le constituant cellulaire choisi devrait, être ubiquiste et disparaître rapidement des cellules après leur mort. De plus, il ne doit pas être présent dans le milieu dans lequel sont cultivées les bactéries. La Bioluminescence de l'ATP (adénosine 5' triphosphate) ou du nucléotide flavinique (DAD, FMN) est largement utilisée.

II-9- Mesure de l'activité cellulaire

En plus de toutes les techniques brièvement décrites, la croissance bactérienne peut également être quantifiée par la mesure de l'activité cellulaire. Cette dernière peut être suivie par la mesure de la consommation d'un substrat dans le milieu (source de C et N, O ...), mesure des produits d'excrétion (métabolites primaires : acides aminés, et acides organiques) ou par la mesure de la variation physicochimique du milieu. (pH, couleur...)

III- Cinétique de croissance

III-1- Paramètres de croissance

III-1-1- Temps de génération

Le temps de génération (G) est le temps nécessaire à une bactérie pour se diviser. Il est calculé comme suit : $G = t/n$ avec t : temps en minute et n : nombre de divisions. Par exemple, le temps de génération de *E. coli* est 20 minutes (60 mn/ 3divisions) et celui de *Mycobacterium tuberculosis* est de 800 – 900 minutes.

III-1-2- Taux de croissance

Le taux de croissance (μ) est défini par le nombre de divisions par unité de temps (en heure). Il est calculé comme suit : $\mu = n/t$ avec n : nombre de divisions et t = temps connu en heure. De ce fait, le taux de croissance d'*E. coli* : $\mu = (3/1) = 3$ et celui de *M. tuberculosis* est $\mu = 0,075$.

III-1-3- Paramètres physico-chimiques

La croissance bactérienne est influencée par les mêmes paramètres physico-chimiques qui influencent la nutrition. Parmi ces paramètres, on cite la température, le pH, l'oxygène, l'activité de l'eau, la nature du substrat...etc. (voir le chapitre sur la nutrition bactérienne).

III-2- Courbe de croissance dans un système fermé

Une culture en "batch" ou discontinue est la culture des micro-organismes dans un système fermé (milieu liquide ou solide contenant une quantité définie en nutriments). La courbe résultante est constituée de 4 phases essentielles à savoir; la phase de latence, phase exponentielle, phase stationnaire et phase de déclin (Figure 42).

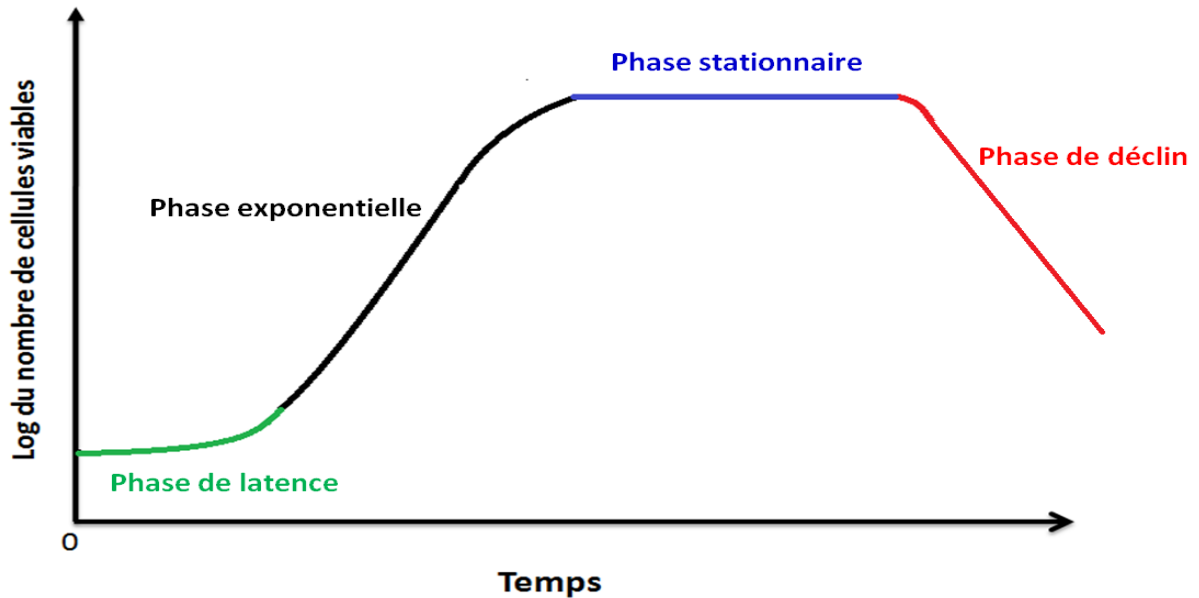


Figure 42 : Courbe de croissance dans un système fermé.

III-2-1- La phase de latence

La phase de latence (Figure 42) est caractérisée par un taux de croissance nul ($\mu = 0$). C'est une phase nécessaire à la bactérie pour s'adapter à son nouveau milieu (nouvelles conditions). Pendant cette phase, les cellules synthétisent de nouveaux composants cellulaires préparant la bactérie pour entamer le processus de la division cellulaire. A la fin de cette phase, le taux de croissance devient positif; certains auteurs l'appellent phase d'accélération. La durée de la phase de latence varie selon les micro-organismes, leur âge, la concentration de la population du départ (inoculum) et la nature du milieu. Dans certains cas, cette phase peut être très courte ou même absente.

III-2-2- La phase exponentielle

Pendant la phase exponentielle (figure 42), chaque organisme se divise à un moment légèrement différent pour donner une allure constante. La population est presque uniforme en termes de propriétés chimiques et physiologiques. Le taux de croissance est constant et atteint sa valeur maximale. Le taux de croissance peut être calculé par la pente de la droite correspondante à cette phase sur laquelle on désigne deux points 1 et 2 (chaque point est défini avec une valeur sur l'axe des abscisses et une valeur sur l'axe des coordonnées) et la relation est

comme suit : $\mu_{\text{expo}} = (\log X_1 - \log X_2) / (t_1 - t_2)$. Si le taux de croissance est connu, le temps de génération peut être déduit étant $\mu = 1/g$.

L'expression mathématique de la croissance des populations se reproduisant par scissiparité est $N_t = N_0 \cdot 2^n$ où N_0 est le nombre de cellules de la population initiale et le N_t correspond au nombre de cellules de la population après n générations à l'instant t .

NB : A la fin de la phase exponentielle, le taux de croissance diminue. Cette phase est appelée phase de décélération.

III-2-3- La phase stationnaire

Suite à la fin de la phase exponentielle de croissance, les bactéries entament la phase stationnaire (Figure 42). Lors de cette dernière, le nombre total de micro-organismes viables demeure constant et donc le taux de croissance est nul ($\mu = 0$).

Cette phase serait le résultat de perturbations physiologiques. Parmi les principales raisons est que la population atteint une densité critique et la disponibilité des éléments nutritifs est limitée. De plus, il ya accumulation de déchets toxiques et probablement une disponibilité limitée en oxygène (notamment pour une population dense de bactéries aérobie strict).

III-2-4- La phase de déclin

Lors de la phase de déclin, appelée également phase de mortalité, (Figure 42), les bactéries perdent irréversiblement leur capacité à se reproduire et les cellules meurent à un rythme exponentiel. Le taux de croissance dans cette phase est inférieure à 0 ($\mu < 0$). Dans certains cas, le taux de mortalité diminue dû à une accumulation de cellules résistantes.

Plusieurs théories actuelles proposent une explication différente de la phase de déclin. Une des théories suggère que les bactéries dans cette phase ne meurent pas, elles deviennent plutôt des bactéries viables mais non cultivables dans les conditions du laboratoire, et ce en déclenchant des mécanismes génétiques. D'autres théories décrivent la phase de déclin comme étant une phase de mort cellulaire programmée. Pendant cet événement, une fraction de micro-organismes est programmée pour s'autodétruire et les nutriments libérés permettent aux autres cellules, n'ayant pas encore entamé leur suicide, de se développer. Comme si certaines bactéries se sacrifient au bénéfice d'une population plus importante.

III-3- La culture continue

La culture continue des micro-organismes est faisable dans un système ouvert. Dans ce système, il ya approvisionnement constant en nutriments. De plus, les déchets sont retirés à un rythme constant. La culture dans un système ouvert permet le maintient de la croissance des cellules dans la phase exponentielle.

La culture continue est utilisée pour obtenir des corps bactériens de même âge avec les mêmes propriétés physico-chimiques et physiologiques. Elle est très importante notamment dans la préparation en grande quantité des vaccins bactériens, des métabolites bactériens (vitamines, antibiotiques...etc.) ou des toxines bactériennes (préparation d'anatoxines).

Ces conditions sont réalisées en laboratoire ou en industries dans des systèmes de culture continue. Parmi les principaux systèmes utilisés; les chémostats et les turbidostats.

III-3-1- Le chémostat

Le système de culture continue réalisé par un chémostat permet l'introduction du milieu stérile dans la chambre de culture avec un rythme égale à celui d'élimination du milieu contenant les micro-organismes (déchets). Dans ce système, un élément nutritif essentiel (ex : vitamine) est fourni en quantité limitée. Donc, la vitesse de croissance est déterminée par la vitesse à laquelle le milieu frais est ajouté et la densité cellulaire dépend de concentration de l'élément nutritif essentiel existant en quantité limitée.

III-3-2- Turbidostat

Le principe de culture continu d'un système turbidostat repose sur un la mesure de la turbidité de la culture (contenue dans une chambre de culture) par une cellule photoélectrique. Le milieu frais est rajouté automatiquement à une vitesse pour maintenir une turbidité stable. A l'inverse du chémostat, tous les éléments nutritifs sont en excès dans le turbidostat.

Chapitre VI : Agents antimicrobiens

I- Définition et notions

Les agents antimicrobiens désignent toutes substances ou procédés qui inhibent ou tuent les micro-organismes. Le suffixe *-cide* est attribué aux agents qui tuent (ex : Germicides, bactéricides, fongicides, algicides et virucides), tandis que le suffixe *-statique* est accordé aux agents qui inhibent la croissance (ex: bactériostatiques et fongistatiques...etc.).

Les opérations et les mesures permettant d'éliminer temporairement ou définitivement les micro-organismes sont définis par la norme AFNOR NFT 72-101.

1. Stérilisation : Opération au résultat durable visant à détruire tous micro-organismes (cellules vivantes, spores viables et entités acellulaires)

2. Désinfection : Opération au résultat momentané visant à détruire ou inhiber les micro-organismes et/ou d'inhiber l'activité des virus présents sur une surface inerte.

3. Antiseptie: Opération au résultat momentané visant à détruire ou inhiber les micro-organismes et/ou d'inhiber l'activité des virus présents sur des tissus vivants, selon leur seuil de tolérance.

4. Asepsie: Ensemble des mesures empêchant tout apport exogène de micro-organismes. La stérilisation et la désinfection sont des moyens pour réaliser l'asepsie.

II- Agents physiques

Ils existent plusieurs agents physiques qui permettent l'élimination efficace des micro-organismes. Les agents couramment utilisés dans les laboratoires, les industries et centres de santé sont; la température, les radiations, la pression, la centrifugation, la filtration et les ultrasons.

II-1- Température

II-1-1- Effet des hautes températures

Deux types de température sont utilisés pour la stérilisation des matériaux, produits et milieux de culture. Le premier type est la chaleur sèche qui nécessite des températures plus élevées et des temps d'exposition plus longs (ex four Pasteur : 180° pendant 30 mn utilisé pour la stérilisation de la verrerie). Le deuxième type est la chaleur humide qui tue facilement les différents types de micro-organismes (virus, bactéries, champignons). En effet, elle dégrade les acides nucléiques, dénature les protéines et brise les membranes (ex : l'autoclave : 120° pendant 15 à 20 mn)

Applications de la chaleur humide en industrie

➤ **La pasteurisation** : Découverte par Pasteur en 1860, consiste à un chauffage modéré permettant la destruction des germes pathogènes fréquemment présents dans le lait ou ses dérivés, les jus de fruits...etc. La flash-pasteurisation est également un procédé fréquent dans l'industrie agro-alimentaire, elle consiste à un chauffage rapide à une température élevée (72°C pour 15 secondes) suivi par un refroidissement rapide.

➤ **La tyndallisation**: Opération décrite par Tyndall: Elle consiste à chauffer un milieu à 60-70°C pendant 30 à 60 minutes trois fois consécutives en laissant un intervalle de 24 heures entre chaque chauffage. Ce procédé permet d'éliminer les micro-organismes thermostables mais aussi les spores bactériennes. Le premier traitement sert à l'activation des spores, et une fois celles-ci germent et reprennent leur vie végétative, elles deviennent thermosensibles et donc facilement éliminées par le deuxième et troisième traitement à la chaleur.

D'autres méthodes de traitement à la chaleur sont très efficaces dans l'élimination des bactéries dans les produits complexes telle que la stérilisation à température ultra-élevée de 140 à 150°C pour 1 à 3 secondes.

II-1-2- Effet des basses températures

La congélation inhibe la reproduction microbienne due à une absence d'eau sous forme liquide. Certains micro-organismes sont tués par la rupture des membranes causée par la formation de cristaux de glace. Quant à la réfrigération, elle réduit uniquement la croissance bactérienne.

II-2- Radiations

Plus la longueur d'onde des radiations électromagnétiques est petite, plus l'énergie de radiation augmente. De ce fait, l'ordre croissant de l'énergie émise est; les rayons gamma γ > les rayons X > les rayons ultra-violet > les rayons visibles > les rayons infrarouges > les rayons micro-Ondes > les rayons des ondes radio. Les radiations ionisantes X et gamma détruisent les molécules d'ADN. Ces rayonnements stérilisent à froid des antibiotiques, des hormones ou des objets en plastiques à usage unique qui ne peuvent pas être traités à la chaleur. Les radiations non ionisantes UV engendrent des altérations au sein des acides nucléiques (formation de dimères de thymine). Ce procédé est utilisé pour la stérilisation des salles de chirurgie ou la décontamination de surfaces de travail.

II-3- Pression

Les ultrapressions sont capables de détruire les microorganismes. Le traitement d'aliments à 4 000 bars permet de réduire sensiblement leur teneur en microorganismes. L'augmentation de la pression osmotique (diminution de la disponibilité de l'eau) est un procédé ancestral pour la conservation des aliments (ex : utilisation des concentrations élevée en NaCl ou en sucres).

II-4- Centrifugation

Dans un milieu liquide, on peut éliminer les particules et les bactéries grâce à des appareils permettant une accélération du phénomène de sédimentation de l'ordre de 5000g. En industrie, le procédé de bactofugation consiste à centrifuger le lait pour en éliminer la plus grande partie des microorganismes, il est utilisé en complément de la pasteurisation. Dans la recherche, afin de récupérer des métabolites secrétées par un micro-organisme (ex : un antibiotique), les micro-organismes sont éliminés par centrifugation et le surnageant contenant les métabolites d'intérêt est récupéré.

II-5- Filtration

Pour les substances notamment celles qui sont thermosensibles, la filtration est une excellente méthode pour réduire la population microbienne. La filtration est également utilisée pour stériliser l'air. Le principe de la filtration repose sur l'utilisation des membranes filtrantes ayant des diamètres trop petits pour être traversées par des bactéries. La filtration garde la solution intacte contrairement à l'effet de la chaleur qui pourrait induire des modifications des

caractéristiques. Dans les laboratoires de microbiologie, l'utilisation des hottes de sécurité biologique à flux laminaire permet d'obtenir une surface de travail stérile pour les manipulations en condition d'asepsie.

II-6- Ultrasons

La gamme de fréquences des ultrasons se situe entre 20 000 et 10 000 000 Hertz, trop élevées pour être perçues par l'oreille humaine. L'ultrason est une onde mécanique qui se propage au travers de supports fluides, solides, gazeux ou liquides. Les ultrasons sont généralement utilisés pour lyser les cellules bactériennes

III- Agents chimiques

Depuis longtemps, plusieurs agents chimiques étaient utilisés comme des antimicrobiens. Dans cette catégorie des agents se trouvent les oxydants, les alcools, les métaux lourds et leurs sels, les savons et détergents, les colorants et conservateurs, les composés phénoliques, les aldéhydes et les gaz stérilisants

Les principaux oxydants utilisés sont l'eau oxygénée, le chlore et ses dérivés (hypochlorite de sodium ou eau de Javel, Dakin), les halogénés (fluor, brome, iode). Pour les alcools, les antiseptiques alcooliques les plus employés sont l'éthanol et l'iso-propanol. Concernant les métaux lourds et leurs sels, les sels de mercure sont d'excellents antiseptiques, les sels d'argent sont surtout utilisés en ophtalmologie. Les gaz stérilisants comme le formol et l'oxyde d'éthylène sont largement utilisés notamment dans les chambres chirurgicales des hôpitaux. Le gaz bêta-propiolactone est utilisé dans la stérilisation d'objets chirurgicaux et enfin l'ozone est exploité dans le procédé de potabilisation des eaux.

IV- Agents biochimiques et modes d'action

IV-1- Définition

La troisième catégorie des antimicrobiens, après les agents physiques et les agents chimiques, est celle des agents biochimiques, également appelés agents chimio-thérapeutiques ou simplement, les antibiotiques.

En 1929, Fleming observe sur une boîte de Pétriensemencée avec des Staphylocoques, des colonies d'une moisissure *Penicillium notatum*, contaminant provoquant une inhibition de

la croissance des bactéries en culture. Il mit alors en évidence la **pénicilline** utilisée en thérapeutique comme première molécule antibiotique.

Beaucoup de micro-organismes sont connus pour être des producteurs d'antibiotiques. Certaines bactéries telles que le genre *Streptomyces*, produisent les antibiotiques ; streptomycine, néomycine, érythromycine, kanamycine..., le genre *Bacillus* produit la bacitracine, les polymyxines...etc. Certaines moisissures sont également des producteurs d'antibiotiques comme le genre *Penicillium* qui produit la pénicilline, la griséofulvine...etc.

Par définition, les antibiotiques sont des agents antibactériens naturels d'origine biologique et/ou synthétique et/ou semi-synthétique, empêchant la multiplication des bactéries (bactériostase) ou entraînant leur destruction (bactéricidie), par une action au niveau d'une étape métabolique indispensable à la vie de la bactérie

IV-2- Cibles des antibiotiques

Les antibiotiques ont comme cibles les éléments structuraux constants de la bactérie. Certains antibiotiques inhibent la synthèse de la paroi bactérienne, d'autres inhibent la synthèse de la membrane cytoplasmique, d'autres molécules empêchent la réplication d'ADN, certains d'autres inhibent la synthèse des protéines et d'autres antibiotiques inhibent la synthèse de certains composés cytoplasmiques ayant un rôle vital pour la bactérie (Figure 43).

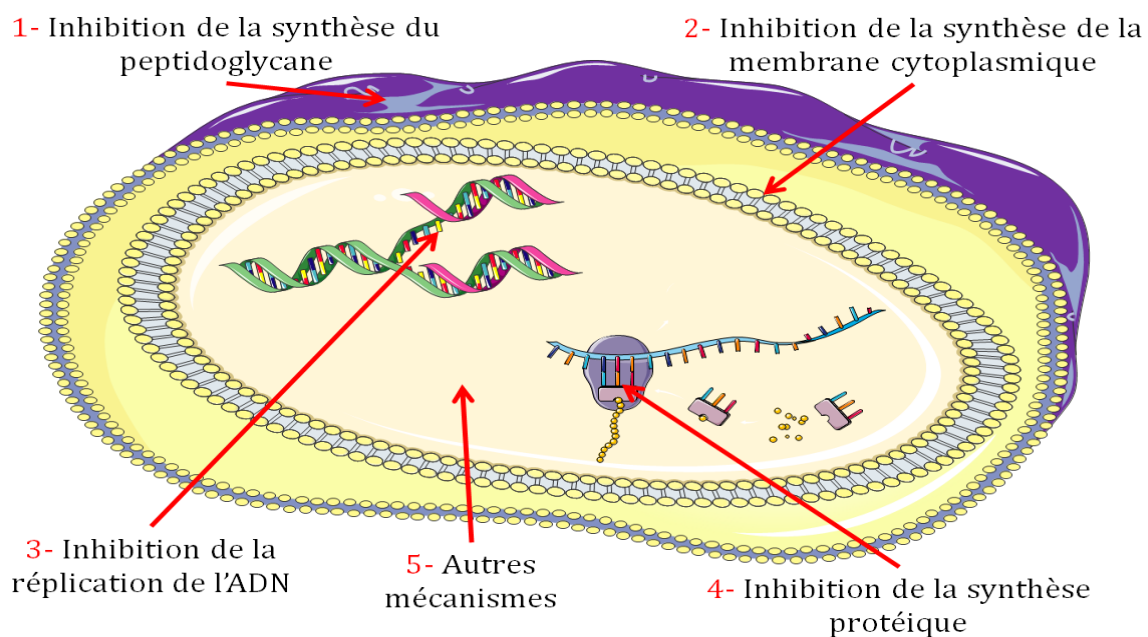


Figure 43: Les différentes cibles des antibiotiques

IV-3- Modes d'action des antibiotiques

IV-3-1- Inhibiteurs de la synthèse de la paroi

Les familles d'antibiotiques les mieux connues et qui interfèrent la synthèse de la paroi bactérienne sont les β -lactamines, fosfomycine et les glycopeptides.

β -lactamines : Les β -lactamines (comme les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes, les monobactames...etc.) se fixent sur des protéines liant la pénicilline (PLP ou PBP : *penicillin binding protein*) qui sont principalement des enzymes (carboxypeptidases) qui interviennent dans l'assemblage du peptidoglycane.

Fosfomycine: La fosfomycine agit sur la pyruvate-N-acétylglucosamine-transférase, enzyme permettant de constituer les précurseurs du peptidoglycane

Glycopeptides : Les glycopeptides (comme la vancomycine et la teicoplanine) inhibent la synthèse du peptidoglycane en formant des complexes avec les résidus peptidyl D-Ala-D-Ala des précurseurs du peptidoglycane lorsqu'ils sortent de la membrane cytoplasmique.

IV-3-2- Inhibiteurs de la synthèse de la membrane cytoplasmique

La famille des polymyxines (Ex : colistine) et celles des gramicidines et tyrocidines détruisent la membrane cytoplasmique comme un détergent. Elles interagissent avec les constituants membranaires ce qui augmente la perméabilité membranaire et provoque ainsi la fuite du contenu intracellulaire menant à la mort cellulaire. Ces antibiotiques sont de nature polypeptidique.

IV-3-3- Inhibiteurs de la réplication d'ADN

La famille des quinolones (comme l'acide nalidixique, l'acide oxolinique et l'acide pipémidique) et celle des fluoroquinolones (comme la norfloxacine, l'ofloxacine et la ciprofloxacine), inhibent de la réplication de l'ADN en antagonisant la sous-unité A de la gyrase (enzyme clé de la réplication d'ADN).

IV-3-4- Inhibiteurs de la synthèse des protéines

La synthèse des protéines est une cible de plusieurs classes d'antibiotiques depuis la transcription d'ARNm jusqu'à la terminaison de traduction. On cite :

La rifampicine : Elle bloque la transcription par la liaison à la sous-unité β de l'ARN-polymérase bactérienne

Les inhibiteurs de la sous-unité 50S : Comme les macrolides (ex: Erythromycine), les lincosamides, les streptogramines, les phénocolés, les oxazolidinones.

Inhibiteurs de la sous-unité 30S : Comme les tétracyclines, les aminoglycosides (ex : gentamicine, kanamycine, streptomycine).

La mupirocine : Inhibe de manière compétitive l'enzyme isoleucyl tRNA synthétase.

L'acide fusidique : Se fixe au facteur EF-G d'élongation de la traduction empêchant ainsi la fixation des amino-acyl-ARNt.

IV-3-5- Autres mécanismes

Les sulfamides sont des molécules structurellement semblables à l'acide p-aminobenzoïque, qui participe à la synthèse de l'acide folique, nécessaire à la synthèse des purines et des pyrimidines. Cette compétition conduit à l'arrêt de la croissance des bactéries.

IV-4- Spectre d'activité des antibiotiques

On désigne par le spectre d'activité d'un antibiotique, la liste des espèces vis-à-vis desquelles il exerce son pouvoir bactéricide ou bactériostatique. Par exemple les aminosides présentent un spectre large incluant les cocci et bacilles à Gram positif (sauf les streptocoques), les cocci et bacilles à Gram négatif et les mycobactéries. A l'inverse, les glycopeptides présentent un spectre d'activité étroit incluant uniquement les bactéries à Gram positif et principalement les staphylocoques, les entérocoques et *Clostridium*.

IV-5- Association des antibiotiques

L'association des antibiotiques n'est pas mathématique. On peut assister à des phénomènes de synergie, d'additivité, d'indifférence ou d'antagonisme. Si on considère deux antibiotiques A et B, les résultats des phénomènes cités est comme suit:

La synergie : Effet de $(A+B) > \text{effet A} + \text{effet B}$

L'additivité : Effet de $(A+B) = \text{effet A} + \text{effet B}$

L'indifférence : Effet de $(A+B) = \text{effet A}$ ou effet B

L'antagonisme : Effet de $(A+B) < \text{effet A} + \text{effet B}$

Dans la thérapeutique, on évite l'association des médicaments ayant un effet indifférent ou un effet antagoniste. Les associations synergiques ou additives sont plutôt recherchées.

IV-6- L'antibiogramme et CMI

Les espèces et les souches de micro-organismes ne réagissent pas toutes de la même façon aux antibiotiques des différentes familles. Chaque antibiotique possède un spectre d'activité plus ou moins élargi et des résistances naturelles ou acquises peuvent se manifester chez les bactéries. Il est donc important pour les cliniciens de bien connaître l'identité du microbe ainsi que l'antibiotique qui donnera les meilleurs résultats. On peut évaluer la sensibilité d'un microorganisme aux antibiotiques et à d'autres agents chimio-thérapeutiques par la technique de dilution en tube ou par l'antibiogramme. La première méthode détermine la plus petite quantité d'antibiotique nécessaire pour inhiber la croissance de l'organisme *in vitro*. C'est la concentration minimale inhibitrice ou CMI. Afin de déterminer la CMI, les tubes de milieu de culture doivent être ensemencés au même temps que l'antibiotique est rajouté (Figure 44). Dans le gradient de concentration de l'antibiotique utilisé, la CMI correspond à la plus petite concentration ayant inhibé la croissance dans le milieu.

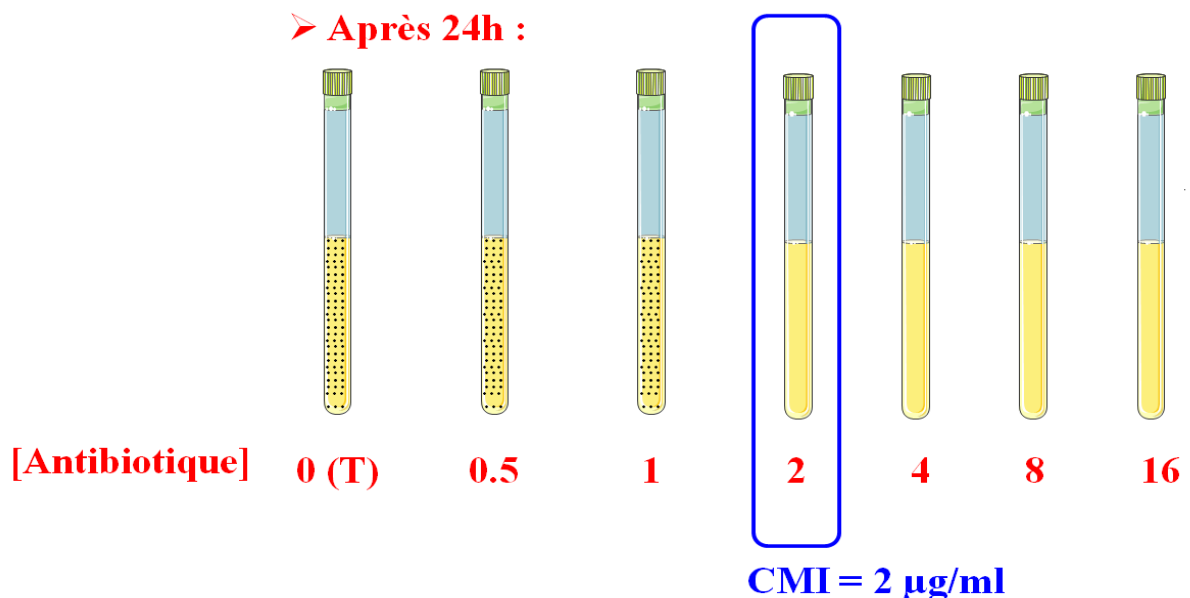


Figure 44: Détermination de la CMI par la technique de dilution en tube

La méthode de l'antibiogramme est la technique la plus couramment utilisée pour évaluer la sensibilité des microorganismes aux agents chimio-thérapeutiques. Cette technique consiste à mettre en contact des souches bactériennes en présence de plusieurs antibiotiques. Ceci nous permet alors de connaître le spectre des antibiotiques. En fonction des diamètres des zones d'inhibition, on peut classer les microorganismes vis-à-vis d'un antibiotique donné, en : sensibles(S), résistants(R) ou intermédiaires(I) (Figure 45).

L'antibiogramme en milieu solide peut servir à la détermination des CMI sur la base des courbes de concordances préétablies. La SFM : Société Française de Microbiologie a établie un guide de références pour déterminer les diamètres critiques ainsi que les catégories cliniques (S, R ou I) pour chaque antibiotique.

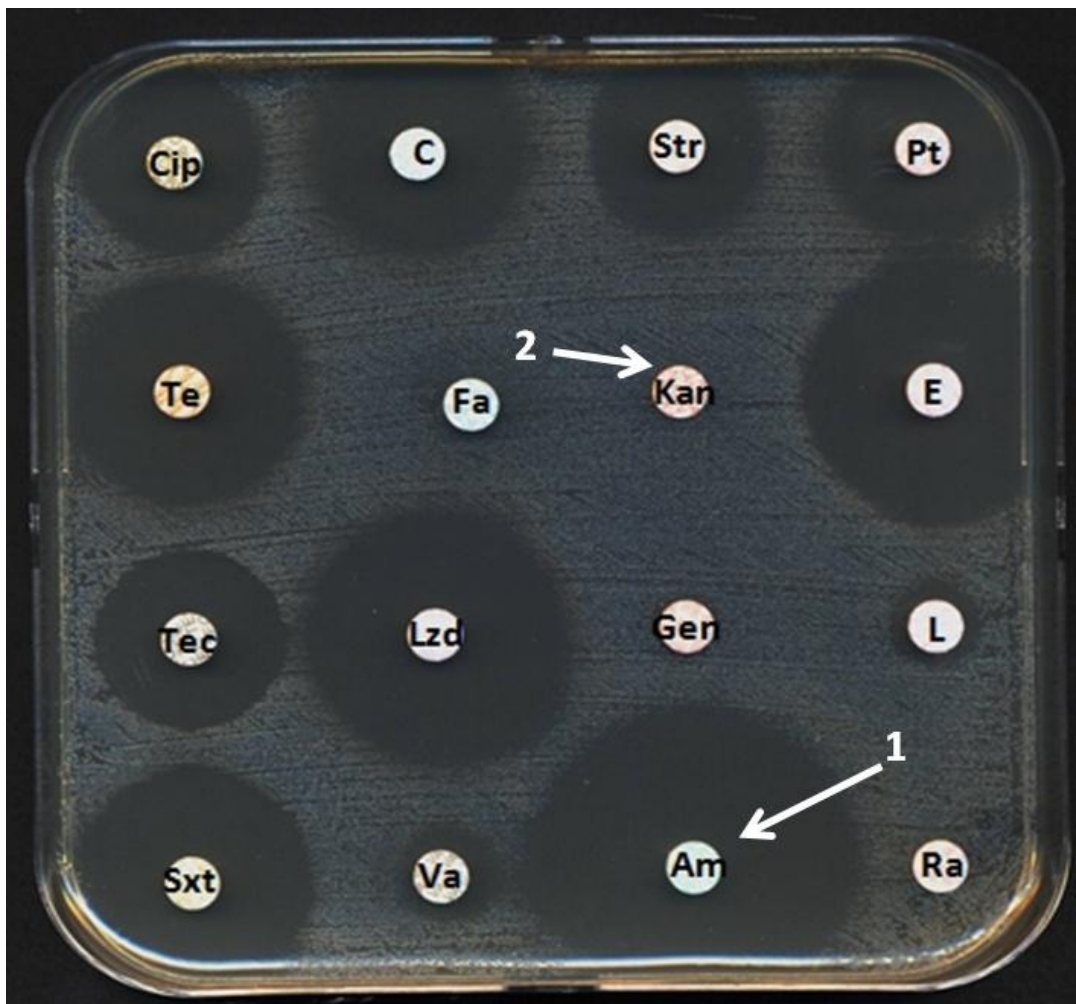


Figure 45 : Antibiogramme. Résultat d'un antibiogramme d'une souche d'*Entérocooccus faecalis* vis-à-vis 16 antibiotiques. 1- phénotype de sensibilité à l'ampiciline traduit par une grande zone d'inhibition. 2 : phénotype de résistance à la kanamycine traduit par une absence de zone d'inhibition.

Actuellement, il existe d'autres méthodes qui permettent la détermination de la CMI. Le E-test est une bandelette chargée d'un gradient de concentration d'antibiotique. Après mise en culture, la bactérie pousse tout autour de la bandelette. Le seuil de concentrations inhibant la croissance bactérienne est la CMI (Figure 46).

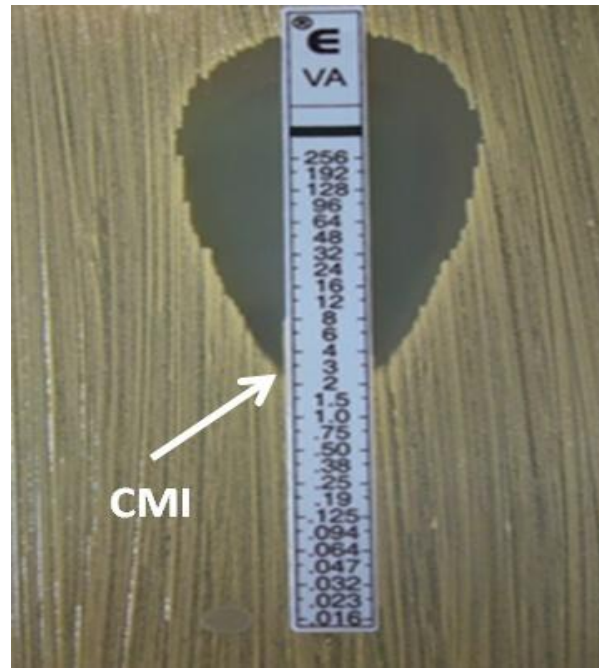


Figure 46 : Détermination de CMI par le E-test. Résultat d'un E-test à la vancomycine d'un *Staphylococcus aureus*. La CMI est de 2.5 µg/ml de vancomycine.

IV-7- Concentration minimale bactéricide

La CMB, concentration minimale bactéricide, est la plus petite concentration d'antibiotique capable de tuer 99.99% de bactéries existantes dans une culture. C'est une valeur très importante dans le domaine clinique. En effet, il est question d'utiliser la plus petite concentration en antibiotique donnant un résultat très efficace afin de remédier aux problèmes de toxicité des antibiotiques sur les cellules eucaryotes. Au laboratoire, cette valeur est déterminée par l'application de concentrations croissantes d'antibiotique sur des cultures identiques de 18 à 24 heures. Après incubation de 24h, la concentration d'antibiotique qui tue 99.99% de bactéries est la CMB (Figure 47)

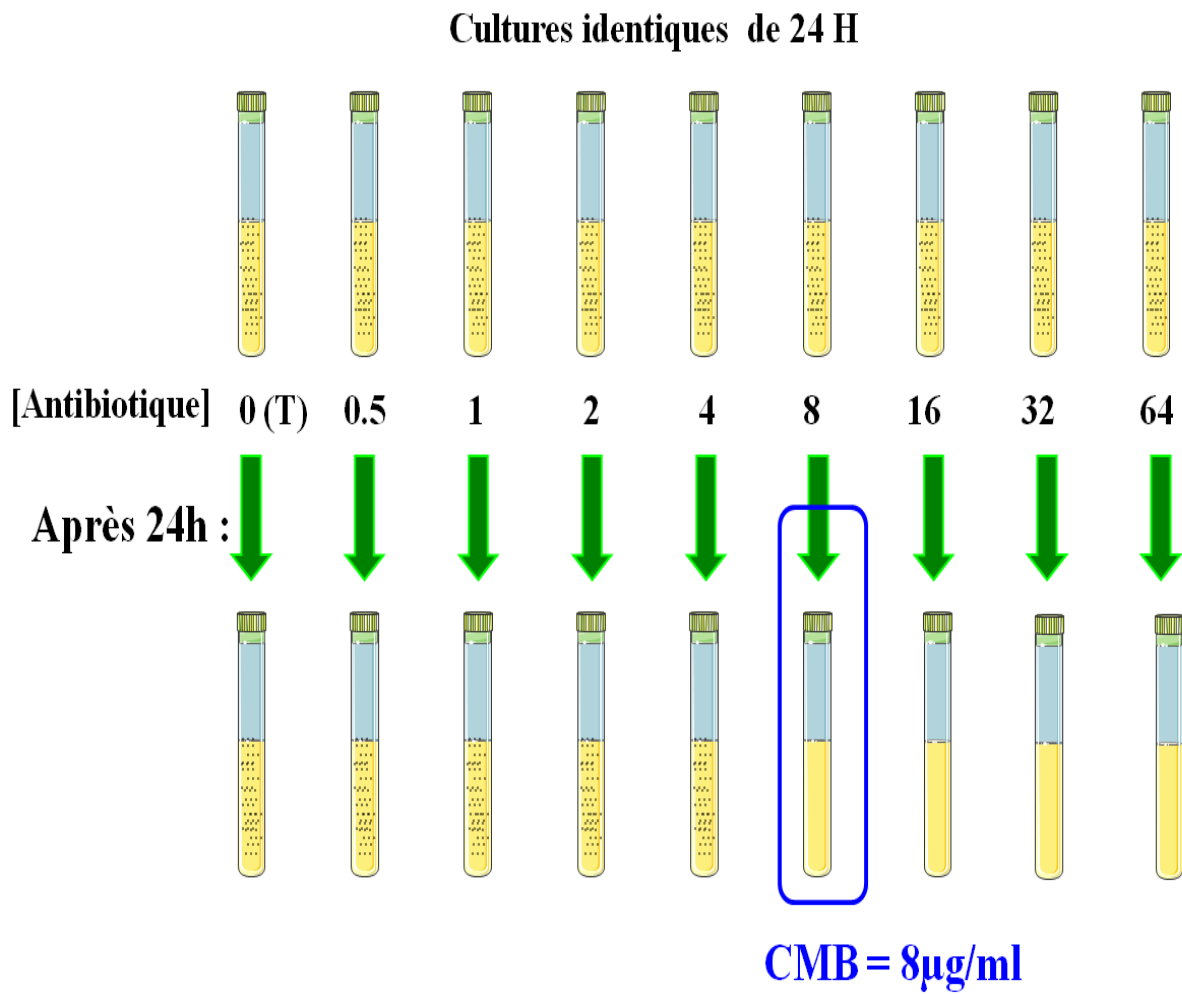


Figure 47 : Détermination de la CMB .

Chapitre VII : Aperçu sur les rôles des bactéries

Les bactéries sont apparues sur terre il y a 3,8 milliards d'années. Elles sont ubiquitaires (elles se retrouvent partout) et elles jouent un rôle immense dans l'équilibre des milieux naturels qu'elles colonisent. De plus, les bactéries interagissent directement ou indirectement avec l'Homme et ses activités.

I- Bactéries et environnement naturel

L'écologie bactérienne s'intéresse aux interactions des bactéries avec leurs milieux. Les bactéries colonisent les différents milieux naturels ainsi que l'Homme et les animaux. De ce fait, les principales flores bactériennes des milieux naturels sont retrouvées dans les océans, les eaux douces, le sol et l'air. Tandis que chez l'Homme, les flores les plus importantes se retrouvent au niveau du tube digestif, de la peau, de la bouche et les voies respiratoires supérieures ainsi qu'au niveau des organes de génitaux.

I-1- Les océans et les eaux douces

Les formes bactériennes les plus fréquentes dans les océans sont des bacilles à Gram négatif des genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Cellvibrio*...etc. Quant aux bactéries à Gram positif, elles sont faiblement représentées notamment par les genres *Bacillus* et *Clostridium* (Meyer *et al.*, 2000). Ces flores bactériennes influencent l'évolution des grands cycles biologiques tels que le cycle du carbone, le cycle de l'azote et le cycle du soufre. Ce même rôle est joué dans les eaux douces où ces bactéries se nourrissent des matières organiques contenues dans les rivières. Quand la masse devient importante, les bactéries servent de proie pour les protozoaires (animaux unicellulaires), eux mêmes servent de nourriture pour les petits poissons. Ces derniers sont des proies pour les grands poissons pêchés par l'Homme qui renvoie ses déchets organiques dans la rivière et le cycle est ainsi fermé.

I-2- Le sol et l'air

Les bactéries sont les micro-organismes les plus représentants des sols. Elles se comptent par milliards dans un gramme de sol. Les plus retrouvées sont les genres

Streptomyces, *Nocardia* et *Micromonospora* appartenant aux groupes des actinomycètes, mais également des autotrophes, des hétérotrophes, des aérobies, des anaérobies, des mésophiles, psychrophiles, des thermophiles...etc. Cette capacité de colonisation est certainement liée à leur pouvoir de dégradation de différents substrats comme la cellulose qui constitue plus de 50% de la biomasse terrestre, de la lignine et de la pectine. De plus, les bactéries sont des réducteurs de soufre, des oxydants du soufre, des fixateurs d'azote et des nitrificateurs...etc. Non seulement ces bactéries sont capables de dégrader les substrats les plus résistants, elles sont également connues pour leurs capacité à produire une grande variété d'antibiotiques.

L'air n'est pas un milieu favorable pour la croissance bactérienne. Cependant, il joue un véritable rôle dans la dissémination et la transmission des bactéries. Les genres les plus dominants dans les airs sont; *Bacillus*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Corynebacterium*, *Achromobater*, *Flavobacterium*, *Staphylococcus* ...etc.

II- Bactéries et santé

L'homme est né stérile, quelques heures après, il est colonisé par des milliers voir des millions de bactéries. L'homme vit en association permanente avec les bactéries présentes sur toutes les surfaces et dans toutes les cavités de son corps (nez, bouche, système respiratoire, yeux, oreilles, peau, systèmes urogénitaux et les intestins). Ces dernières ne représenteraient pas moins de 90% des cellules du corps humain (soit plus de 100 000 milliard de bactéries), la majorité étant hébergée par le tube digestif. Ces communautés, dynamiques et complexes, qui vivent soit en symbiose, en parasitisme ou commensalisme (saprophytes), influencent profondément la physiologie, la nutrition, ainsi que l'immunité et son développement. Elles jouent un rôle dans l'équilibre de l'organe colonisé et participent notamment à la dégradation de certains substrats non dégradés par l'homme comme la cellulose. Cependant, certaines bactéries (appelées bactéries pathogènes) peuvent, en effet, être responsables de maladies qui s'avèrent parfois graves et difficiles à traiter. Par exemple, la peste, le choléra, la tuberculose, la diphtérie, la typhoïde, la syphilis, le tétanos et le botulisme sont causées par des bactéries pathogènes. De plus, d'autres bactéries commensales du tube digestif, qui ne sont à priori pas virulents, causent des maladies chez les personnes fragiles (immunodéprimées, insuffisance rénale, nourissant...etc.). Ces dernières sont appelées bactéries pathogènes opportunistes.

III-Bactéries et agriculture

Les micro-organismes et notamment les bactéries sont impliqués dans l'agriculture. Les plantes (légumineuses) peuvent bénéficier de l'azote atmosphérique, représentant 71% des gaz de l'air, grâce à des bactéries spécifiques qui le convertissent en NH_3 (ammonium), nécessaire à leur croissance. Ces dernières forment des nodules au niveau des racines des plantes. De plus, les bactéries contribuent efficacement à la nutrition des plantes *via* les cycles du carbone, de l'azote et du soufre. Cet avantage permet à l'homme de réduire les besoins en fertilisants polluants et coûteux (engrais). Aujourd'hui, les bactéries appelées les rhizobiums, sont vendues en tant que produit commercial ajouté aux semences des légumineuses pour assurer une fixation efficace d'azote.

Chez les animaux d'élevage, le rumen constitue un organe très important chez les ruminants. Cet organe digestif est colonisé par des micro-organismes qui facilitent la digestion des substrats les plus répandus dans les végétaux comme la cellulose.

Bien qu'ils soient généralement bénéfiques pour l'agriculture, les micro-organismes dont fait partie les bactéries, peuvent être à l'origine de maladies de plantes et d'animaux d'élevage. Par exemple, la maladie de la vache folle aux Etats-Unis en 2003 a eu des conséquences lourdes sur le marché de la viande.

IV- Bactéries et industrie

L'homme a su exploiter les bactéries dans les différentes activités industrielles notamment dans l'industrie agro-alimentaire, dans la production de l'énergie et dans l'industrie biotechnologique.

IV-1- Industrie agro-alimentaire

Les micro-organismes jouent un rôle important dans l'industrie agroalimentaire autant comme agents néfastes que bénéfiques. La nourriture est un milieu favorable à la croissance bactérienne. Les bactéries étant ubiquitaires, contaminent et colonisent la nourriture et détériorent leur propriétés gustatives et nutritionnelles provoquant ainsi leur pourrissement. En outre, certaines bactéries secrètent en plus de leurs déchets les toxines. Ces dernières provoquent des intoxications alimentaires chez l'homme. Chaque année, les détériorations des aliments causent des pertes économiques importantes. Pour remédier à ce problème, l'homme s'est mis à l'industrie de la conserverie, de la congélation et de la déshydratation afin de

préparer des alimentations dépourvues de microorganismes. En effet, ces conditions de stockage deviennent défavorables pour la croissance bactérienne. Hormis ces inconvénients, la plupart des micro-organismes présents dans la nourriture n'ont pas d'effet néfaste ni sur le produit lui-même ni sur l'organisme qui les absorbe. Au contraire, plusieurs produits à valeur économique très importante, sont le résultat des activités microbiennes. Par exemple, les produits laitiers tels les yaourts, les fromages et les beurres ainsi que d'autres produits comme les conserves au vinaigres, certaines saucisses, les produits boulangers et les boissons alcoolisées sont le résultats des phénomènes de fermentation des micro-organismes fermentaires dont font partie certaines bactéries et levures.

IV-2- Energie et environnement

Les micro-organismes ont un intérêt majeur dans la production de l'énergie et dans le nettoyage de l'environnement des polluants. Certaines bactéries, appelées bactéries méthanogènes, sont capables de produire le méthane, un gaz naturel largement utilisé par l'homme comme source d'énergie. D'autres micro-organismes phototrophes utilisent de l'énergie lumineuse pour produire une biomasse importante. Cette biomasse avec certains déchets comme les ordures ménagères, les excréments des animaux et les surplus de céréales, peuvent être convertis en biocarburants comme le méthane et l'éthanol par les micro-organismes. Certaines bactéries sont utilisées dans l'industrie pétrolière notamment dans la biodégradation du pétrole. D'autres sont utilisées pour la biolixiviation de l'or ou pour lixiviation de minerais à faible teneur en cuivre...etc.

D'autres micro-organismes débarrassent les polluants engendrés par les différentes activités humaines par un processus appelé la bioremédiation. De même, les solvants, les pesticides et d'autres polluants déversés dans l'environnement peuvent être utilisés comme substrat par divers micro-organismes dont la majeure partie est représentée par les bactéries. Le défi actuel est de rechercher des procédés et des micro-organismes permettant de synthétiser des énergies interminables en assurant un environnement propre sans pollution.

IV-3- Biotechnologie

La biotechnologie industrielle a révolutionné la vie humaine. Elle consiste à utiliser des micro-organismes (notamment des bactéries) pour bio-synthétiser des molécules et produits à intérêts majeurs pour l'homme et ses activités. Les microorganismes sont utilisés depuis longtemps après la découverte des phénomènes de fermentation, mais la

biotechnologie est plutôt née suite au développement de la génie génétique permettant de modifier génétiquement les micro-organismes. Ces manipulations génétiques incluant les différentes mutagénèses (dirigée, aléatoire...), la fusion des protoplastes, le transfert des informations génétiques dans différents micro-organismes et la modification de l'expression génétique, ont pour objectif de programmer des micro-organismes pour synthétiser des quantités énormes de molécules d'intérêt. Aujourd'hui, les molécules importantes comme les antibiotiques, les acides aminés et protéines, les acides organiques, les biopolymères et les biotensioactifs sont produit par la biotechnologie industrielle en quantités interminables. De plus, la biotechnologie permet de biotransformer des molécules ou de convertir des énergies. Par exemples, l'insertion d'une fonction hydroxyle ou cétone, ou induction d'une saturation ou instauration dans une molécule complexe permet d'améliorer ses propriétés. De même, par certains micro-organismes, l'énergie solaire est convertie en biocarburants (voir le titre énergie et environnement).

La biotechnologie a également servit le domaine de l'agriculture. L'utilisation de bactéries ayant des plasmides transformés comme vecteur (ex : *Agrobacterium tumefaciens*) a permis l'obtention de plantes avec des propriétés de résistance souhaitées. Egalement, certains bactéries sont utilisées comme bioinsecticides (ex : *Bacillus thuringiensis*) ou biopesticides pour préserver les plantes des maladies provoquées par les attaques des insectes et des vers.

Il existe beaucoup d'autres utilisations de l'industrie biotechnologique comme l'utilisation des bactéries magnétotactiques dans le domaine de la nanotechnologie ou l'utilisation des bactéries comme biosenseurs afin de détecter précisément la présence des pathogènes, des herbicides, toxines, protéines et ADN.

Enfin, les rôles des bactéries décrits ci-dessus constituent uniquement un bref aperçu. En effet, de mon point de vu, la diversité génétique et morphologique des micro-organismes et notamment des bactéries, permet d'avoir une multitude de rôles et une dynamique très complexe dans les différents habitats y compris le corps humain. L'homme a découvert certains de ces rôles, mais beaucoup d'autres restent à découvrir. La figure ci-dessous illustre les rôles les plus importants des bactéries dans la nature et notamment en relation avec l'homme et ses activités (Figure 48).

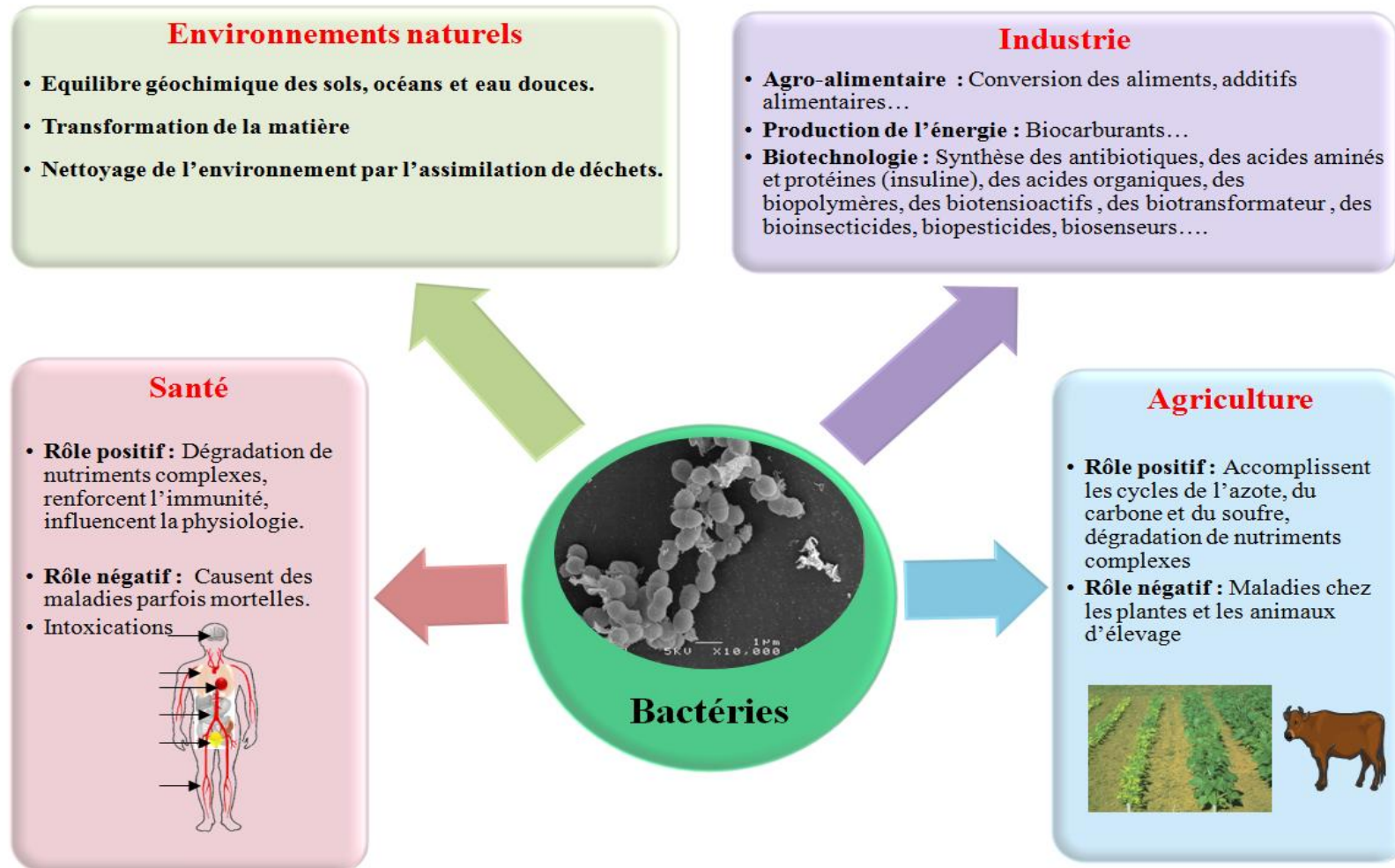


Figure 48 : Impact des bactéries sur l'homme et ses activités ainsi que sur l'environnement naturel.

Références bibliographiques

- Angert, E. R., Clements, K. D. & Pace, N. R. (1993).** The largest bacterium. *Nature* **362**, 239–241.
- Bantegnies, C., Cotten, A., Hue, V. & Rodriguez, R. (2010).** Chapitre 3 : Compléments pour en savoir plus - SVT Blaye.
- Bergey, D. H. & Holt, J. G. (Eds.). (2000).** *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9. ed., [Nachdr.]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Black, J. G. (2012).** *Microbiology: Principles and Explorations*, 8 edition. Wiley.
- Madigan, M. & Martinko J. (2007).** Brock. *Biologie des micro-organismes*, 11^{ème} édition. Paris: Pearson Education France.
- Cano, R. J. & Borucki, M. K. (1995).** Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. *Science* **268**, 1060–1064.
- Fabretti, F., Theilacker, C., Baldassarri, L., Kaczynski, Z., Kropec, A., Holst, O. & Huebner, J. (2006).** Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* **74**, 4164–4171.
- Genty, C. (2013).** Téléchargement schéma et photos d'un microscope optique et de ses différentes parties - Intellego.fr.
- Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C., Clayton, R. A., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D. & other authors. (2000).** DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**, 477–483.
- Höltje, J. V. (1998).** Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **62**, 181–203.

- Jett, B. D., Huycke, M. M. & Gilmore, M. S. (1994).** Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* **7**, 462–478.
- Julio, A. (2015).** Bactéries : anatomie fonctionnelle et classification médicale.
- Ladjouzi, R. (2013).** *Analyse des mécanismes de tolérance aux antibiotiques ciblant la paroi chez les entérocoques.* Université de Caen Basse-Normandie.
- Meyer, A., Deiana, J. & Leclerc, H. (2000).** *Cours de microbiologie générale: nouveau programme.* Paris: Doin.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A. (2003).** *Microbiologie.* De Boeck.
- Prescott, L. M., Willey, J. M., Sherwood, L., Woolverton, C. J. & Prescott, L. M. (2013).** *Microbiologie.* De Boeck 4^{ème} édition.
- Prieur, D., Geslin, C. & Payan, C. (2011).** *Mini manuel de microbiologie: cours + QCM-QROC.* Paris: Dunod.
- Roujeinikova, A. (2008).** Crystal structure of the cell wall anchor domain of MotB, a stator component of the bacterial flagellar motor: Implications for peptidoglycan recognition. *Proc Natl Acad Sci* **105**, 10348–10353.
- Schleifer, K. H., Kilpper-Bälz, R., Kraus, J. & Gehring, F. (1984).** Relatedness and classification of *Streptococcus mutans* and ‘mutans-like’ streptococci. *J Dent Res* **63**, 1047–1050.
- Schulz, H. N., Brinkhoff, T., Ferdelman, T. G., Mariné, M. H., Teske, A. & Jorgensen, B. B. (1999).** Dense populations of a giant sulfur bacterium in Namibian shelf sediments. *Science* **284**, 493–495.
- Singleton, P. & Dusart, J. (1999).** *Bacteriologie: cours : 2e cycle.* Paris: Dunod.
- Stolz, J. F. (1993).** Magnetosomes. *Microbiology* **139**, 1663–1670.
- Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L. (2012).** *Microbiology: An Introduction*, 11^{ème} édition. Benjamin Cummings.

- Vreeland, R. H., Rosenzweig, W. D. & Powers, D. W. (2000).** Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature* **407**, 897–900.
- Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977).** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5088–5090.