

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université 8 mai 1945 Guelma

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la
Terre et de l'Univers**



Département : Biologie

**Polycopié support pédagogique au cours
Matière : Bactériologie**

Master I Biologie moléculaire et cellulaire

Dr. Boudebbouz Boussadia Meriem Imen

Juin 2020



République Algérienne Démocratique et
Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

Université 8 mai 1945 Guelma



Faculté des Sciences de la Nature
et de la Vie et des Sciences de la
Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Bactériologie

Dr. Boudebouz Boussadia Meriem Imen



Sommaire

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Liste des Figures8

Chapitre I : Structure cellulaire des bactéries et fonctions3

I.1	Morphologie, dimension et groupement des cellules bactériennes	3
I.2	Structures et organisation cellulaires.....	4
I.2.1	Enveloppe, interface de la cellule avec son environnement.....	5
I.2.1.1	Enveloppe des Bactéries Gram- (ou didermes).....	5
I.2.1.2	Enveloppe des Bactéries Gram+ (ou monodermes).....	9
I.2.1.3	Autres types d'enveloppes de Bactéries	10
I.2.2	Structures péri- et trans-enveloppes.....	10
I.2.2.1	Couches externes	11
I.2.2.2	Appendices de surface	12
I.2.3	Cytoplasme.....	14
I.2.3.1	Les inclusions.....	15
I.2.3.2	Carboxysomes	16
I.2.3.3	Magnétosomes.....	17
I.2.4	Région nucléaire.....	17
I.2.4.1	ADN et nucléoïde.....	17
I.2.4.2	Plasmide	18
I.2.5	Ribosomes	19
I.2.6	Endospores.....	19
I.2.7	Cytosquelette	21

II. Chapitre II : Croissance et nutrition22

II.1	Croissance.....	22
II.1.1	Dynamique de la croissance bactérienne.....	22
II.1.2	Courbe de croissance	22
II.1.3	Mathématiques de la croissance.....	23
II.1.4	Croissance des populations bactériennes	26

II.1.4.1	Croissance sur milieu solide	26
II.1.4.2	Croissance en milieu liquide	27
II.1.5	Croissance diauxique	29
II.1.6	Conditions de la croissance	29
II.1.6.1	Les substances nutritives.....	29
II.1.6.2	L'eau	29
II.1.6.3	La température.....	30
II.1.6.4	Le pH.....	30
II.1.6.5	L'oxygène.....	31
II.1.6.6	Les ions inorganiques	31
II.1.7	Mesure de la croissance bactérienne.....	32
II.1.7.1	Mesure directe de la croissance bactérienne	32
II.1.7.2	L'estimation du nombre de bactéries par une méthode indirecte	37
II.2	Nutrition bactérienne.....	38
II.2.1	Besoins énergétiques	39
II.2.2	Besoins en carbone	39
II.2.3	Besoins en azote.....	39
II.2.4	Besoins en eau.....	40
II.2.5	Besoin en minéraux.....	40
II.2.6	Besoins en facteurs de croissance.....	41
II.3	Absorption des nutriments.....	41
II.3.1	Diffusion facilitée.....	42
II.3.2	Transport actif	42
II.3.3	Translocation de groupe.....	45
II.4	Relations entre la cellule bactérienne et d'autres organismes vivants uni-ou pluricellulaires	45
II.4.1	Aspects trophiques – Modes de nutrition.....	45
II.4.1.1	Saprophytisme - indépendance trophique.....	45
II.4.1.2	Relations trophiques associatives entre plusieurs organismes.....	45
III.	Chapitre III : Métabolisme	47
III.1	Introduction.....	47
III.2	Rappels et définitions.....	47
III.3	Métabolisme énergétique.....	47
III.3.1	Métabolisme chimio-organotrophe	48
III.3.1.1	Respirations aérobies et anaérobies	48
III.3.1.2	Fermentations et syntrophie.....	48

III.3.2	Métabolismes chimio-lithotrophes	50
III.3.2.1	Respiration aérobie.....	51
III.3.2.2	Respiration anaérobie.....	53
III.3.3	Métabolismes phototrophes.....	56
III.3.3.1	Photosynthèse oxygénique	56
III.3.3.2	Photosynthèse anoxygénique	57
III.3.4	Fixation du CO ₂	58
IV.	Chapitre IV : Génétique bactérienne	60
IV.1	Matériel génétique des bactéries.....	60
IV.1.1	Chromosomes et plasmides	60
IV.1.2	Réplication de l'ADN.....	61
IV.2	Variations génétiques.....	63
IV.2.1	Mutations	63
IV.2.1.1	Les mutations ponctuelles.....	64
IV.2.1.2	L'isolement des mutants	65
IV.2.1.3	La réplique sur boîte.....	65
IV.2.1.4	La réversion des mutations	66
IV.2.1.5	Mutagènes.....	66
IV.2.1.6	Mécanismes de réparation de l'ADN.....	67
IV.2.1.7	Caractères de la mutation	70
IV.2.2	Recombinaison génétique	70
IV.2.2.1	Transformation.....	70
IV.2.2.2	Conjugaison	71
IV.2.2.3	Transduction.....	73
IV.3	Régulation génétique chez les bactéries.....	75
IV.3.1.1	Opéron lactose chez E. coli.....	75
IV.3.1.2	Opéron tryptophane d'E. coli	78
V.	Chapitre V : Méthodes d'identification et culture des bactéries.....	82
V.1	Principes de l'identification bactérienne.....	82
V.1.1	Etude des caractères morphologiques.....	82
V.1.1.1	Cultures bactériennes.....	82
V.1.1.2	Méthodes d'inoculation	85
V.1.1.3	Préparation d'une culture pure à partir d'un mélange d'organismes	86
V.1.1.4	Conservation d'une culture bactérienne.....	87
V.1.1.5	Observations macroscopiques	87

V.1.1.6	Observations microscopiques - colorations	88
V.1.2	Etudes des caractères biochimiques et physiologiques	90
V.1.2.1	Etude du métabolisme respiratoire	90
V.1.2.2	Etude du métabolisme glucidique.....	90
V.1.2.3	Etude de métabolisme protidique.....	91
V.1.2.4	Galerie d'identification.....	92
V.1.2.5	L'hémolyse.....	93
V.1.3	Etude des caractères génétiques et immunologiques	93
V.1.3.1	Tests génétiques.....	93
V.1.3.2	Tests immunologiques.....	97
VI.	Chapitre VI : Notion d'espèce, souche et de biodiversité.....	99
VI.1	Introduction à la classification et à la taxinomie.....	99
VI.2	Notion d'espèce.....	99
VI.2.1	Définition de l'espèce chez les procaryotes	99
VI.3	Rangs taxonomiques intraspécifiques d'intérêt.....	100
VI.3.1	Différents rangs taxonomiques intraspécifiques	100
VI.3.2	Détermination des rangs taxonomiques intraspécifiques	101
VI.3.2.1	REP-PCR	101
VI.3.2.2	PFGE.....	101
VI.3.2.3	Technique MLST	101
VI.4	Biodiversité des <i>Bacteria</i>	102
VII.	Chapitre VII : Contrôle des micro-organismes par les agents physiques et chimiques	111
VII.1	Contrôle et destruction des micro-organismes.....	111
VII.1.1	Lois générales de destruction et élimination	111
VII.1.1.1	Généralités	111
VII.1.1.2	Facteurs influençant la destruction microbienne	112
VII.2	Principaux agents antimicrobiens	113
VII.2.1	Généralités	113
VII.2.1.1	Critères de choix.....	113
VII.2.1.2	Classification.....	113
VII.2.2	Agents d'élimination	114
VII.2.3	Agents physiques de stabilisation ou de destruction.....	114
VII.2.4	Agents chimiques de stabilisation et de destruction	116
VII.2.4.1	Mode d'action	117

VII.2.4.2	Principaux types d'agents chimiques	117
VII.2.4.3	Agents chimiothérapeutiques	119
VII.3	Détermination de l'activité antimicrobienne	122
VII.3.1	Notion de germe test	122
VII.3.2	Détermination des doses actives d'un agent antimicrobien.....	122
VII.3.2.1	Mesure du coefficient phénol	122
VII.3.2.2	Méthode des porte-germes	122
VII.3.2.3	Détermination des doses minimales inhibitrices et bactéricides.....	122
VII.3.2.4	Détermination de la sensibilité in vitro aux antibiotiques	122
Références bibliographiques		

Liste des Figures

Titre de la figure	Page
Figure 1.1 : Types morphologiques de cellules procaryotes.	04
Figure 1.2 : La morphologie d'une cellule bactérienne.	05
Figure 1.3 : Différences structurales des enveloppes des Bactéries Gram ⁻ et Gram ⁺ .	06
Figure 1.4 : La structure des lipopolysaccharides de <i>Salmonella</i> .	07
Figure 1.5 : Les pontages du peptidoglycane. (a) Le peptidoglycane d' <i>Escherichia coli</i> .	09
Figure 1.6 : La couche S. Différents types d'assemblage des sous-unités.	11
Figure 1.7 : La distribution des flagelles.	12
Figure 1.8 : L'ultrastructure du flagelle bactérien.	13
Figure 1.9 : Deux organites cellulaires bactériens.	16
Figure 1.10 : Les vésicules et les vacuoles gazeuses.	17
Figure 1.11 : Exemples de localisation et de taille des endospores.	19
Figure 1.12 : Les endospores bactériennes. Une section transversale d'une spore mature de <i>Bacillus subtilis</i> (1.2µm).	20
Figure 1.13 : La formation de l'endospore : le cycle de <i>Bacillus megatrium</i> .	21
Figure 2.1 : Courbe typique de la croissance bactérienne.	23
Figure 2.2 : La croissance microbienne exponentielle.	24
Figure 2.3 : Le calcul de la vitesse de croissance moyenne et du temps de génération.	25
Figure 2.4 : La détermination du temps de génération.	25
Figure 2.5 : Formes de colonies bactériennes.	27
Figure 2.6 : Schéma simplifié d'un système de culture continue.	28
Figure 2.7 : Types respiratoires d'une bactérie	31
Figure 2.8 : Dénombrement de colonies après culture et dilution en série.	33

Figure 2.9 : Dénombrement de colonies après culture (a : technique d'étalement en profondeur ; b : technique d'étalement en surface).	34
Figure 2.10 : Technique de filtration sur membrane.	35
Figure 2.11 : Technique du nombre le plus probable.	36
Figure 2.12: Dénombrement directe des cellules microbiennes à l'aide de la chambre de comptage de Petroff-Hausser.	37
Figure 2.13 : Estimation du nombre de bactéries par turbidimétrie.	48
Figure 2.14 : Un modèle de la diffusion facilitée.	42
Figure 2.15 : La fonction du transporteur ABC.	43
Figure 2.16 : Un mécanisme du transport actif utilisant des gradients de protons et de sodium.	44
Figure 3.1 : Le métabolisme cellulaire.	47
Figure 3.2 : Principe des fermentations.	49
Figure 3.3 : Exemples de fermentations : acides mixtes (a), butanediol (b). Les composés encadrés sont les produits de fermentations.	50
Figure 3.4: Oxydation de l'hydrogène.	51
Figure 3.5: Acétogénèse et méthanogénèse.	55
Figure 3.6 : Réactions de la voie de l'acétyl CoA.	56
Figure 3.7 : Photosynthèse oxygénique.	57
Figure 3.8: Cycle de Calvin.	59
Figure 4.1: Le réplisome.	62
Figure 4.2 : Modifications possibles des séquences d'ADN pouvant donner une mutation.	63
Figure 4.3: La nature des mutations ponctuelles montrées sur la séquence d'ARNm et leurs conséquences sur la séquence protéique.	64
Figure 4.4: Réplique sur boîte pour isoler des colonies de mutants.	66
Figure 4.5: Schéma montrant les étapes de base d'une excision-réparation.	68
Figure 4.6 : (a) Recombinaison et (b) réparation des erreurs d'un ADN endommagé par les UV durant la réplication.	69

Figure 4.7 : Intégration du chromosome par conjugaison	73
Figure 4.8 : Cycle des phages T-pairs.	74
Figure 4.9 : Hydrolyse du lactose.	75
Figure 4.10 : Synthèse du véritable inducteur de l'opéron lactose.	76
Figure 4.11 : Courbe de proportionnalité entre la quantité de β -galactosidase produite et la quantité du lactose présente dans le milieu de culture.	76
Figure 4.12 : Caractéristiques de l'organisation de l'opéron lactose.	77
Figure 4.13 : Induction de l'opéron lactose chez <i>E. coli</i> de type sauvage en présence de lactose.	78
Figure 4.14 : Schéma général du principe de fonctionnement d'un opéron répressible chez une bactérie.	79
Figure 4.15 : L'opéron tryptophane chez <i>E. coli</i> .	80
Figure 5.1 : Striation : inoculation d'une boîte pour obtenir des colonies isolées.	85
Figure 5.2 : Technique de l'auxanogramme.	88
Figure 5.3 : Principe de l'identification par hybridation de sondes.	94
Figure 5.4 : Principe de l'identification par réaction PCR.	95
Figure 5.5 : Principe de l'identification par la technique ELISA directe.	98
Figure 6.1 : Comparaison de deux souches par la technique d'hybridation ADN-ADN.	100
Figure 6.2 : Arbre simplifié du domaine des Bacteria.	102
Figure 7.1 : Cibles des différentes classes d'antibiotiques. PABA.	119

Liste des Tableaux

Titre du tableau	Page
Tableau 2.1 : Un exemple de croissance exponentielle.	24
Tableau 2.2 : Exemples de temps de génération.	22
Tableau 5.1 : Seuils moléculaires de délimitation d'une espèce procaryote.	96

Introduction

Les bactéries sont des organismes minuscules que l'on trouve à peu près partout. Elles manifestent parfois leur présence - Les blessures s'infectent, le lait s'acidifie, la viande putréfie - mais habituellement nous les ignorons parce que leurs activités sont moins évidentes et à cause de leur petite taille. Il fallu attendre l'apparition du microscope au XVII^e siècle pour que l'on découvre leur existence.

Dans la plupart des cas, la bactérie est un être unicellulaire autonome. La cellule bactérienne présente une organisation procaryote.

Une des raisons majeures de l'étude des bactéries est la lutte contre les maladies. Les bactéries sont la cause de quelques maladies graves ainsi que de multiples affections bénignes. La prévention et le contrôle de ces maladies dépendent en grande partie des efforts des bactériologistes tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire ou en agriculture. Les bactéries pathogènes ne constituent qu'une petite partie de l'ensemble de la population bactérienne.

La plupart des bactéries ne présentent que peu ou pas de danger et beaucoup s'avèrent indéniablement utiles à l'homme. Par exemple certaines d'entre elles produisent les antibiotiques et d'autres fournissent les enzymes des poudres à lessiver biologiques. Il y en a qui servent d'insecticides microbiens et protègent les cultures de certains insectes nuisibles. Tandis que d'autres sont employées pour extraire les métaux ou encore pour synthétiser des plastiques biodégradables.

De façon surprenante peut-être, l'industrie alimentaire fait souvent appel aux bactéries. Quand il s'agit de nourriture, on considère généralement comme un mal ces microbes qui gâtent ou empoisonnent les aliments, mais certaines espèces sont en fait employées pour la production alimentaire. Ainsi dans la fabrication du beurre, du fromage et du yaourt, certaines bactéries interviennent pour convertir le lactose du lait en acide lactique. C'est sous l'action de bactéries que le vinaigre est obtenu à partir d'alcool (éthanol). Les bactéries et leurs enzymes jouent aussi des rôles centraux en biotechnologies avec des applications en médecine, dans l'industrie et dans l'agriculture. Ainsi, par exemple on a recours à la technologie de l'ADN recombinant pour produire des agents comme la streptokinase, utilisée pour traiter les caillots sanguins.

Enfin, mais ce n'est pas le moindre de leurs mérites, les bactéries assurent des rôles essentiels dans les cycles géochimiques dont en définitive, toute vie dépend. Elles influencent la fertilité et la structure potentielle agricole des sols et une meilleure compréhension de leur activité permettra une meilleure exploitation de la terre et des cultures, progrès vital pour assurer dans l'avenir la survie de nos populations en perpétuelle croissance.

Ce polycopié a été rédigé pour apporter aux étudiants un accès facile aux caractéristiques importantes des bactéries. Ce support est divisé en sept chapitres principaux.

Le chapitre 1 présente la structure de base d'une cellule bactérienne. Le chapitre suivant traite en détail la physiologie bactérienne (croissance et nutrition). Le chapitre 3, couvre la biochimie du métabolisme chez les bactéries.

Le chapitre 4, sur la génétique bactérienne, montre les voies par lesquelles les bactéries peuvent modifier leur information génétique, comme la mutation, la réparation de l'ADN, la transformation, la conjugaison et la transduction.

Le chapitre 5 traite les techniques d'analyse qui peuvent être pratiquées afin d'étudier les caractères morphologiques, biochimiques, physiologiques, immunologiques et génétiques des bactéries. Dans le chapitre 6 sont discutés les rangs taxinomiques.

Le chapitre 7, dernière partie dans ce support, présente les moyens de contrôle et de destruction des germes.

Chapitre I : Structure cellulaire des bactéries et fonctions

I.1 Morphologie, dimension et groupement des cellules bactériennes

Les bactéries présentent une grande variété de morphologies. Leurs dimensions linéaires sont généralement de 1 à 10 μm .

Certaines bactéries ayant des diamètres inférieurs à 0,2- 0,3 μm . A l'inverse, il existe des espèces de dimensions des centaines de fois plus grandes. *Epulopiscium fishelsoni*, *Beggiatoa spp.* et *Thiomargarita namibiensis*, ou encore *Titanospirillum*, en sont des représentants, désignés de façon évocatrice comme Mégabactéries, ou Bactéries géantes. La bactérie hétérotrophe *E. fishelsoni*, en forme de cigare, isolée de l'intestin du poisson tropical *Acanthurus*, a un diamètre de 80 μm et une longueur de 600 μm .

Les cellules bactériennes individuelles présentent trois formes principales : la forme sphérique des **cocci** (coccus au singulier= grain) (**fig.1.1a**), la forme en bâtonnet des **bacilles** (=baguette) (**fig.1.1b**) et la forme en **spirale**.

Les cocci sont habituellement ronds mais peuvent être ovales, allongés ou plats d'un côté (réniformes). Quand elles se divisent pour se reproduire, les bactéries peuvent rester attachées les unes aux autres et se présenter en groupements caractéristiques de l'espèce à laquelle elles appartiennent.

Les modes de groupement des cocci sont variés. Ainsi, les cocci qui restent groupés par paires après s'être divisés sont appelés **diplocoques** (**fig.1.1c**); ceux qui forment des chaînettes sont appelés **streptocoques** (**fig.1.1 d**). Ceux qui se divisent sur deux plans et constituent des groupements de quatre cellules portent le nom de **tétrade**. Ceux qui se divisent sur trois plans et restent attachés en groupements cubiques de huit cellules s'appellent **sarcines**. Ceux qui se divisent dans de nombreuses directions et forment des grappes sont appelés **staphylocoques** (**fig.1.1e**).

La division des bacilles s'effectue dans un seul plan, de part et d'autre du petit axe transversal. En conséquence, on observe moins de groupements de bacilles que de groupements de cocci. La plupart des bacilles sont des bâtonnets simples. Les **diplobacilles** restent par paires après leur division et les **streptobacilles** (**fig.1.1f**) forment des chaînettes. D'autres ont les extrémités effilées, comme des cigares. D'autres encore sont ovales et ont une apparence tellement semblable à celle des cocci qu'on les appelle **coccobacilles**.

Les bactéries spiralées présentent une ou plusieurs courbes ; elles ne sont jamais droites. Celles qui ont la forme d'un bâtonnet incurvé et qui ressemblent à des virgules s'appellent **vibrions** (**fig.1.1g**). D'autres, appelées **spirilles**, ont une forme hélicoïdale, et un corps passablement rigide. Un troisième groupe est caractérisé par une forme flexible en hélice ; ce sont les **spirochètes** (**fig.1.1h**). Contrairement aux spirilles, qui se déplacent à l'aide d'appendices externes en forme de fouet appelés flagelles, les spirochètes avancent au moyen de filaments axiaux, qui ressemblent à des flagelles mais sont contenus dans une gaine externe flexible, nommée endoflagelle.

Les formes des bactéries sont déterminées par l'hérédité. La plupart des bactéries sont **monomorphes** sur le plan génétique, c'est-à-dire qu'elles conservent toujours la même forme. Toutefois, certaines conditions du milieu peuvent altérer cette forme. Dans ce cas,

l'identification est plus difficile. Par ailleurs, certaines bactéries, telles que *Rhizobium* et *Corynebacterium* (**fig.1.1i**), sont génétiquement **pléomorphes**, ce qui signifie qu'elles peuvent se présenter sous plusieurs formes.

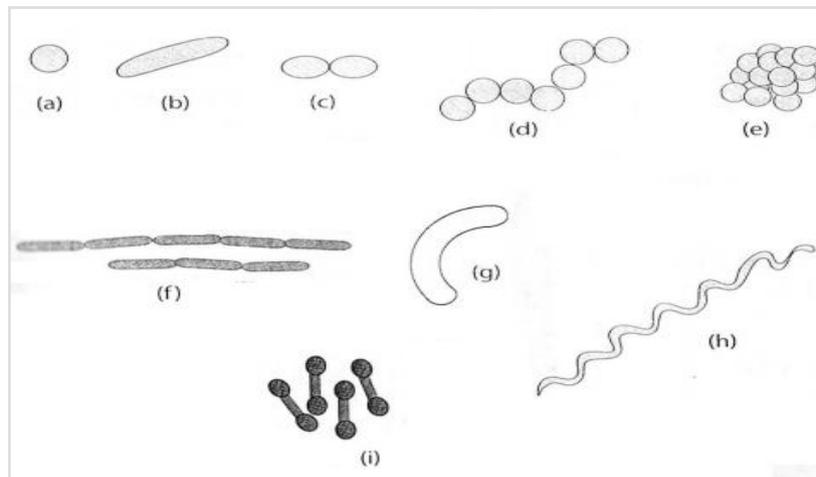


Figure 1.1 : Types morphologiques de cellules procaryotes.

I.2 Structures et organisation cellulaires

La nature procaryote d'un organisme peut être schématisée en quatre points (**fig.1.2**): **(i)** la présence d'une paroi, partie d'une structure multistratifiée complexe, l'enveloppe ; **(ii)** l'absence de membrane nucléaire ; **(iii)** l'absence de membranes internes dans le cytoplasme, à l'exception des Planctomycètes ; **(iv)** certaines caractéristiques des constituants du cytoplasme.

L'enveloppe est constituée d'une membrane (**membrane interne, ou cytoplasmique, M1**), et à l'extérieur de celle-ci de la paroi, une structure essentielle des procaryotes, qui définit leur forme et assure l'intégrité cellulaire. Cette structure est formée d'un polymère complexe, le **peptidoglycane** (ou muréine) chez les Bactéries, ou pseudomuréine chez certaines Archées. Chez de nombreuses classes de Bactéries (les Gram⁻) et chez une seule Archée actuellement connue, la paroi est entourée d'une **membrane externe**. Chez de nombreuses Bactéries, à l'enveloppe s'ajoute un autre revêtement, la **capsule**, constituée de polysaccharides très hydratés, qui joue un rôle protecteur important. Sur la surface de la paroi sont présentes un certain nombre de structures ayant différents rôles.

Enfin un aspect important mais longtemps inconnu ou sous-estimé est la présence d'un **cytosquelette**, équivalent à celui des eucaryotes, responsable de la morphologie de la cellule mais aussi d'importantes fonctions.

Le cytoplasme se distingue de celui des eucaryotes par l'absence de noyau et d'organites internes bordés d'une membrane.

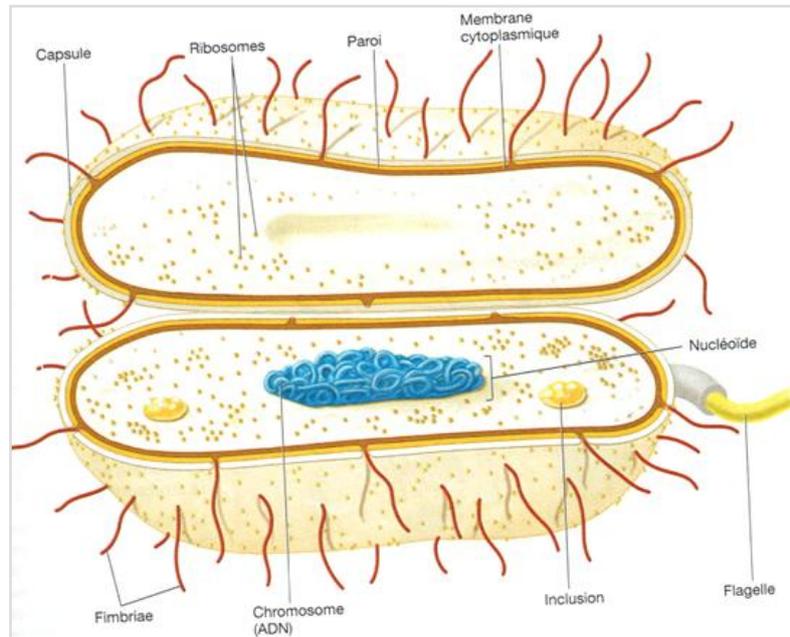


Figure 1.2 : La morphologie d'une cellule bactérienne.

I.2.1 Enveloppe, interface de la cellule avec son environnement

L'interface de la cellule bactérienne avec son environnement est une structure multistratifiée, l'enveloppe, plus complexe que la membrane cytoplasmique des eucaryotes. C'est aussi le siège de nombreuses réactions biochimiques dont certaines chez les eucaryotes s'effectuent au niveau d'organites intracytoplasmiques.

En 1884, C. Gram a développé une technique de coloration histochimique, portant son nom, qui permet de subdiviser toutes les Bactéries, à une exception connue près, en deux groupes : les Gram positives (Gram+) et les Gram négatives (Gram-) (dites aussi monodermes et didermes, respectivement). Bien des années plus tard, on s'aperçut que la différence de réponse à la coloration de Gram correspondait à deux types différents de structures de leur enveloppe. Il s'avère que les deux groupes de Bactéries ainsi définis se distinguent aussi profondément aux niveaux génétique, biochimique et physiologique. L'exception est la classe des Mollicutes (dont le genre *Mycoplasma* est le plus connu), totalement dépourvues de paroi.

I.2.1.1 Enveloppe des Bactéries Gram- (ou didermes)

L'enveloppe des Bactéries Gram- est formée de trois principales strates. Ce sont, de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (**fig.1.3**) : la membrane externe (ME), qui est en contact avec l'environnement, la paroi de peptidoglycane (PG), qui constitue l'exosquelette, et la membrane cytoplasmique ou membrane interne (MI), qui entoure le cytoplasme.

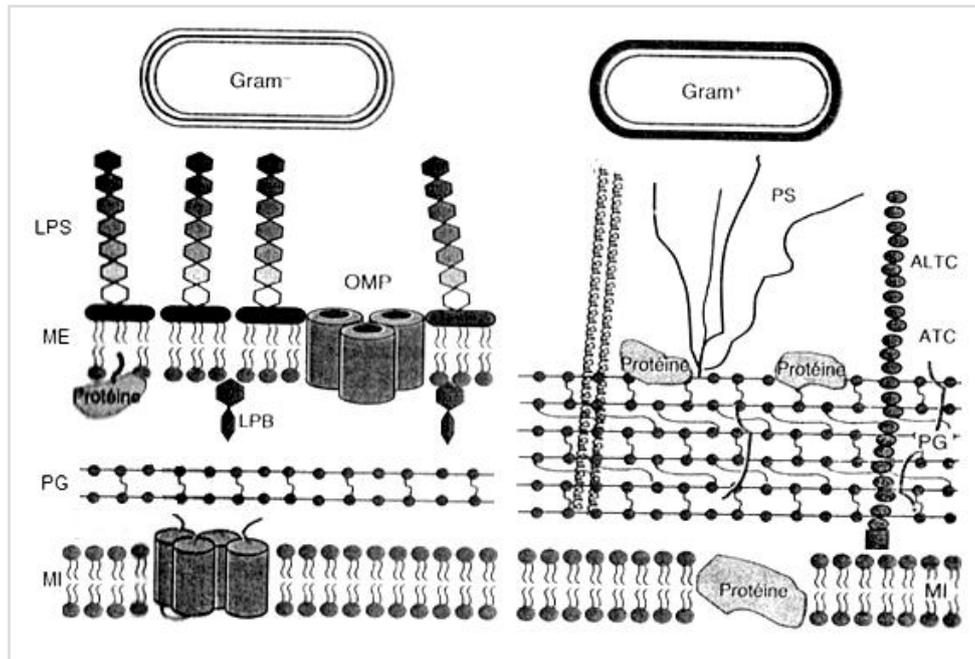


Figure 1.3 : Différences structurales des enveloppes des Bactéries Gram⁻ et Gram⁺.

Entre les deux membranes, se trouve l'espace périplasmique, dans lequel baigne la paroi. Chacune des trois structures définit un compartiment cellulaire particulier, avec une composition protéique qui lui est propre. La complexité structurale et l'importance fonctionnelle de l'enveloppe sont attestées par le nombre de protéines qui y sont associées, représentant environ le tiers des différents types de protéines d'une cellule (1 484 sur environ 4 400 chez *Escherichia coli*). La fonction de la moitié de ces protéines n'est pas encore connue. La membrane externe (ME), d'une épaisseur d'environ 7,5-10 nm, fournit une structure de stabilisation à la cellule. Elle est asymétrique, structurée par un polymère particulier et spécifique, le lipopolysaccharide (LPS, **fig.1.4**) dans un feuillet externe, et des phospholipides dans un feuillet interne.

La composition qualitative de la ME est assez uniforme chez les Bactéries Gram⁻ : 30-40 % de protéines, 35-45 % de LPS et 25 % de lipides.

La ME fonctionne comme une barrière de perméabilité, protégeant la cellule de l'entrée de composés nocifs présents dans l'environnement (antibiotiques, sels biliaries pour les bactéries commensales de l'intestin, etc.), et de la perte des constituants qui résident dans l'espace périplasmique. Elle contrôle le passage de petites molécules (600-700 daltons), ce qui inclut la plupart des nutriments (acides aminés, monosaccharides, etc.). Le passage de ces molécules est réalisé grâce à la présence d'une famille de protéines intégrées dans cette membrane, les porines (OMP, *integral Outer Membrane Proteins*). Ce sont généralement des trimères qui forment des canaux aqueux, permettant ainsi la diffusion passive de petits solutés hydrophiles (**fig.1.3**). Les molécules plus grandes, par exemple la vitamine B12, doivent être véhiculées par des transporteurs spécifiques. D'autres OMP ont des fonctions de transport plus spécialisées, comme la sécrétion de protéines et d'éléments structuraux de cette même membrane, ou l'extrusion de drogues.

Le lipopolysaccharide est un glycolipide complexe, présent exclusivement sur la face externe de la ME des bactéries Gram⁻ (fig.1.3). C'est le constituant moléculaire le plus abondant de la ME. Il représente entre 10-15 % des molécules exposées à la surface. Le nombre de molécules de LPS pour la cellule d'*E. coli* a été estimé à 3,5 millions, couvrant 75 % de la surface cellulaire, le restant étant constitué par les protéines de membrane. La plupart des caractéristiques et des fonctions de la membrane externe sont dues au LPS (fig.1.4). Cette molécule est fondamentale pour la survie bactérienne, car elle joue un rôle essentiel dans la perméabilité sélective de l'enveloppe.

Chez les bactéries pathogènes, le LPS est un facteur important de virulence, qui leur permet de contrecarrer la défense immunitaire de l'hôte en agissant sur la phagocytose et sur l'activation du complément. Il est parfois désigné par le terme d'endotoxine car il induit une réponse inflammatoire intense lors d'infections bactériennes.

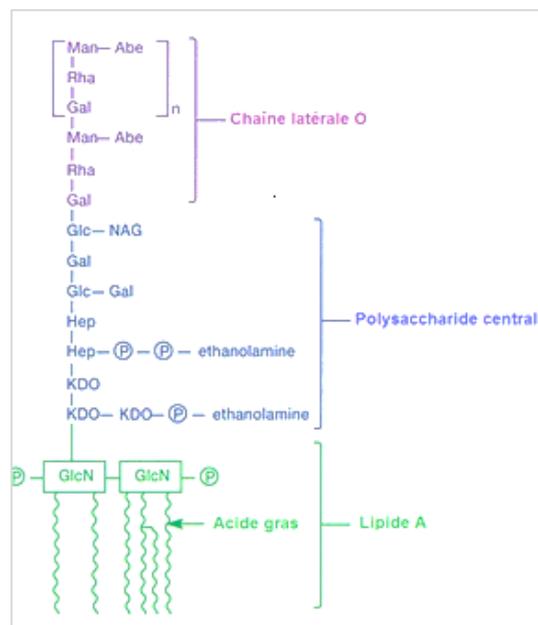


Figure 1.4 : La structure des lipopolysaccharides de *Salmonella*. (**Abe**, abéquose ; **Gal**, galactose ; **Glc**, glucose ; **GlcN**, glucosamine ; **Hep**, heptulose ; **KDO**, 2-céto-3-désoxyoctonate ; **Man**, mannose ; **NAG**, N-acétylglucosamine ; **P**, phosphate ; **Rha**, L-rhamnose).

Un autre composant important de la ME est la lipoprotéine de Braun (Lpp). Cette protéine interagit de façon covalente et non covalente avec le PG, permettant ainsi de maintenir l'intégrité de la ME. Tout comme le LPS, la Lpp stimule dans l'organisme une réponse inflammatoire efficace.

La paroi de **peptidoglycane (PG, ou muréine)** est un hétéropolymère linéaire géant de 5 à 10 nm d'épaisseur, qui constitue une sorte de sac recouvrant totalement la membrane cytoplasmique (d'où les noms de saccule ou de mucopeptide). L'importance de la paroi peut être déduite des caractéristiques de cellules, appelées protoplastes, obtenues après son élimination par traitement au lysozyme, enzyme qui détruit l'intégrité du polymère.

Si l'on suspend des protoplastes dans de l'eau distillée (condition d'hypotonie), la différence des concentrations des solutés entre les milieux externe (faible) et endocellulaire (plus élevée) fait pénétrer l'eau dans la cellule, qui gonfle. La diminution de concentration

intracytoplasmique des solutés qui en résulte ne permet cependant pas d'équilibrer les pressions intérieure et extérieure ; en conséquence, le protoplaste continue à accepter l'eau jusqu'à exploser. En revanche, des protoplastes suspendus dans une solution de saccharose à une concentration qui équilibre la concentration intracellulaire des solutés (condition dite isotonique) ne sont pas affectés par l'absence de paroi. L'eau est alors en équilibre dans les deux compartiments ; la pression intracellulaire se distribue de façon homogène dans les trois dimensions du volume cellulaire, conduisant le protoplaste à prendre une forme sphérique. La **paroi** interne donc une contrainte à l'expansion de la cellule malgré la forte pression exercée par le compartiment intracellulaire. Elle est l'**exosquelette** bactérien, et joue un rôle essentiel de **protection** et de **maintien** de la forme de la cellule.

La **membrane interne (MI)**, ou membrane cytoplasmique, est une structure très dynamique. D'une épaisseur d'environ 7,5 nm, elle est formée d'une double couche de phospholipides (PL), contrairement aux autres membranes biologiques. Elle contient environ 1/3 de toutes les protéines cellulaires, dont environ 1/3 sont des protéines de transport. On distingue deux types de protéines membranaires, celles dites intégrales, qui traversent la membrane par des domaines à hélices transmembranaires, et des lipoprotéines, ancrées dans le feuillet externe par le biais d'un groupement lipidique. Environ 60 % des phospholipides de la MI sont des acides gras liés à du glycérol-3-phosphate qui sert de barrière de perméabilité sélective pour le passage (entrée et sortie) des ions et molécules diverses.

La MI intervient dans la biosynthèse des lipides, la sécrétion de protéines, et le transport actif des nutriments. Elle est également le siège de la formation des précurseurs de la paroi et de la ME. C'est le siège de diverses fonctions qui, chez les eucaryotes, sont assurées par des organites intracellulaires. S'y trouvent les protéines de la phosphorylation oxydative, donc de la respiration, chez les procaryotes aérobies, et des ATPases pour les anaérobies. Constituant une exception, la chaîne respiratoire des cyanobactéries est localisée sur des membranes internes siège de la photosynthèse, les thylakoïdes.

La MI joue un rôle fondamental dans la réponse de la cellule au milieu extérieur. Sa perméabilité sélective est plus contraignante que celle de la ME. La double couche phospholipidique permet le passage par diffusion de petites molécules non ou faiblement chargées, hydro- ou liposolubles telles que l'eau, gaz (O₂, CO₂, N₂), urée, ammoniacque, glycérol, éthanol ; elle est imperméable aux ions et aux molécules de grandes dimensions, qui traversent la membrane en utilisant une série de transporteurs. La MI confère aux cellules la capacité de percevoir, via des systèmes senseurs, une série de stimuli physiques (lumière, température) et chimiques (osmolarité, disponibilité d'eau et d'autres molécules) provenant du milieu extérieur, et de transmettre un signal dans la cellule afin que celle-ci puisse y répondre, à travers l'expression de gènes spécifiques. C'est ce que l'on définit comme la voie de la transduction du signal.

Le **périplasma**, l'espace compris entre les deux membranes, est un compartiment aqueux, représentent 20-40 % du volume cellulaire. Plus visqueux que le cytoplasme, il a la consistance d'un gel et est riche en protéines solubles ayant des rôles variés. Parmi celles-ci citons : (i) des protéines de liaison, qui aident à l'absorption des sucres, acides aminés, vitamines et minéraux à partir du milieu extérieur ; (ii) Des enzymes de dégradation

(phosphatases, nucléases, protéases, etc.) qui fragmentent les molécules trop grosses pour être transportables par la MI pour les rendre utilisables pour la nutrition ; (iii) des enzymes de détoxification, qui inactivent certains antibiotiques auxquelles les cellules peuvent être exposées (telles les β -lactamases dégradant les pénicillines et les céphalosporines) ; (iv) les protéines impliquées dans la biogenèse du peptidoglycane; (v) les protéines impliquées dans le chimiotactisme. Le périplasme permet aussi aux cellules d'y séquestrer des enzymes potentiellement nuisibles, comme la phosphatase alcaline et d'autres. Toutes les protéines périplasmiques sont synthétisées dans le cytoplasme puis transportées après avoir traversé la MI.

I.2.1.2 Enveloppe des Bactéries Gram⁺ (ou monodermes)

La distinction principale entre l'enveloppe des cellules Gram⁺ et celle des Gram⁻ est l'absence de membrane externe (fig.1.3). Ces bactéries résistent à la pression de turgescence exercées sur la membrane plasmique grâce à l'épaisseur du PG (20 à 80 nm), qui arrive à constituer 40% du poids sec de la cellule. Cette différence d'épaisseur semblerait être responsable de la réponse positive de ces Bactéries à la coloration de Gram, par rétention du colorant cristal violet au niveau de cette enveloppe après le traitement à l'alcool. L'effet de l'alcool, en augmentant la porosité du PG par extraction des lipides de la ME, permettrait la sortie du colorant chez les Bactéries Gram⁻, tandis que le PG chez des Gram⁺ serait peu affecté en raison de son épaisseur.

Chez les Gram⁺, les chaînes de peptidoglycane sont en général reliées par des ponts peptidiques transversaux dont la structure varie selon les espèces. Chaque pont relie le diamino-acide en position 3 (L-Lys ou DAP) à la D-Ala en position 4 de la sous-unité voisine. Chez *S. aureus*, le pont est un pentapeptide de glycine (fig.1.5), tandis que chez *S. pyogenes* ce sont deux alanines.

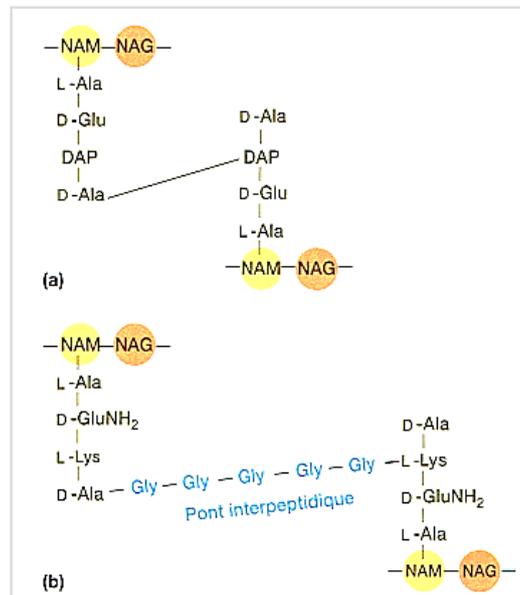


Figure 1.5 : Les pontages du peptidoglycane. (a) Le peptidoglycane d'*Escherichia coli*. (b) Le peptidoglycane de *Staphylococcus aureus*, NAM, acide N-acétylmuramique ; NAG, N-acétylglucosamine ; Gly, glycine ; D- GluNH₂, acide glutamique amidé.

Chez certaines espèces, les chaînes de PG peuvent être liées directement, et non par un pont. Chez *Listeria monocytogenes*, La D-Ala d'une chaîne est directement liée au DAP autre chaîne. Ce sont ces liaisons (directes ou par l'intermédiaire des ponts) entre les chaînes de PG qui confèrent sa rigidité au saccule.

Dans les couches de peptidoglycane sont insérés de longs polymères anioniques, les acides téichoïques. L'acide téichoïque est composé d'unités répétées de 1,3- glycérol-phosphate ou de 1,5,-D-ribitol-phosphate, dont certaines unités peuvent être substituées par des esters de D-alanine glycosylée. Les acides téichoïques sont fixés de manière covalente soit au PG, soit aux lipides de la membrane cytoplasmique. On les appelle, dans ce cas, des acides lipotéichoïques.

La surface des micro-organismes Gram⁺ est en outre tapissée d'une grande variété de protéines (des centaines) dont certaines sont analogues aux protéines périplasmiques des organismes Gram⁻. En raison de l'absence de la ME, ces protéines extracellulaires sont localisées dans la membrane interne ou à sa proximité. Certaines traversent la membrane, d'autres y sont ancrées par l'intermédiaire des lipides, et d'autres encore forment des liaisons covalentes avec le PG ou avec l'acide téichoïque. Ces protéines ont une grande variété de fonctions, telles que : acquisition d'éléments nutritifs, liaison aux tissus ou aux composantes du système immunitaire spécifique de l'hôte chez les Bactéries pathogène, l'agrégation intercellulaire au cours du transfert conjugatif d'ADN, etc.

I.2.1.3 Autres types d'enveloppes de Bactéries

L'enveloppe d'un certain nombre de Bactéries diffère des précédentes.

La paroi des Mycobactéries, par exemple, est essentiellement composée d'une épaisse couche formée de trois structures liées de manière covalente : le peptidoglycane, l'arabino-galactane et des acides mycoliques. Une liaison covalente entre les acides mycoliques conduit à la formation d'une couche, parfois appelée mycomembrane, ayant une fluidité extrêmement faible. La partie extérieure de la mycomembrane contient des lipides libres variés, comme les glycolipides phénoliques, les sulfolipides et phosphatidylinositol-mannosides, intercalés entre les acides mycoliques.

Les cellules des Mycoplasmes, des organismes commensaux des animaux, sont dépourvues de paroi. Elles peuvent vivre librement sous forme de protoplastes, soit parce que leur membrane cytoplasmique contient des stérols qui lui confèrent une certaine rigidité, soit parce que ces organismes vivent dans un habitat où la pression osmotique est contrôlée (par exemple le corps humain).

I.2.2 Structures péri- et trans-enveloppes

L'enveloppe des procaryotes contient de nombreux types de structures et/ou d'appendices situés sur la surface de la cellule, couvrant une panoplie de fonctions.

I.2.2.1 Couches externes

○ La couche S

C'est une sorte de supra-structure située à l'extérieur de l'enveloppe, formée par l'auto-assemblage de sous-unités de protéines et de glycoprotéines et sucres. Cette couche crée sur la surface de la cellule un grillage cristallin de 5-25 nm. Les mailles de ce grillage (**fig.1.6**) peuvent avoir diverses formes géométriques, hexagonales, carrées, selon le nombre et la structure des sous-unités qui le composent.

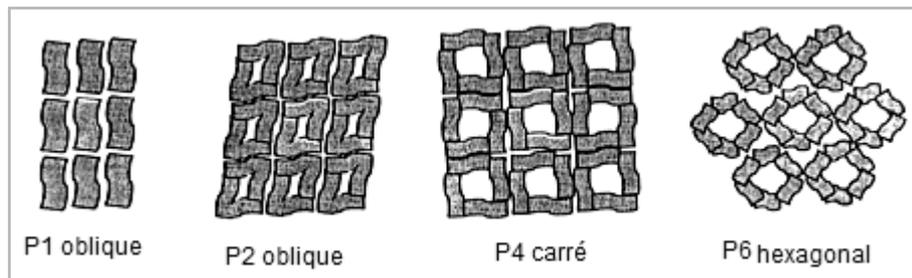


Figure 1.6 : La couche S. Différents types d'assemblage des sous-unités.

La fonction de la couche S reste peu connue. Sa présence fréquente chez des procaryotes divers suggère qu'elle doit jouer un rôle important, même si sa perte n'a pas de conséquence pour des cellules cultivées en laboratoire. Ce pourrait être une sorte de tamis destiné à empêcher le passage de macromolécules toxiques, donc à protéger les cellules. Elle pourrait promouvoir leur adhésion sur des surfaces, ou contribuer à la rigidité de la paroi, ou encore avoir un rôle de défense contre le système immunitaire chez les espèces pathogènes.

○ La capsule ou glycocalix

Formée d'un polysaccharide très hydraté (> 95 % d'eau), entoure la surface externe de nombreuses Bactéries Gram+ et Gram-. Elle peut contenir en outre des polyalcools, des polyamines ou des polymères d'acides aminés, comme chez *Bacillus anthracis*. Elle peut présenter deux structures, soit étroitement liée à la cellule et désignée par le nom de capsule, soit plus lâche et dite couche visqueuse (*slime*). Sa taille et sa composition varient avec les espèces et les souches.

Les capsules sont considérées comme des structures protectrices, notamment contre le dessèchement ; elles joueraient aussi un rôle dans l'adhérence sur des surfaces et dans la formation de biofilms. La présence d'une capsule est importante dans la pathogénicité de nombreuses Bactéries, chez lesquelles elle agit comme facteur de virulence et de protection contre la phagocytose. En effet, chez de nombreux pathogènes humains, les différences sérologiques des souches sont à attribuer aux variations des antigènes de cette capsule. Ainsi on connaît 80 types différents de polysaccharides capsulaires (appelés aussi **antigènes K**) chez *E. coli*, et plus de 90 chez *Streptococcus pneumoniae*. Ce nombre élevé de variants chez *S. pneumoniae* est à la base de la difficulté à obtenir des vaccins contre cet important pathogène. La présence d'une capsule associée à la virulence des Bactéries s'observe aussi chez les bactéries pathogènes des plantes, comme les souches des genres *Pseudomonas*, *Rhizobium* et *Erwinia*.

I.2.2.2 Appendices de surface

De nombreux procaryotes présentent sur leur surface une ou un ensemble de protéines assemblées sous forme d'appendices, constituant deux catégories d'organites : les flagelles (dans 80 % des espèces connues), qui sont des organes de locomotion, et les pili (ou fimbriae), structures d'adhésion. La présence de ces appendices pourrait être associée à l'adaptation à l'environnement ou, dans le cas des bactéries pathogènes, à la capacité à infecter et à coloniser différents hôtes ou tissus de ces derniers.

o Flagelles

Ces éléments facultatifs retrouvés chez certaines bactéries sont des appendices locomoteurs s'étendant à l'extérieur de la membrane cytoplasmique et de la paroi cellulaire. Bien que leur fonction principale soit la mobilité, ils peuvent avoir d'autres rôles. Ce sont des acteurs importants dans certains types d'essaimage et dans l'attachement aux surfaces. Chez quelques bactéries, ce sont des facteurs de virulence.

Les flagelles bactériens sont des structures rigides, minces, d'environ 20nm de diamètre et ayant jusqu'à 20 µm de long. Le mode de distribution des flagelles varie souvent selon les espèces bactériennes. Il est de ce fait utile pour les identifier. Les bactéries **monotriches** (du grec trikhos, cheveu) (**fig.1.7 a**) ont un seul flagelle ; s'il est situé à une extrémité, on le dit **polaire**. Les bactéries **amphitriches** (du grec amphi, des deux côtés) ont un seul flagelle à chaque extrémité. Par contre les bactéries **lophotriches** (**fig.1.7 b**) ont une touffe de flagelles à une ou aux deux extrémités. Les flagelles sont distribués sur toute la surface des bactéries **péritriches** (du grec peri, autour) (**fig.1.7c**).

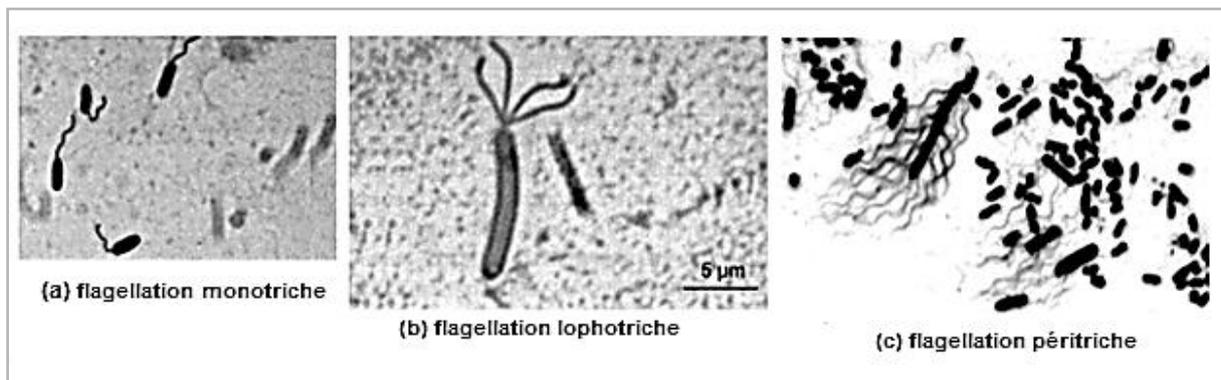


Figure 1.7 : La distribution des flagelles.

La microscopie électronique à transmission a permis de montrer que le flagelle bactérien se compose de trois parties (**fig.1.8**). (1) La partie la plus longue et la plus évidente, le **filament**, s'étend depuis la surface cellulaire. (2) Un **corps basal** est enfoui dans la cellule et (3) un segment court et courbe, le **crochet**, lie le filament au corps basal et agit comme un accouplement. Le filament est un cylindre creux, rigide, constitué de sous unités d'une protéine, la **flagelline**, dont la masse moléculaire varie de 30 000 à 60 000 Da selon l'espèce bactérienne. Le filament se termine par une protéine de chapeau. Les flagelles de certaines bactéries sont entourés d'une gaine. Ainsi *Vibrio Cholerae* a une gaine lipopolysaccharidique.

Le corps basal est la structure la plus complexe d'un flagelle. Dans les premières images obtenues par microscopie électronique à transmission, le corps basal d'*E. coli* et de la

plupart des bactéries Gram-négatives semblaient avoir quatre anneaux (L,P, S et M) attachés à un axe central (fig.1.8 a).

Les bactéries Gram-positives n'ont que deux anneaux sur le corps basal, un anneau interne connecté à la membrane cytoplasmique et l'autre probablement attaché au peptidoglycane (fig.1.8 b).

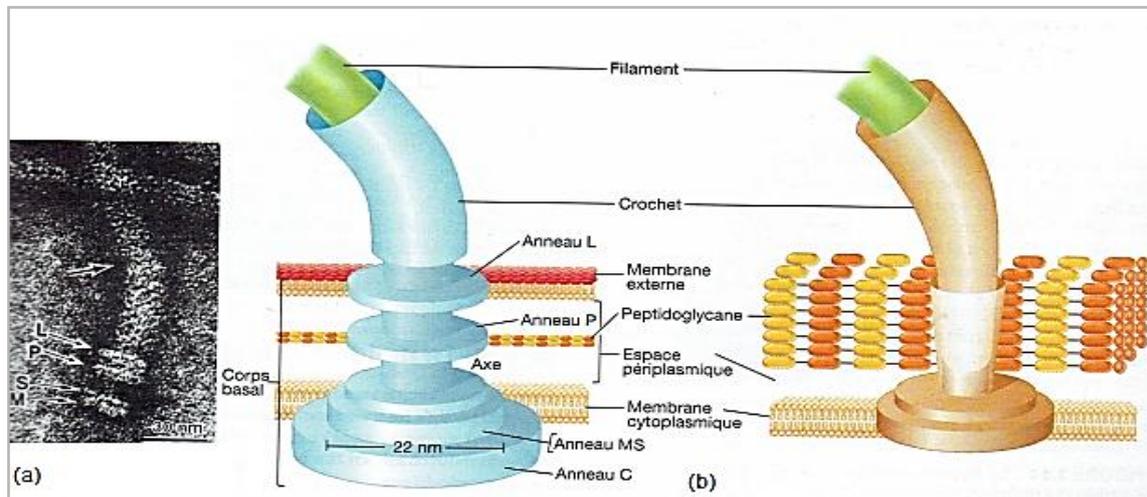


Figure 1.8 : L'ultrastructure du flagelle bactérien.

Un des avantages de la mobilité est de permettre à la bactérie de se diriger vers un environnement favorable ou de fuir de mauvaises conditions. La réaction d'une bactérie qui la pousse à se rapprocher d'un stimulus particulier s'appelle **tactisme**. Les stimuli peuvent être de nature chimique (**chimiotactisme**) ou lumineuse (**phototactisme**). Les bactéries mobiles possèdent des récepteurs à divers endroits, tels que dans la paroi cellulaire ou juste au-dessous. Ces récepteurs captent les stimuli chimiques, tels que l'oxygène, le ribose et le galactose. L'information communiquée par le stimulus est transmise aux flagelles. Dans le cas d'un signal chimiotactique positif, dit **attractif**, les bactéries se dirigent vers le stimulus en faisant de nombreuses nages et peu de culbutes. Dans le cas d'un signal chimiotactique négatif, dit **répulsif**, la fuite des bactéries s'accompagne de culbutes fréquentes.

On peut identifier certaines bactéries pathogènes grâce à leurs protéines flagellaires. La protéine flagellaire appelée **antigène H** permet de distinguer les **sérotypes**, c'est-à-dire les variations au sein d'une même espèce, de bactéries flagellées à Gram négatif. Par exemple, il y a au moins 50 antigènes H différents chez la bactérie *Escherichia coli*.

○ Fimbriae et pili

Beaucoup de bactéries à Gram négatif possèdent des appendices filiformes qui sont plus courts, plus droits et plus minces que les flagelles et qui servent plutôt à fixer la bactérie qu'à la faire avancer. Ces structures, constituées d'une protéine appelée **piline**, sont de deux types, les **fimbriae** et les **pili**, qui ont des fonctions très différentes.

Les **fimbriae** (fimbria au singulier) émergent des pôles de la cellule bactérienne ou sont uniformément distribuées sur toute sa surface. Leur nombre peut varier de quelques-unes à plusieurs centaines par cellule (fig. 1.2). Les fimbriae ont tendance à adhérer les unes aux

autres et aux surfaces avec lesquelles elles entrent en contact. C'est ainsi qu'elles participent à la formation des biofilms et à divers regroupements de micro-organismes sur les liquides, le verre ou les pierres. Elles permettent aussi aux bactéries d'adhérer aux cellules épithéliales à l'intérieur du corps. Voici deux exemples : les fimbriae de *Neisseria gonorrhoeae* ; bactérie qui cause la blennorragie, facilitent l'adhérence du microbe aux muqueuses, étape préalable au développement de la maladie ; les fimbriae d'*E. coli* O157 rendent cette bactérie capable d'adhérer à la muqueuse de l'intestin grêle et d'y causer une diarrhée grave. Quand il n'y a pas de fimbriae (par suite d'une mutation génique), l'implantation n'a pas lieu et la maladie ne se manifeste pas.

Les **pili** (pilus au singulier) sont généralement plus longs que les fimbriae et leur nombre ne dépasse par un ou deux par cellule. Ils confèrent une certaine mobilité au organisme et participent au transfert d'ADN. Ils sont à l'origine de la **motilité par secousses**, un type particulier de locomotion au cours duquel un pilus s'allonge par l'addition de sous-unités de piline, se fixe à une surface ou à une autre cellule, puis se rétracte en retirant des sous-unités de piline. Cette forme de motilité, appelée modèle du **grappin**, se manifeste par une succession de mouvements courts et saccadés. On l'observe chez *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* et certaines souches d'*E. coli*. Les pili sont à l'origine d'un second type de locomotion, appelé **motilité par glissements continus**, qui caractérise les déplacements tout en douceur des myxobactéries.

Certains pili, appelés **pili de conjugaison**, ou **pili sexuels** permettent aux bactéries de s'unir et de s'échanger de l'ADN. Au cours de la conjugaison, une cellule bactérienne, dite F+, fixe son pilus au récepteur de surface d'une autre bactérie, qui peut être ou non de la même espèce et lui transfère de l'ADN. La cellule réceptrice peut acquérir de cette façon une nouvelle fonction, telle que la résistance à un antibiotique ou la capacité de mieux digérer les nutriments de son milieu.

○ Filaments axiaux

Les spirochètes sont un groupe de bactéries dont la structure et la mobilité sont uniques. Un des spirochètes les mieux connus est *Treponema pallidum*, qui cause la syphilis. Un autre est *Borrelia Burgdorferi*, qui cause la maladie de Lyme. Ces bactéries se déplacent au moyen de **filaments axiaux**, ou **endoflagelles**. Il s'agit de faisceaux de fibrilles qui prennent naissance aux extrémités de la bactérie sous une gaine externe et qui forment une spirale autour du corps de la cellule.

Les filaments axiaux, qui sont amarrés à une extrémité du spirochète, ont une structure semblable à celle des flagelles. Il permet probablement aux bactéries telles que *T. pallidum* de se déplacer efficacement dans les liquides organiques, ce qui contribue à la virulence du microbe.

I.2.3 Cytoplasme

En raison de l'absence de compartimentation des cellules procaryotes, l'ensemble des constituants solubles (macromolécules, molécules organiques ou minérales, éventuels organites, etc.) sont localisés dans le cytoplasme, ou cytosol. Celui-ci est donc le lieu de nombre de processus vitaux. Il représente 60-70 % du volume total de la cellule (entre < 0,2

et plusieurs μm^3 selon les espèces). Sa composition chimique et ses propriétés physiques varient en fonction de l'état physiologique et des fluctuations physico-chimiques de l'environnement. Chez *E. coli*, il occupe environ $0,2 \mu\text{m}^3$ en cours de croissance exponentielle. Le cytoplasme des procaryotes possède une organisation spatiale et temporelle précise, qui peut être sous-divisée en trois zones : **(i)** le nucléoïde, c'est-à-dire l'ADN, constituant le (ou les) chromosome(s), associé à des protéines et fortement compacté; **(ii)** les domaines structuraux comprenant le cytosquelette ; et **(iii)** des domaines métaboliques avec compartimentation de nombreuses protéines et de certains ARN, et l'éventuelle présence d'inclusions et/ou d'organites.

I.2.3.1 Les inclusions

Représentent plusieurs catégories de réserves métaboliques, telles le glycogène (un polymère du glucose), des granules de poly- β -hydroxybutyrate (PHB) ou poly- β -hydroxyalkanoate (réserves de carbone et d'énergie, une inclusion fréquente des Bactéries et des Archées), de polyphosphates (une source de phosphate pour les acides nucléiques et les phospholipides), de S (source de S et d'énergie), des esters de cire, des triglycérides, de la cyanophycine (réserve d'azote et/ou de carbone). L'accumulation de ces produits est généralement une réponse à un déséquilibre nutritif, tel un excès de carbone.

○ Granules de glycogène

Le glycogène est une longue chaîne de glucose ramifiée. Ces granules se forment lorsque les bactéries se développent dans un milieu carencé en un élément nutritif important (p.ex le phosphate), mais contenant un excès de carbone. Ils servent donc de réserve de carbone jusqu'à ce que l'élément nutritif manquant soit à nouveau disponible. Si les cellules sont riches en glycogène, elles seront colorées en brun rouge par une solution iodée.

○ Granules de poly- β -hydroxyalkanoate (PHA)

Le carbone peut également être stocké sous forme de granules de polyhydroxyalkanoate (PHA). On a identifié plusieurs types de granules de PHA, mais les plus communs sont ceux de poly- β -hydroxybutyrate (PHB). Le PHB est constitué de molécules de β -hydroxybutyrate reliées par des liaisons ester entre les groupes carboxyle et hydroxyle de molécules adjacentes. Les granules de PHB ont environ $0,2$ à $0,7 \mu\text{m}$ de diamètre. On peut les observer au microscope optique après coloration au noir soudan. Ils apparaissent comme des « trous » vides au microscope électronique, la plus grande partie de l'intérêt porté aux PHB et aux autres granules de PHA réside dans leur utilisation industrielle pour la fabrication de plastiques biodégradables.

○ Granules de polyphosphate et globules de soufre

Ces inclusions inorganiques sont observées dans de nombreux organismes. La plupart des bactéries emmagasinent le phosphate sous forme de granules de polyphosphate, appelé aussi granules de volutine ou granules métachromatiques. Ces granules servent donc de réservoirs de phosphate, un composant important requis pour de réservoirs de phosphate, un composant important requis pour la synthèse de constituants cellulaires tels les acides nucléiques. Dans certaines cellules, le poly phosphate sert de

réserve énergétique qui est utilisée dans certaines réactions. On désigne parfois ces polyphosphates de réserve comme les granules métachromatiques en raison de leur effet métachromatique. C'est à dire qu'ils sont rouges ou bleus après coloration par le bleu de méthylène ou de toluidine.

Les bactéries, qui utilisent des composés contenant du soufre réduit comme source d'électrons pendant les processus métaboliques de conservation de l'énergie, forment globules de soufre. Par exemple, certaines bactéries photosynthétiques peuvent utiliser le sulfure d'hydrogène (plutôt que l'eau) comme donneur d'électrons et accumulent le soufre produit à l'extérieur ou à l'intérieur de la cellule.

○ Granules de cyanophycine

Sont composés de grands polypeptides constitués d'une quantité plus ou moins égale d'acide aspartique et d'arginine. La formation de ces granules a un intérêt particulier, parce que ces polypeptides ne sont pas encodés par un ARNm et ne sont pas synthétisés par les ribosomes. Ces granules sont suffisamment grands pour être visibles au microscope optique et servent de réserve d'azote en excès pour les bactéries.

I.2.3.2 Carboxysomes

Ces organites (**fig.1.9A**), présents chez de nombreux procaryotes chimiolithotrophes obligés (Cyanobactéries) ou facultatifs (*Thiobacillus spp.*, *Nitrobacter spp.* et *Nitrosomonas spp.*), ont été décrits il y a plus de 50 ans comme des corps polyédriques, et ont représenté le premier cas de compartimentation cellulaire reconnu chez les procaryotes.

En concentrant le dioxyde de carbone (*Carbon-Concentrating Mechanism*, CCM), ils jouent un rôle clé dans l'efficacité de la fixation autotrophe du carbone *via* le cycle de Calvin. Le carboxysome est composé de plusieurs milliers de polypeptides de 10-15 types différents, délimitant une enveloppe protéique de 3-4 nm d'épaisseur. Ce complexe, d'environ 80-150 nm de section, a une masse de l'ordre de 300 MDa.

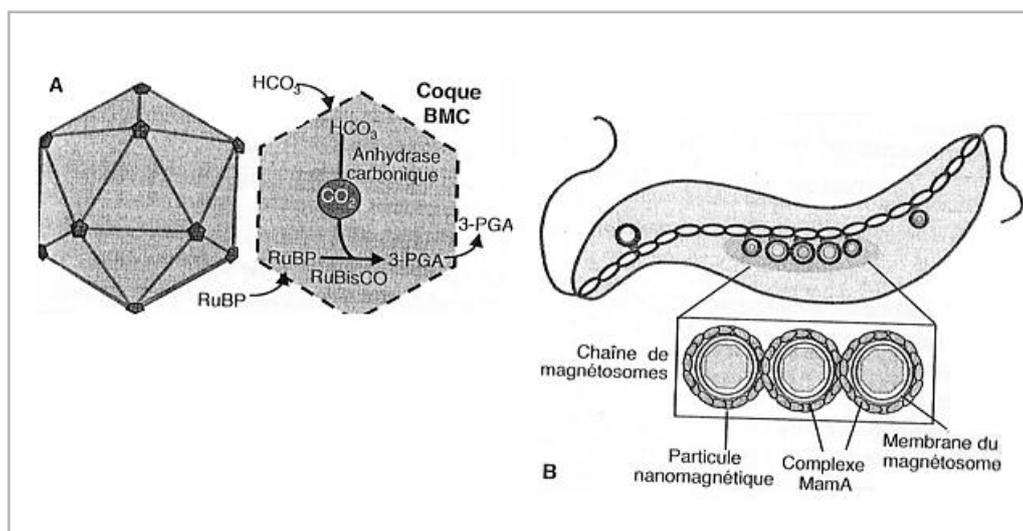


Figure 1.9: Deux organites cellulaires bactériens. **A** : un carboxysome, **B** : une chaîne de magnétosomes.

I.2.3.3 Magnétosomes

Ces organites spécialisés contiennent des nanocristaux de magnétite (Fe_3O_4) ou de gréigite (Fe_3S_4). Leurs caractéristiques et leur complexité rappellent les organites des eucaryotes. Ces structures, de 35 à 120 nm, sont délimitées par une membrane lipidique bicouche associée à un groupe spécifique de protéines dont la composition en acides gras suggère qu'elle pourrait dériver de la membrane cytoplasmique (fig.1.9B).

Les magnétosomes ont suscité un grand intérêt biotechnologique en raison du large éventail de leurs applications possibles, dont la résonance magnétique et le traitement hyperthermique du cancer.

a) Vacuoles gazeuses

Les vacuoles gazeuses confèrent une flottabilité à certaines bactéries. On observe des vacuoles chez de nombreuses bactéries photosynthétiques et quelques bactéries aquatiques non photosynthétiques (p.ex. *Thiothrix*, une bactérie filamenteuse). Les vacuoles gazeuses sont ensembles d'un très grand nombre de petites structures cylindriques creuses, appelées vésicules gazeuses (fig.1.10). Les parois de ces vésicules sont entièrement constituées d'une seule petite protéine. Les sous unité protéiques s'assemblent pour former un cylindre rigide, creux, imperméable à l'eau, mais perméable aux gaz atmosphériques. Les cellules munies de vacuoles gazeuses flottent à la profondeur nécessaire pour capter un maximum de lumière, d'oxygène et de nourriture. Elles descendent simplement en dégonflant leurs vésicules et montent en formant de nouvelles vésicules.

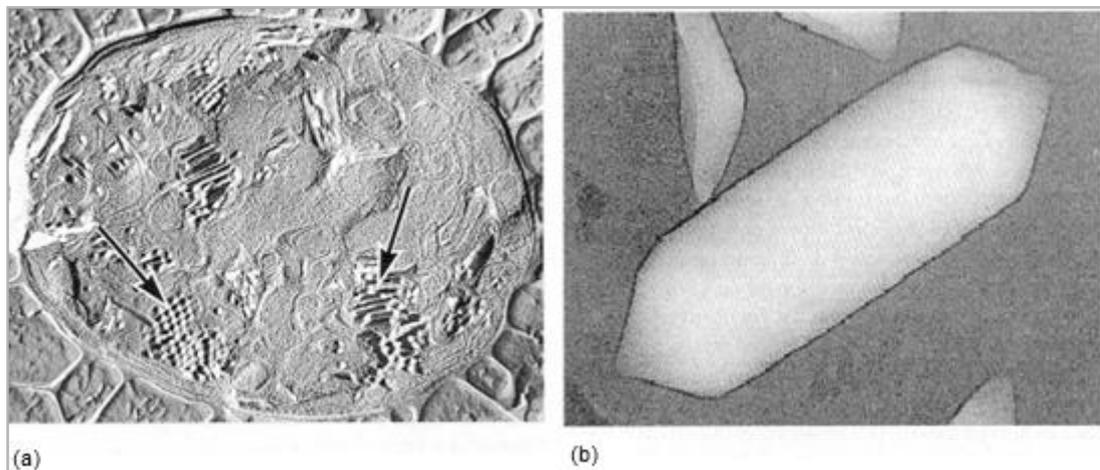


Figure 1.10 : Les vésicules et les vacuoles gazeuses. (a) : une préparation par cryodécoupage d'une cyanobactérie montrant des ensembles de vésicules et de vacuoles gazeuses (x89 000) ; (b) : vésicule gazeuse de *Helibacterium salinarum* (~150 000).

I.2.4 Région nucléaire

I.2.4.1 ADN et nucléoïde

L'ADN des cellules procaryotes est contenu dans une région appelée nucléoïde. Ce terme, employé souvent comme synonyme de chromosome ou encore de génome procaryote. Le nucléoïde apparaît à l'observation microscopique comme un corps amorphe, occupant la région centrale du cytoplasme, avec des lobes irréguliers protubérants. L'unique chromosome de la plupart des bactéries est un acide **désoxyribonucléique (ADN)** double

brin circulaire, mais certaines bactéries possèdent un chromosome d'ADN linéaire et d'autres, comme *Vibrio Cholerae* et *Borrelia Burgdorferi* (les agents respectifs du choléra et de la maladie de Lyme) ont plus d'un chromosome.

La structure de l'ADN dans le nucléoïde est compacte. Il occupe environ 10-20 % du volume du cytoplasme. Une partie plus ou moins importante de l'ADN cellulaire ne fait pas partie intrinsèque du nucléoïde, mais représente de nombreuses familles d'éléments génétiques dispersés dans le cytoplasme, les plasmides.

I.2.4.2 Plasmide

En plus du matériel génétique présent dans le nucléoïde, beaucoup de bactéries, d'archées, ainsi que quelque levure et d'autre champignon possèdent des molécules d'ADN extra chromosomiques appelées **plasmides**.

Les plasmides sont de petites molécules circulaires d'ADN double brin qui sont indépendantes du chromosome. Il y a des plasmides circulaires et des plasmides linéaires, mais la plupart, de ceux qui sont connus, sont circulaires. Les plasmides ont relativement peu de gènes, généralement moins de 30. Leur information génétique n'est pas nécessaire à l'hôte et les cellules, qui en sont dépourvues, ont habituellement une activité normale. Néanmoins de nombreux plasmides portent des gènes qui donnent à leur hôte un avantage sélectif dans certains milieux. Les plasmides sont capables de se répliquer de manière autonome. C'est-à-dire que les réplifications du chromosome et du plasmide sont indépendantes. Certains plasmides, appelés **épisomes**, s'intègrent dans le chromosome et sont répliqués avec ce dernier.

On classe les plasmides selon leur mode d'existence, de propagation et de fonctionnement en : Plasmides conjugatifs capables de transférer leur copie vers d'autres bactéries pendant la conjugaison. Les facteurs de résistance (les **facteurs R** ou **plasmides R**) sont également des plasmides conjugatifs. Ils confèrent une résistance aux antibiotiques chez les cellules qui les contiennent.

Plusieurs autres types de plasmides importants, comme les plasmides codant les bactériocines, les plasmides de virulence et les plasmides métaboliques, ont été découverts. Les plasmides codant des bactériocines pouvant donner à leurs hôtes bactériens un avantage compétitif dans le monde microbien. Les bactériocines sont des protéines qui détruisent d'autres bactéries étroitement apparentées.

Les plasmides de virulence déterminent des facteurs qui rendent les bactéries plus pathogènes. Les souches entérotoxigènes d'*E.coli* responsables de la diarrhée du voyageur portent un plasmide qui code pour une entérotoxine.

Les plasmides métaboliques ont des gènes d'enzymes qui dégradent des substances telles que des composés aromatiques (toluène), des pesticides (acide 2,4-dichlorophenoxyacétique) et des glucides (lactose). Des plasmides métaboliques de certaines souches de *Rhizobium* portent même les gènes nécessaires pour induire une nodulation chez légumineuse et de fixer l'azote.

I.2.5 Ribosomes

Les ribosomes sont des particules ribo-nucléo-protéiques, toujours présentes dans les cellules, sites de la traduction des ARN messagers en protéines. Ce sont des structures de 17-21 nm dans leur plus grande largeur chez les procaryotes, dont l'architecture est universelle dans le monde vivant. Le coefficient de sédimentation des ribosomes procaryotes est de 70 unités Svedberg, d'où la désignation de ribosomes 70S. Les ribosomes sont formés de deux sous-unités, 50S et 30S (notons que les unités S ne sont pas additives : $50S + 30S = 70S$), contre 40S et 60S chez les eucaryotes. Un ribosome est composé d'un grand nombre de protéines différentes et de trois types d'ARN (ARNr, pour ARN ribosomal) chez les procaryotes, contre quatre chez les eucaryotes.

I.2.6 Endospores

Plusieurs genres de bactéries Gram-positives, dont *Bacillus* et *Clostridium* (des bâtonnets), *Sporosarcina* (des coques), forment une structure résistante, dormante, appelée **endospore**. La formation de l'endospore (la sporulation) débute normalement lorsque la croissance cesse par manque de nutriment. C'est donc un mécanisme de survie permettant à la bactérie de produire une cellule dormante, qui peut survivre jusqu'à ce que les nutriments soient à nouveau disponibles et que la croissance végétative puisse reprendre.

Les endospores sont extraordinairement résistantes aux stress environnementaux comme la chaleur, les radiations ultraviolettes, les radiations gamma, les désinfectants chimiques et la dessiccation.

La position de l'endospore dans la cellule mère ou **sporange** diffère fréquemment selon les espèces, ce qui est d'une grande utilité pour une identification. Les endospores sont localisées au centre ou à proximité d'une extrémité (subterminales) ou à l'extrémité (terminales) (**fig. 1.11**).

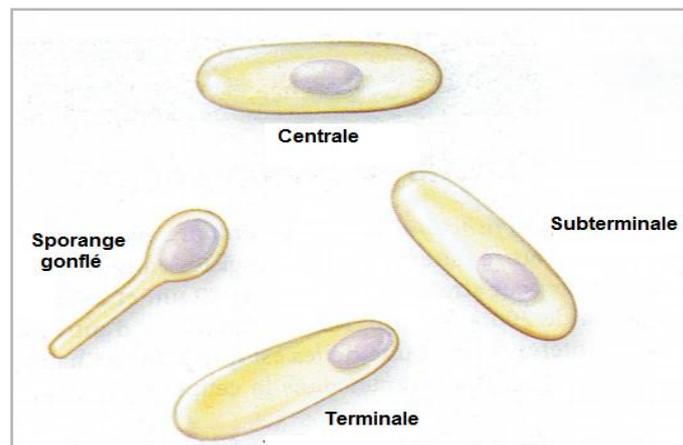


Figure 1.11 : Exemples de localisation et de taille des endospores.

Les images au microscope électronique montrent la complexité de la structure de l'endospore (**fig. 1.12**). La spore est souvent entourée d'une enveloppe mince et délicate, appelée **exosporium**. La **tunique**, située sous l'exosporium, est composée de plusieurs couches de protéines et peut être assez épaisse. Le **cortex**, qui peut occuper plus de la moitié du volume de la spore, est localisé sous la tunique. Il est constitué d'un peptidoglycane moins ponté que celui de la cellule végétative. La paroi de la spore est placée

sous le cortex et entoure le noyau protoplastique. Ce protoplaste possède les structures cellulaires normales telles que les ribosomes et le nucléoïde, mais il a un faible contenu en eau et est inerte d'un point de vue métabolique.

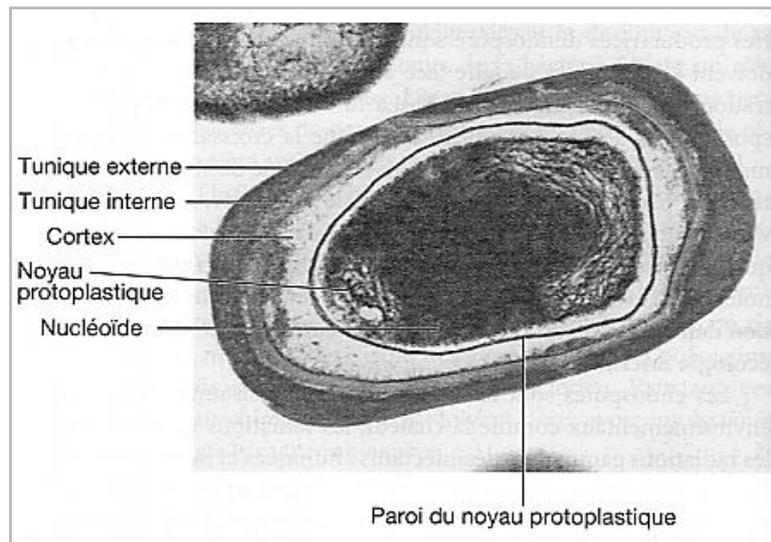


Figure 1.12 : Les endospores bactériennes. Une section transversale d'une spore mature de *Bacillus subtilis* (1.2µm).

Les différentes couches de la spore contribuent à sa résistance à la chaleur et d'autres agents létaux. L'exosporium et la tunique protégeraient la spore contre les agents chimiques. La membrane interne qui sépare le cortex du protoplaste, est imperméable à diverses substances chimiques y compris celles qui occasionnant des dommages à l'ADN. Le protoplaste joue un rôle important dans la résistance. Plusieurs facteurs peuvent avoir un rôle dans la résistance (p.ex. la très faible hydratation, les grandes quantités d'acide dipicolinique complexé aux ions calciques et un pH légèrement plus faible). Mais le facteur principal au protoplaste, qui protège l'ADN de la spore, est le groupe des petites protéines acido-solubles, les protéines SASP (« small, acid- soluble DNA - binding proteins ») qui se fixent à et saturent l'ADN de la spore.

La **sporulation** est un processus complexe qui peut être divisé en sept phases (**fig.1.13**). On observe d'abord la formation d'un filament axial de matériel nucléaire (phase I), suivie de l'invagination de la membrane cellulaire isolant une partie de l'ADN et constituant le septum de la préspore (phase II). La membrane poursuit son développement et entoure la préspore d'une seconde enveloppe (phase III). Le cortex se forme ensuite dans l'espace compris entre les deux membranes; du calcium et de l'acide dipicolinique s'accumulent (phase IV). Les protéines de la tunique sont alors formées autour du cortex (phase V) et l'endospore arrive à maturité (phase VI). Finalement des enzymes lytiques détruisent le sporange libérant la spore (phase VII). La sporulation dure environ 10 heures chez *Bacillus megaterium* pour la formation de la spore bactérienne.

La transformation des spores dormantes en cellules végétatives actives semble être presque aussi complexe que la sporulation. Elle se déroule en trois phases : 1) **l'activation**, 2) la **germination** et 3) **l'émergence**. L'activation est un processus qui prépare les spores à la

germination et se produit généralement suite à un traitement comme un chauffage. Elle est suivie de la germination, l'interruption de l'état de dormance de la spore.

Plusieurs éléments caractérisent la germination : le gonflement de la spore, la rupture ou l'absorption de la tunique, la perte de la résistance à la chaleur ou à d'autres agressions, la perte de la réfringence, la libération de constituants de la spore et l'augmentation de l'activité métabolique. La troisième phase après la germination est l'émergence. Le protoplasme de la spore synthétise de nouveaux composés, émerge des restes de la tunique sporale et donne naissance à une bactérie active.

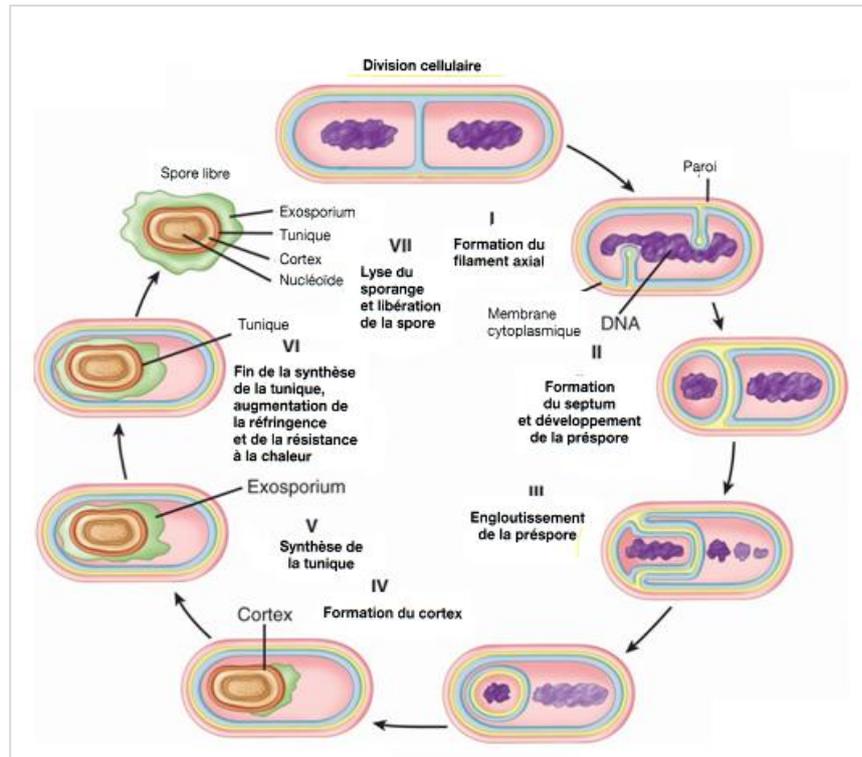


Figure 1.13 : La formation de l'endospore : le cycle de *Bacillus megaterium*.

I.2.7 Cytosquelette

Le plan d'organisation de toute cellule est fondamental pour sa viabilité, y compris chez les procaryotes. Le responsable de cette organisation est un cytosquelette, chez les procaryotes comme chez les eucaryotes, constitué par plusieurs familles de protéines. La conviction a longtemps été que le cytosquelette était une caractéristique exclusive des eucaryotes, d'où les études focalisées sur les trois familles principales de protéines de leur cytosquelette : l'actine, la tubuline, et les protéines du filament intermédiaire. On sait depuis peu d'années que les protéines de ces trois familles ont des homologues chez les procaryotes, respectivement les protéines FtsZ, MreB et les crescentines. FtsZ est la première à laquelle a été assignée une fonction dans l'organisation cellulaire.

Le cytosquelette joue un rôle important dans la morphologie (géométrie et diamètre) et l'organisation interne de la cellule procaryote : localisation de certaines protéines, ségrégation du chromosome et partition des plasmides, division cellulaire, motilité.

II. Chapitre II : Croissance et nutrition

II.1 Croissance

Dans une cellule bactérienne, la croissance consiste en une augmentation coordonnée de la masse des parties constituantes. Ce n'est pas un simple accroissement de la masse totale puisque celui-ci pourrait être dû, par exemple, à l'accumulation d'un produit de réserve à l'intérieur de la cellule. Habituellement, la croissance conduit à la division de la cellule en deux cellules semblables ou identiques.

II.1.1 Dynamique de la croissance bactérienne

La croissance bactérienne comporte deux phases : la phase de vie végétative (ou de synthèse) de la bactérie et la division cellulaire. La phase de synthèse représente une période d'accumulations quantitatives qui se traduisent par une augmentation de la taille et du volume de la cellule. Elle produit des molécules de structure mais aussi des enzymes capables de déclencher la division. Une fois atteinte une certaine longueur (longueur critique égale à peu près à deux fois la taille normale), le processus de division commence.

La division bactérienne se fait par scissiparité (ou division binaire), une cellule mère donnant chaque fois naissance à deux cellules filles. Ce processus comporte trois étapes :

- La synthèse des protéines initiatrices de la réplication du génome ;
- La réplication de l'ADN chromosomique ;
- La migration de chaque nouveau chromosome à une extrémité de la cellule, suivie rapidement par l'apparition d'un septum membranaire qui sépare deux territoires cytoplasmiques, correspondant aux deux cellules filles.

La fin de la division est marquée par l'hydrolyse des peptidoglycanes de la paroi et la séparation physique des deux cellules. C'est pourquoi certaines bactéries dont la paroi est riche en peptidoglycanes restent pendant un temps relié entre elles par la capsule, ce qui donne l'aspect « en chaînette » ou restent groupées sous diverses autres formes.

Les actinomycètes, les mycobactéries et le genre *Streptomyces* présentent des modes de division différentes, plus proches de la division des champignons.

La durée de la division est déterminée par l'étape d'initiation et peut varier amplement d'une espèce à une autre ou même selon les conditions de culture.

II.1.2 Courbe de croissance

La meilleure façon d'obtenir un grand nombre de microbes ou leurs produits naturels est de cultiver dans un milieu liquide. Normalement, la technique utilisée est appelée « culture en batch » où les bactéries sont inoculées dans des flacons contenant un milieu de culture approprié à une température et un degré d'aération corrects. La croissance des bactéries suit un modèle particulier appelé courbe de croissance bactérienne (**fig.2.1**). Le nombre de bactéries vivantes est mesuré en fonction du temps et est reporté sur une courbe \log_{10} , appelée courbe **semi-logarithmique**. Une échelle logarithmique est utilisée pour schématiser la croissance bactérienne en raison du nombre élevé de bactéries et pour montrer la nature exponentielle de la croissance. La courbe de croissance bactérienne révèle quatre phases de croissance :

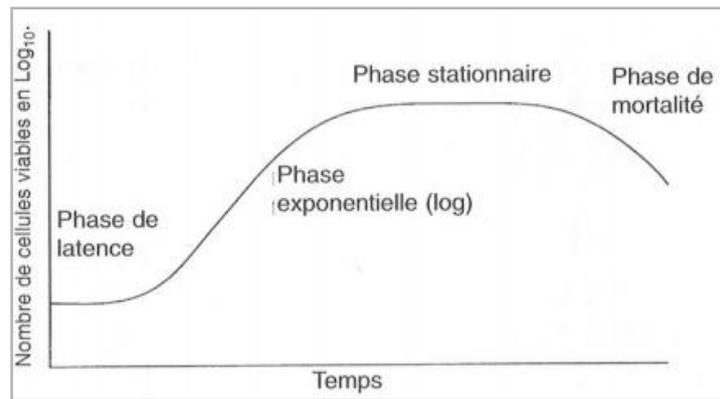


Figure 2.1 : Courbe typique de la croissance bactérienne.

- **Phase de latence** : lorsque les bactéries sont inoculées dans un milieu, il existe une période pendant laquelle aucune croissance ne se fait. Durant cette phase, les bactéries s'adaptent au nouvel environnement, synthétisent de nouvelles enzymes si besoin et augmentent la taille de la cellule pour se préparer à la division cellulaire. La durée de cette phase dépend de la nature de l'inoculum. S'il provient d'une culture fraîche dans le même milieu, la phase de latence sera courte, mais si l'inoculum est ancien ou le milieu changé (en particulier si on déplace les bactéries d'un milieu riche vers un milieu pauvre) la phase de latence sera longue.

- **Phase exponentielle (logarithmique)** : une fois la division bactérienne commencée, le nombre augmente à un taux constant, ce qui reflète le temps de doublement de la bactérie. Elles se caractérisent par une ligne droite sur le graphe.

- **Phase stationnaire** : comme les bactéries augmentent en nombre, elles utilisent tous les nutriments disponibles et produisent des produits toxiques. Finalement un niveau où il n'y a pas d'augmentation du nombre des cellules est atteint et se caractérise par un plateau sur la courbe. Durant cette phase d'équilibre, les cellules continuent à fonctionner. Il existe une petite mort cellulaire contrebalancée par un taux faible de division cellulaire.

- **Phase de mortalité** : après un certain temps, les taux de mortalité cellulaire devient plus importants que la division cellulaire et le nombre de cellules vivantes chute. Les cellules se lisent et la culture devient moins trouble.

II.1.3 Mathématiques de la croissance

La connaissance des vitesses de la croissance microbienne pendant la phase exponentielle est indispensable. Pendant cette phase, chaque micro-organisme se divise à intervalles de temps constants. La population doublera donc en nombre après un intervalle de temps spécifique appelé **temps de génération** ou **temps de doublement**. On peut illustrer cette situation par un exemple simple. Supposons qu'une culture en tube soit inoculée avec une cellule qui se divise toutes les 20 minutes (**tab.2.1**). La population sera constituée de 2 cellules après 20 min, 4 cellules après 40 minutes et ainsi de suite. Puisque la population double à chaque génération, l'augmentation de la population est toujours 2^n où n est le nombre de générations (**fig.2.2**).

Tableau 2.1 : Un exemple de croissance exponentielle.

Temps ^a	Nombre de divisions	de 2^n	Population ^b ($N_0 \times 2^n$)	$\text{Log}_{10} N_t$
0	0	$2^0=1$	1	0.000
20	1	$2^1=2$	2	0.301
40	2	$2^2=4$	4	0.602
60	3	$2^3=8$	8	0.903
80	4	$2^4=16$	16	1.204

^a La culture hypothétique commence avec une cellule ayant un temps de génération de 20 minutes, ^b Nombre de cellules dans la culture.

Les mathématiques de la croissance pendant la phase exponentielle sont illustrées dans la **figure 2.3** qui montre le calcul de deux valeurs importantes. La vitesse de croissance moyenne (μ) est les nombres de générations par unité de temps et est souvent exprimée par heure. On peut l'utiliser pour calculer le temps de génération moyen (g). Comme le montre la figure 2.3, le temps de génération moyen est simplement la réciproque de la vitesse de croissance moyenne. On peut aussi déterminer directement le temps de génération moyen à partir du graphique semi-logarithmique des données de croissance (**fig. 2.4**).

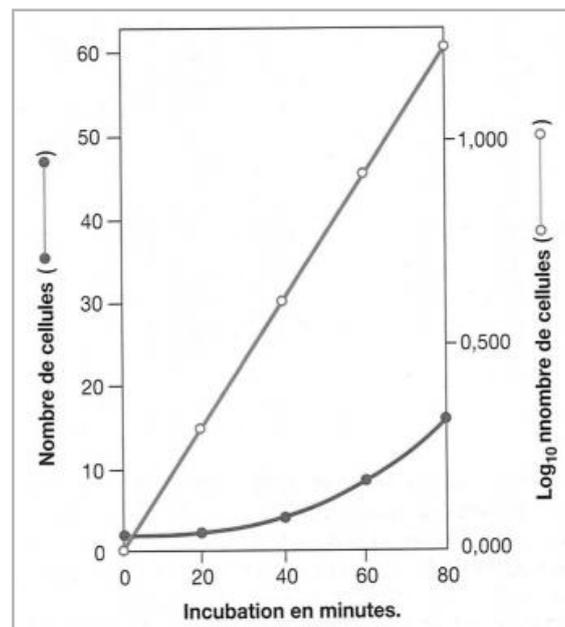


Figure 2.2 : La croissance microbienne exponentielle.

<p>Calcul de la vitesse de croissance moyenne</p> <p>Considérons N_0 = le nombre initial de cellules de la population</p> <p>N_t = la population au temps t</p> <p>n = le nombre de générations dans le temps t</p> <p>Pour des populations se reproduisant par scissiparité</p> $N_t = N_0 \times 2^n$ <p>La valeur de n, le nombre de génération, peut être obtenue en prenant les logarithmes en base 10.</p> $\log N_t = \log N_0 + n \cdot \log 2, \text{ et}$ $n = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2} = \frac{\log N_t - \log N_0}{0,301}$ <p>La vitesse de croissance moyenne (μ) est le nombre de générations par unité de temps $\left(\frac{n}{t}\right)$. Donc</p> $\mu = \frac{n}{t}$	<p>Calcul du temps de génération (de doublement moyen) moyen</p> <p>Si la population double, alors</p> $N_t = 2N_0$ <p>En substituant $2 N_0$ dans l'équation de la vitesse de croissance moyenne, on peut déterminer μ.</p> $\mu = \frac{\log (2N_0) - \log N_0}{0,301g} = \frac{\log 2 + \log N_0 - \log N_0}{0,301g}$ $\mu = \frac{1}{g}$ <p>Le temps de génération moyen est l'inverse de la constante de vitesse de croissance moyenne.</p> $g = \frac{1}{\mu}$
--	---

Figure 2.3 : Le calcul de la vitesse de croissance moyenne et du temps de génération.

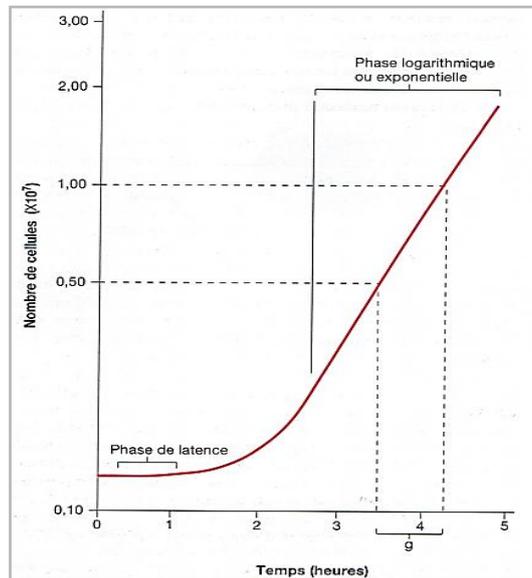


Figure 2.4 : La détermination du temps de génération.

Le temps de génération varie fortement, de 10 minutes (0.17 heure) à plusieurs jours, selon les espèces (tab.2.2) microbiennes et les conditions de l'environnement. Le temps de génération est souvent beaucoup plus long dans la nature qu'en milieu de culture.

Tableau 2.2 : Exemples de temps de génération.

Micro-organisme	Température d'incubation (°C)	Temps de génération (heures)
Bactéries		
<i>Escherichia coli</i>	40	0,35
<i>Bacillus subtilis</i>	40	0,43
<i>Staphylococcus aureus</i>	37	0,47
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37	0,58
<i>Clostridium botulinum</i>	37	0,58
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	37	≈ 12
<i>Treponema pallidum</i>	37	33
Protistes		
<i>Tetrahymena geleii</i>	24	2,2–4,2
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	25	7,75
<i>Paramecium caudatum</i>	26	10,4
<i>Euglena gracilis</i>	25	10,9
<i>Giardia lamblia</i>	37	18
Champignons		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	2
<i>Monilinia fructicola</i>	25	30

II.1.4 Croissance des populations bactériennes

Après la division cellulaire, chaque cellule fille peut elle-même croître et se diviser. Une cellule est donc capable de donner naissance rapidement à une grande population, pour autant que les conditions soient favorables. Dans des conditions adéquates, de telles populations peuvent se développer aussi bien sur des supports solides qu'au sein d'un liquide.

II.1.4.1 Croissance sur milieu solide

Un type de milieu « solide » fort commun, largement employé dans les laboratoires bactériologiques, consiste en une sorte de gelée (gel de gélose ou agar) contenant des substances nutritives et d'autres ingrédients. Supposons qu'une seule cellule bactérienne soit déposée à la surface d'un tel milieu et reçoive tout ce qui lui est nécessaire pour croître et se diviser. Elle va grandir, se diviser en deux cellules filles et chacune de celles-ci fait de même. Si croissance et division continuent, la descendance de la cellule originelle atteindra finalement un nombre de cellules tellement grand qu'il constituera un amas habituellement visible à l'œil nu. Cette masse de cellules s'appelle une colonie.

Dans des conditions données, chaque espèce développe des colonies de taille, de forme (fig.2.5), de couleur et de consistance caractéristiques. Quand la croissance s'effectue sur des milieux différents ou quand d'autres facteurs sont modifiés, divers types de colonies peuvent se former. La taille d'une colonie peut être limitée par l'épuisement local des substances nutritives (épuisement dû à la croissance de la colonie elle-même). C'est pour cette raison que des colonies très rapprochées sont généralement plus petites que des colonies bien espacées. La vitesse à laquelle une colonie augmente de taille dépend de la température et d'autres facteurs. Les bactéries qui produisent des pigments forment généralement des colonies brillamment colorées (rouge, jaune, violet, par exemple) tandis que les bactéries non-pigmentées ont habituellement un aspect gris, blanchâtre ou crème. La consistance d'une colonie peut être mucoïde (visqueuse, apparence de mucus), butyreuse (apparence de beurre), friable, etc. ; sa surface peut être lisse ou rugueuse, brillante ou mate, etc.

Au lieu de partir d'une seule cellule, supposons cette fois qu'un très grand nombre de cellules soient répandues à la surface du milieu. Dans ce cas, l'espace peut manquer pour le développement de colonies individualisées. En conséquence, la descendance de toutes ces cellules formera une couche continue de bactéries qui couvrira toute la surface du milieu. Une telle croissance est dite *confluante*. Il peut aussi y avoir croissance confluante lorsqu'une ou quelques cellules bactériennes *mobiles* sont déposées sur le milieu. La nombreuse descendance de ces cellules peut se déplacer dans le film d'humidité superficielle et finalement couvrir la surface entière du milieu.

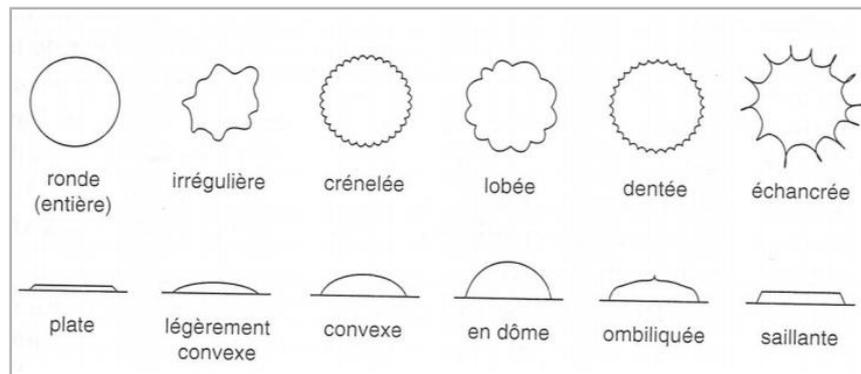


Figure 2.5 : Formes de colonies bactériennes.

La partie supérieure montre la silhouette (le bord) de quelques colonies, vues du dessus ; la partie inférieure montre l'élévation de quelques colonies en vue latérale. Une colonie avec une silhouette ronde (entière) peut avoir n'importe laquelle des élévations, selon l'espèce de bactérie.

II.1.4.2 Croissance en milieu liquide

Les bactéries peuvent se déplacer librement dans un milieu liquide, soit par diffusion, soit, pour les espèces mobiles, par locomotion active. Ainsi, au fur et à mesure que les cellules croissent et se divisent, la descendance se disperse généralement dans tout le milieu. Habituellement, lorsque la concentration en cellules augmente, le milieu devient de plus en plus trouble. Certaines bactéries font exception et tendent à former une couche (une *pellicule*) à la surface du milieu. Sous cette pellicule, le milieu peut être pratiquement dépourvu de cellules. Certaines pellicules renferment des produits bactériens, en plus des bactéries elles-mêmes ; les souches d'*Acetobacter xylinum*, par exemple, forment une pellicule cellulosique rigide.

- **Croissance synchrone**

Dans une population de bactéries en croissance, toutes les cellules ne se divisent pas au même instant. Cependant, au laboratoire, on peut obtenir des populations où tous les individus se divisent à peu près en même temps. Dans de telles *cultures synchrones*, la partie logarithmique de la courbe de croissance prend un aspect d'escalier, où chaque marche représente un doublement brusque du nombre de cellules.

Une méthode pour obtenir une culture synchrone se base sur le fait que le rapport masse/volume (c'est-à-dire la densité) d'une bactérie varie au cours du cycle cellulaire. Ce rapport est plus élevé dans (a) les cellules près de se diviser et (b) les cellules filles nouvellement

formées. Dans une population donnée non-synchrone, les cellules qui ont la densité la plus faible sont vraisemblablement au même stade du cycle cellulaire. On peut séparer cette sous-population de cellules (les moins denses) du reste de la population par centrifugation isopycnique. Cette méthode purement physique présente l'avantage de ne pas perturber le métabolisme cellulaire.

- **Culture continue**

Le problème posé par la « culture en batch » est que la croissance cellulaire s'arrête, provoquée par l'épuisement des nutriments ou par l'accumulation de produits toxiques. Si ces problèmes peuvent être évités en remplaçant le milieu usé par un neuf, la croissance bactérienne peut être maintenue indéfiniment. Il existe des systèmes de flux, comme le **chémostat**, où un milieu frais est constamment ajouté au flacon de culture et qui est maintenu à volume constant pour un système de surflux qui évacue l'excès de liquide (**fig.2.6**) ; ainsi les bactéries sont maintenues à la phase exponentielle de leur croissance. Par conséquent, une fois que le système a atteint l'équilibre, le nombre de cellules est maintenu constant et un taux de croissance constant est atteint. Ce taux de croissance peut être modifié en altérant les conditions comme la composition du milieu et le flux.

Un avantage majeur de ces systèmes est le maintien de conditions constantes pour les études physiologiques. Ceci est impossible avec les « cultures en batch » car la croissance des bactéries modifie les conditions environnementales, comme le pH et la concentration en nutriments du milieu.

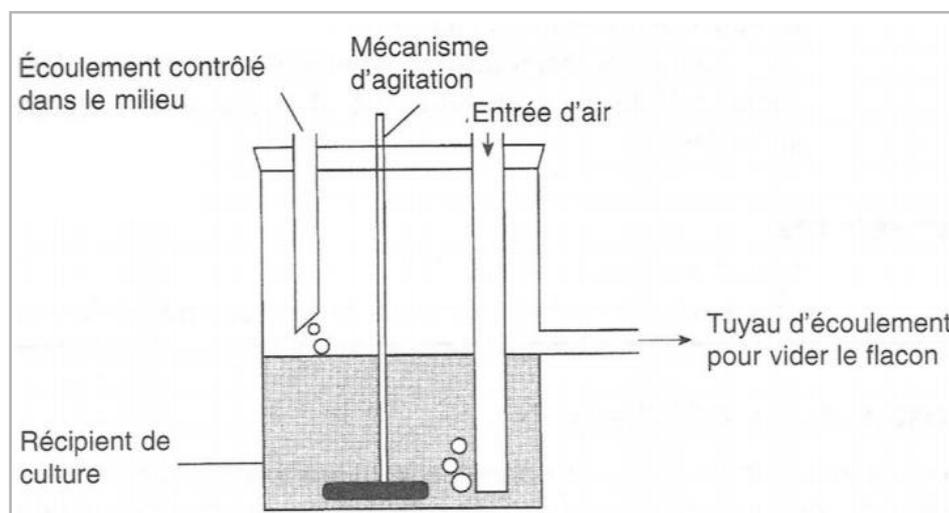


Figure 2.6 : Schéma simplifié d'un système de culture continue.

Un autre type de système de culture continue, le turbidostat est équipé d'une cellule photoélectrique qui mesure la turbidité de la culture (définie par la quantité de lumière diffractée) dans la chambre de culture. La vitesse d'écoulement du milieu dans la cuve est réglée automatiquement pour maintenir une turbidité prédéterminée. Le turbidostat diffère du chémostat sur plusieurs points. La vitesse de dilution dans un turbidostat varie au lieu de rester constante et tous les éléments nutritifs sont en excès dans le milieu de culture. Le turbidostat fonctionne mieux à des vitesses de dilution élevées, alors que le chémostat est plus stable et plus efficace à des vitesses de dilution réduites.

II.1.5 Croissance diauxique

Si une bactérie reçoit un mélange de deux substances nutritives différentes, elle peut en utiliser une de préférence à l'autre - ne commençant à consommer la seconde qu'après que la première soit épuisée. Ainsi, dans un mélange de glucose et de lactose, *E. coli* emploiera d'abord le glucose et n'entamera le lactose que lorsque le glucose aura été consommé. Le passage d'une substance nutritive à l'autre peut s'accompagner d'un ralentissement, voire d'un arrêt de la croissance. Ce type de croissance s'appelle la diauxie.

II.1.6 Conditions de la croissance

Les bactéries ne croissent que si leur environnement est adéquat. Si celui-ci n'est pas optimal, il peut y avoir croissance à plus faible vitesse ou pas de croissance du tout - ou encore les bactéries peuvent mourir, c'est selon les espèces et les conditions.

Les exigences essentielles pour la croissance comprennent (a) une provision de nourriture adéquate ; (b) une source d'énergie ; (c) de l'eau ; (d) une température appropriée ; (e) un pH approprié ; (f) une teneur appropriée en oxygène (parfois l'absence d'oxygène). Évidemment, aucun de ces facteurs n'agit seul : la modification de l'un d'entre eux peut renforcer ou réduire les effets d'un autre. Par exemple, la température la plus élevée à laquelle une bactérie est capable de croître peut fort bien être abaissée si le pH environnant n'est pas optimal.

II.1.6.1 Les substances nutritives

Les substances nutritives servent de matières premières aux cellules pour leur croissance, leur entretien et leur division. Considérées dans leur ensemble, les bactéries utilisent pour se nourrir une vaste gamme de composés. Ceux-ci incluent divers sucres et hydrates de carbone, des acides aminés, des stérols, des alcools, des hydrocarbures, des sels inorganiques et du dioxyde de carbone. Cependant individuellement, aucune bactérie ne peut utiliser tous ces composés, car elle ne dispose pas de toutes les enzymes requises et son enveloppe cellulaire ne contient pas tous les systèmes d'absorption nécessaires. Un type donné de bactérie ne recourt souvent qu'à un éventail alimentaire relativement restreint.

Quel que soit l'organisme, les cellules ont besoin de sources de carbone, d'azote, de phosphore, de soufre et d'autres matériaux dont est faite la matière vivante. Certaines bactéries satisfont tous leurs besoins nutritifs avec de simples sels inorganiques et des substances comme le dioxyde de carbone et l'ammoniaque. D'autres requièrent - à divers degrés - des composés organiques plus ou moins complexes, provenant d'autres organismes.

II.1.6.2 L'eau

L'eau contribue dans une forte proportion à la masse d'une bactérie et, au cours de la croissance, les substances nutritives et les déchets pénètrent et quittent respectivement la cellule, *en solution*. Par conséquent, les bactéries ne peuvent croître que dans ou sur des matières contenant suffisamment d'eau libre (disponible). Dans une matière donnée, toute l'eau n'est pas nécessairement disponible pour la croissance bactérienne ; une partie peut, par exemple, être liée à des gels hydrophiles ou à des ions en solution.

Les différentes espèces de bactéries tolèrent, à divers degrés, un fort déficit en eau (dessiccation). Beaucoup d'espèces, toutefois, ne peuvent survivre longtemps à l'état desséché.

II.1.6.3 La température

Généralement, un type de bactérie donné croît plus rapidement à une certaine température : la *température optimale de croissance*. La vitesse de croissance se réduit lorsque la température s'écarte de cet optimum. Pour toute bactérie, il y a une température maximum et une température minimum au-delà desquelles la croissance s'arrête.

Les bactéries **thermophiles** sont celles dont la température de croissance optimale est $> 45\text{ °C}$. Ces thermophiles se trouvent, par exemple, dans les composts, les sources chaudes et les fontaines hydrothermales des fonds marins. Citons les espèces de *Thermobacteroides* (optimum : $55\text{ à }70\text{ °C}$), et de *Thermomicrobium* (optimum : $70\text{ à }75\text{ °C}$).

Les thermophiles présentent des caractéristiques liées à une adaptation à croître à haute température. Cette adaptation se marque dans la composition de leurs constituants cellulaires (par exemple, les enzymes ou la membrane cytoplasmique) et même, dans certains cas, dans leur type de métabolisme énergétique

Les bactéries **thermotolérantes** peuvent survivre – mais pas nécessairement croître – à des températures qui tueraient normalement la plupart des autres bactéries végétatives (c'est-à-dire en croissance). En bactériologie des produits laitiers, les bactéries « thermotolérantes » sont celles qui survivent à la pasteurisation.

La croissance optimale des bactéries **mésophiles** demande des températures comprises entre $15\text{ et }45\text{ °C}$. Ces mésophiles colonisent une grande variété d'habitats. Les bactéries qui provoquent des maladies chez l'homme et les animaux en font partie.

Les bactéries **psychrophiles** croissent de façon optimale à ou au-dessous de 15 °C , ne croissent pas au-dessus de 20 °C environ et ont une limite inférieure de 0 °C ou moins. Les psychrophiles vivent notamment dans les mers polaires. De $-2\text{ à }-20\text{ °C}$, l'activité bactérienne exige une association avec des particules ou avec des surfaces

Les bactéries **psychrotrophes** peuvent croître à basse température ($0\text{ à }5\text{ °C}$), mais elles se développent le mieux au-dessus de 15 °C avec une limite supérieure $> 20\text{ °C}$.

II.1.6.4 Le pH

Le pH optimum pour la croissance de la plupart des bactéries se situe aux environs de 7 (pH neutre) et la majorité des espèces ne peuvent se développer dans des milieux très acides ou très alcalins. Toutefois, certaines bactéries (hôtes, par exemple, de drainages miniers ou de sources chaudes) non seulement tolèrent, mais « préfèrent » des conditions acides ou fortement acides. Parmi ces organismes **acidophiles**, on peut citer *Thiobacillus thiooxidans* (pH optimum : $2\text{ à }4$). Parmi les Archaea, les espèces du genre *Sulfolobus* croissent à des pH entre 1 et 5, tandis que le pH optimum de *Thermoplasma acidophilum* se situe entre 0,8 et 3.

Les **alcalophiles** croissent de façon optimale dans les milieux alcalins - soit à des pH supérieurs à *Thermomicrobium roseum* (pH optimum : $8,2\text{ à }8,5$) habite les sources chaudes et

Exiguobacterium aurantiacum (pH optimum : 8,5 à 9,5) a été trouvée dans les effluents de traitement de pommes de terre. Les lacs naturels alcalins abritent d'autres alcalophiles.

La croissance des acidophiles et des alcalophiles à pH 7 peut être lente ou nulle.

II.1.6.5 L'oxygène

Certaines bactéries ont besoin d'oxygène pour croître. D'autres ne se développent qu'en absence d'oxygène. D'autres encore peuvent croître que ce gaz soit présent ou non.

Les bactéries qui ne peuvent se passer d'oxygène sont dites **aérobies « strictes »** ou «obligatoires », pour marquer leur dépendance absolue vis-à-vis de ce gaz.

Les **anaérobies stricts** ou obligatoires ne croîtront que si l'oxygène est absent. Ces organismes se trouvent, par exemple, dans la vase des cours d'eau et dans le rumen.

Les bactéries qui croissent normalement en présence d'oxygène mais peuvent quand même se développer en anaérobiose (c'est-à-dire en l'absence d'oxygène) s'appellent les **anaérobies facultatifs**. De la même façon, celles qui croissent normalement en anaérobiose mais peuvent aussi s'accommoder de la présence d'oxygène ont reçu le nom d'**aérobies facultatifs**.

Les bactéries **microaérophiles** ont une croissance optimale à des concentrations en oxygène (habituellement beaucoup) plus basses que celle de l'air (**fig. 2.7**).

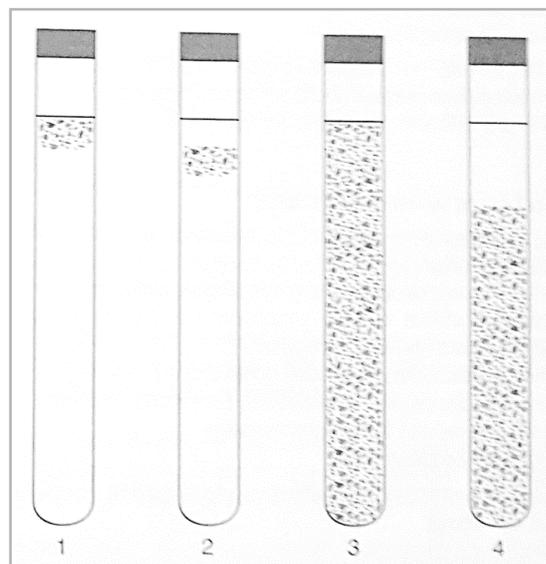


Figure 2.7 : Types respiratoires d'une bactérie (1 : aérobies strictes ; 2 : micro-aérophiles ; 3 : aéro-anaérobies ; 4 : anaérobies strictes).

II.1.6.6 Les ions inorganiques

Toutes les bactéries exigent la présence de certains ions inorganiques à de faibles concentrations, des concentrations plus élevées inhibant généralement la croissance. Ces ions exercent diverses fonctions - par exemple, le **magnésium** dans la membrane externe, le **fer** dans les cytochromes et dans toute une série d'enzymes, le **manganèse** et le **nickel** dans des enzymes ou des systèmes enzymatiques.

Il existe des bactéries (les **halophiles**) - p. ex. l'actinomycète *Actinopolyspora* - qui ne croissent qu'en présence d'une forte concentration en électrolyte (habituellement le NaCl).

Les bactéries **halotolérantes** sont des non-halophiles qui sont capables de croître à des concentrations en électrolyte de 2,5 M environ. C'est le cas de nombreuses souches de *Staphylococcus*.

Les ions inorganiques peuvent aussi jouer un rôle régulateur dans divers domaines de la physiologie bactérienne. Par exemple, les ions Ca^{2+} interviennent ou sont supposés intervenir dans la compétence (transformation), le chimiotactisme et la sporulation chez *B. subtilis*.

II.1.7 Mesure de la croissance bactérienne

II.1.7.1 Mesure directe de la croissance bactérienne

Plusieurs techniques permettent de mesurer directement la croissance d'une population microbienne, c'est-à-dire de voir et de compter les microbes. Ces mesures directes comprennent dénombrement des colonies après culture, le dénombrement de cellules microbiennes et l'estimation du nombre le plus probable (NPP) de bactéries.

- Dénombrement de colonies après culture

La méthode la plus courante pour mesurer une population de bactéries s'appelle **dénombrement de colonies après culture (plate count)**. Cette méthode offre un avantage considérable : elle permet de mesurer le nombre de bactéries viables. Mais elle présente un inconvénient : il faut attendre en générale 24 heures ou plus pour que se forment des colonies visibles. Cette période d'attente pose problème pour certaines applications industrielles, telles que le contrôle de la qualité du lait, parce qu'on ne peut garder un lot donné durant un laps de temps aussi long.

Cette méthode de mesure suppose que, en se développant et en se divisant, chaque bactérie donne naissance à une seule colonie. Or, ce n'est pas toujours le cas puisque les bactéries restent souvent assemblées en chaînettes ou en amas durant leur croissance. Une colonie provient donc non d'une cellule unique, mais d'un petit fragment d'une chaînette ou d'un amas de bactéries. Pour tenir compte de cette réalité, on exprime fréquemment le résultat d'un dénombrement en **unités formant colonies (UFC)**.

Lorsqu'on effectue un dénombrement de colonies, il importe qu'un nombre limité de colonies se développe sur la gélose en boîte de Petri. En générale, on utilise uniquement des géloses contenant entre 25 et 250 colonies. Pour être certain d'obtenir des échantillons de cette taille, on dilue plusieurs fois l'inoculum initial au moyen d'un processus appelé dilution en série (**fig.2.8**).

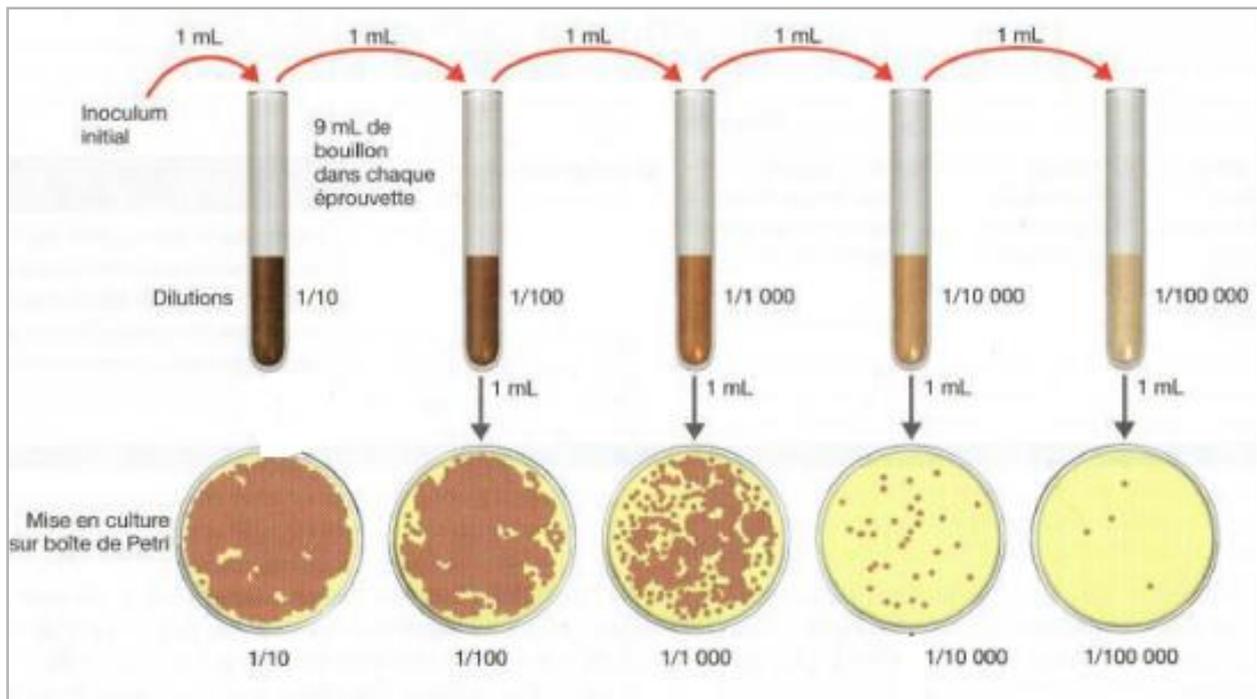


Figure 2.8 : Dénombrement de colonies après culture et dilution en série.

Le dénombrement de colonies après culture sur une gélose en boîte de Petri peut se faire par des techniques d'étalement en surface ou en profondeur. **La technique d'étalement en profondeur** est illustrée dans la figure (2.9 a). On verse 1,0 ou 0,1 mL d'une suspension bactérienne diluée dans le fond d'une boîte de Petri, puis on verse sur l'échantillon bactérien de la gélose liquide. Ainsi, les colonies bactériennes se développent tant à l'intérieur qu'à la surface de la gélose à partir des bactéries en suspension dans le milieu au moment où la gélose s'est solidifiée.

La technique décrite ci-dessus présente des inconvénients. En versant la gélose liquide, on risque d'endommager certains micro-organismes thermosensibles. Par ailleurs, si on utilise certains milieux de culture différentiels, l'aspect distinctif de la colonie à la surface joue un rôle dans l'établissement d'un diagnostic. Pour pallier ces inconvénients, on a souvent recours à la **technique d'étalement en surface** (fig.2.9b). Par exemple, on place 0.1mL d'un échantillon sur la surface d'une gélose, puis on étale uniformément l'inoculum avec une tige en verre stérilisée de forme particulière. Grâce à cette méthode, toutes les colonies se développent sur la surface et les bactéries n'entrent jamais en contact avec la gélose en phase liquide.

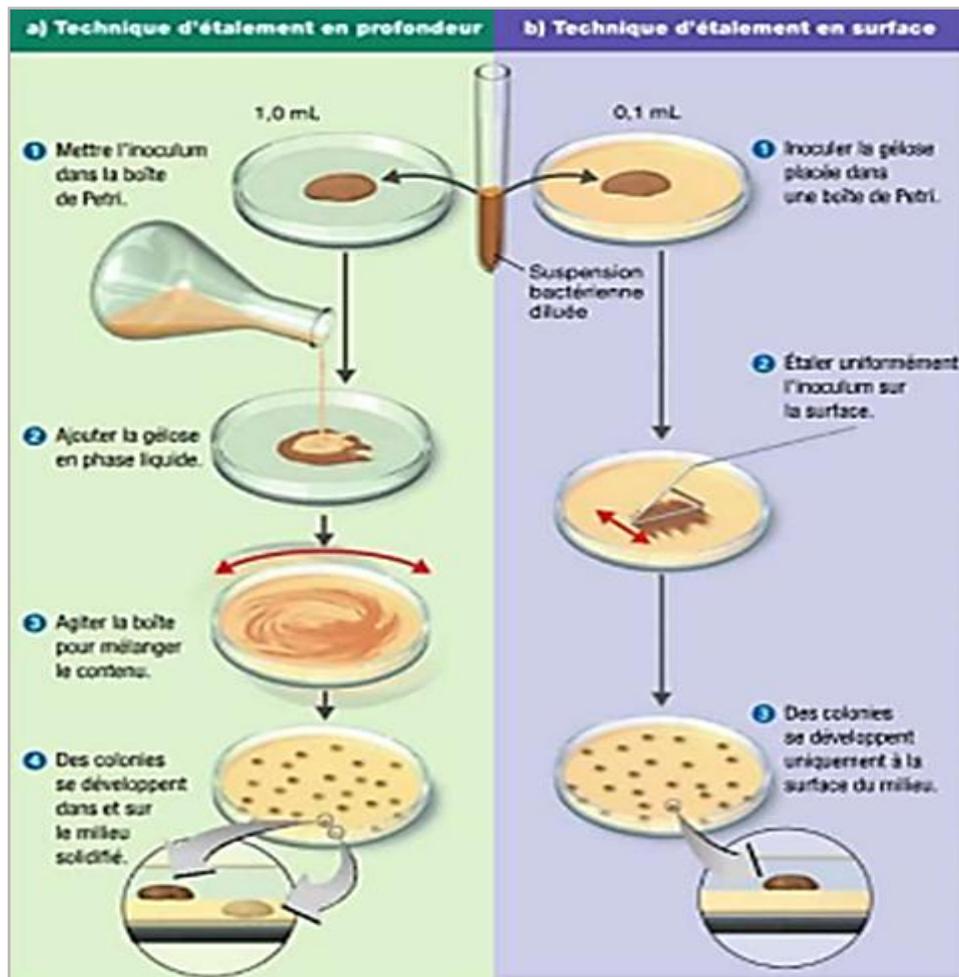


Figure 2.9 : Dénombrement de colonies après culture (a : technique d'étalement en profondeur ; b : technique d'étalement en surface).

Lorsque la teneur en bactéries est très faible dans l'échantillon, comme c'est le cas dans les lacs et les cours d'eau relativement purs, on a recours à une méthode appelée **filtration sur membrane** (fig.2.10) pour dénombrer les colonies. L'une des techniques mises en œuvre consiste à faire passer au moins 100 mL d'eau à travers une membrane filtrante dont les pores sont très petits pour que les bactéries s'y introduisent. Les bactéries ne sont pas filtrées, car elles restent sur la membrane. On place ensuite le filtre dans une boîte de Petri contenant un tampon imprégné de milieu nutritif liquide, ce qui permet aux bactéries sur le filtre de se développer et de former des colonies. On utilise fréquemment cette méthode pour déceler et compter les bactéries coliformes, qui sont les indicateurs de la contamination fécale des aliments ou de l'eau. Elle permet de distinguer les colonies formées par des coliformes si on emploie un milieu de culture différentiel.

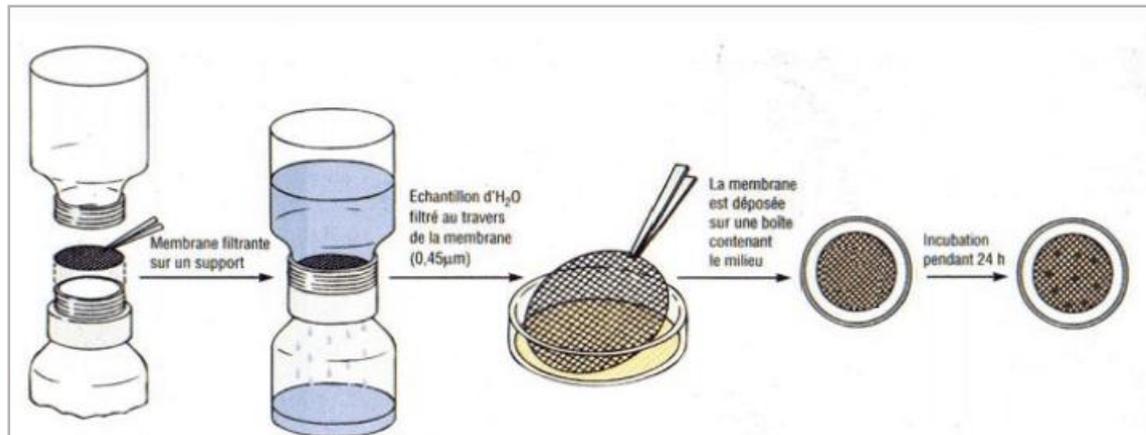


Figure 2.10 : Technique de filtration sur membrane.

- **La méthode du nombre le plus probable**

Il existe une autre technique pour estimer le nombre de bactéries dans un échantillon, soit la **méthode du nombre le plus probable** ou **méthode du NPP** (fig.2.11). Il s'agit d'une technique d'estimation fondée sur le fait que, plus le nombre de bactéries dans un échantillon est grand, plus il faut diluer celui-ci pour que la concentration diminue au point qu'aucune bactérie ne se développe. La méthode du NPP s'avère utile dans le cas où les microbes à dénombrer ne se développent pas sur milieu solide. Cette méthode est utile lors de la vérification de la qualité de l'eau, pour trouver les bactéries coliformes qui fermentent le lactose en acide.

- **Le dénombrement direct de cellules microbiennes**

Le dénombrement direct de cellules microbiennes, ou numération est une méthode qui permet notamment d'évaluer quantitativement de grandes populations microbiennes à partir d'un volume connu d'une suspension de bactéries déposée à l'intérieur d'une région définie sur une lame de microscope.

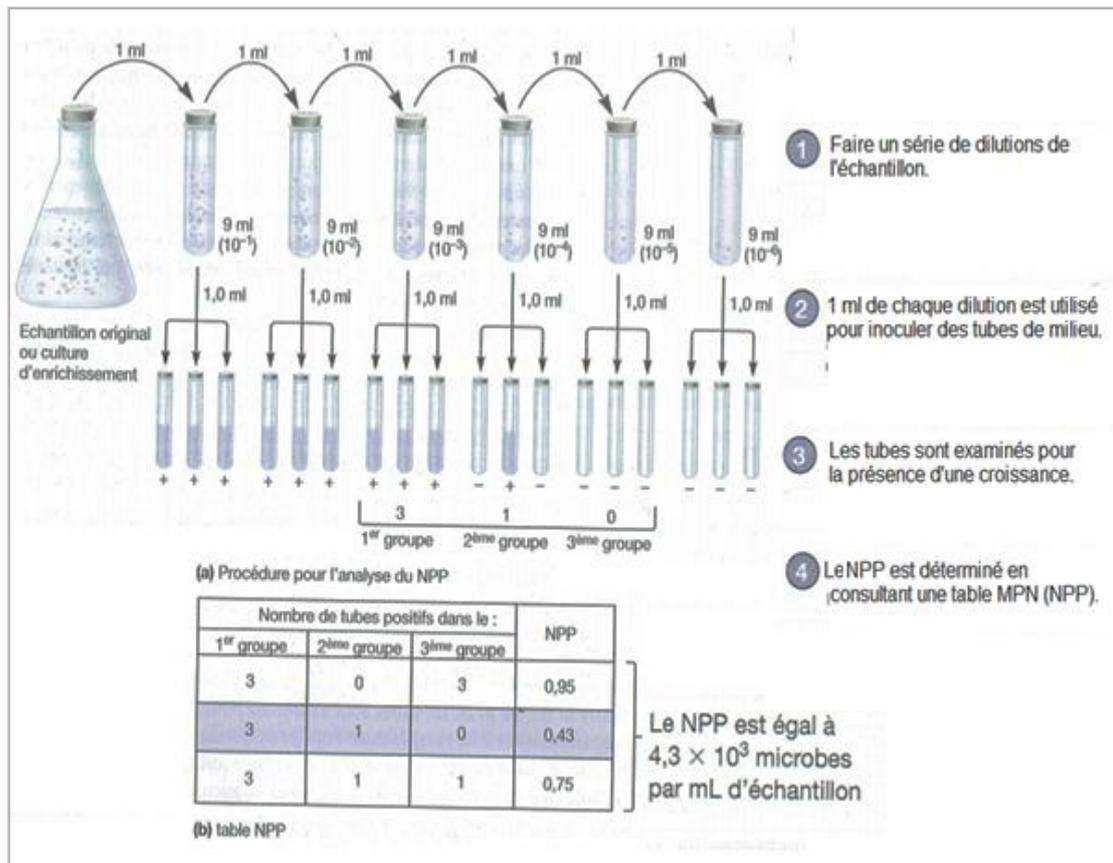


Figure 2.11 : Technique du nombre le plus probable.

On peut aussi utiliser une lame spéciale, appelée chambre de comptage de Petroff-Hausser, pour dénombrer des cellules microbiennes directement au microscope (fig.2.12).

Les méthodes de mesure directe au microscope présentent certains inconvénients. D'une part, il est difficile de dénombrer des bactéries mobiles à l'aide de ces méthodes sans encourir des erreurs de comptage. D'autre part, on ne peut pas procéder au dénombrement des cellules viables, car on risque de compter les cellules mortes aussi bien que les cellules vivantes. Mais les méthodes de mesure par lecture directe présentent l'immense avantage de ne pas exiger de période d'incubation. On applique donc ces méthodes presque uniquement dans le cas où il est prioritaire d'effectuer le comptage en un court laps de temps.

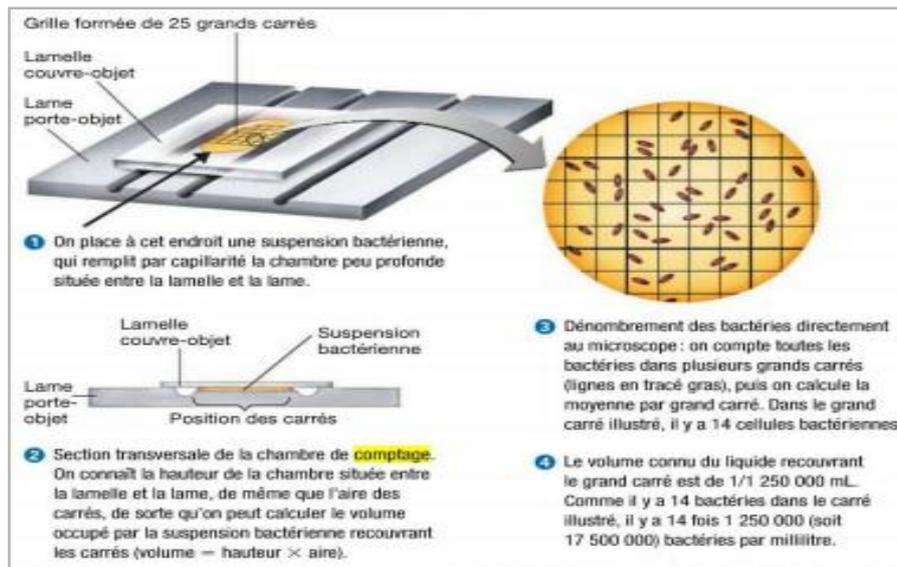


Figure 2.12 : Dénombrement directe des cellules microbiennes à l'aide de la chambre de comptage de Petroff-Hausser.

II.1.7.2 L'estimation du nombre de bactéries par une méthode indirecte

- La mesure de la croissance par turbidimétrie

Dans certains travaux expérimentaux, il est pratique d'utiliser la mesure de la turbidité comme indice de la croissance bactérienne. Au fur et à mesure que des bactéries se multiplient dans un milieu liquide, celui-ci devient de plus en plus opaque, les cellules formant un léger trouble semblable à un nuage.

On mesure l'état du trouble, ou turbidité à l'aide d'un spectrophotomètre dans lequel un faisceau lumineux frappe une suspension bactérienne avant d'être transmis à un détecteur photosensible (fig.2.13). Au fur et à mesure que le nombre de bactéries augmente, la quantité de lumière qui atteint le détecteur photosensible diminue.

La turbidité commence à être observable seulement lorsque le nombre de bactéries par millilitre de liquide dépasse le million. On peut donc par utiliser la turbidité comme mesure de la contamination d'un liquide qui contient un nombre relativement faible de bactéries.

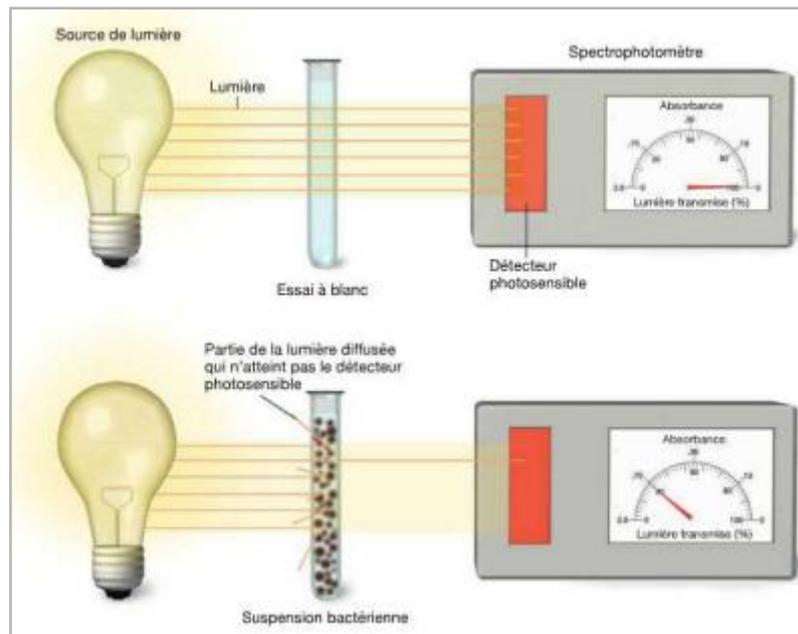


Figure 2.13 : Estimation du nombre de bactéries par turbidimétrie.

- **La mesure de la croissance par la mesure de l'activité métabolique**

On peut aussi calculer indirectement le nombre de bactéries d'une population en mesurant l'activité métabolique de celle-ci. Cette méthode suppose que la quantité d'un produit donné du métabolisme, tel qu'un acide ou le CO_2 est directement proportionnelle au nombre de bactéries présentes. Comme exemple d'application pratique d'une épreuve métabolique, citons le dosage de microbiologie, qui consiste à déterminer la quantité de vitamines à l'aide de la quantité d'acide lactique produite par *lactobacillus*.

- **La détermination de la biomasse sèche**

Cette technique consiste à centrifuger une culture bactérienne sur milieu liquide, la filtrer pour éliminer les substances étrangères, puis à la dessécher et, enfin, à la peser. On évalue ensuite la population en considérant que 1 mg de poids sec correspond à quelques milliards de bactéries. La biomasse sèche totale de la population est souvent directement proportionnelle au nombre de cellules.

II.2 Nutrition bactérienne

Pour survivre et se reproduire les bactéries utilisent une quantité plus ou moins importante de substances minérales et organiques dites substances alimentaires.

Selon leur mode de vie elles ont des exigences nutritives diverses mais toutes doivent trouver dans le milieu où elles vivent :

- Des substances élémentaires nécessaires à l'élaboration de leur structure ;
- Des sources d'énergie indispensables à la réalisation des synthèses de leurs propres constituants ;
- Des substances spécifiques en oligoéléments ou facteurs de croissance.

II.2.1 Besoins énergétiques

Les échanges transmembranaires ainsi que l'utilisation des éléments puisés dans le milieu de culture nécessitent une consommation non négligeable d'énergie. Cette énergie provient du milieu extérieur de la bactérie et est emmagasinée dans des molécules organiques de type ATP, synthétisées par les bactéries.

La source d'énergie utilisée par les bactéries peut être l'énergie lumineuse (bactéries phototrophes) ou l'énergie chimique (bactéries chimiotrophes). Le substrat utilisé comme donneur d'électrons pour le métabolisme énergétique peut être de nature minérale (bactéries lithotrophes) ou organique (bactéries organotrophes).

On distingue ainsi des bactéries photolithotrophes (qui utilisent un substrat minéral comme le H_2S ou l'eau), photo-organotrophes (qui utilisent des substances organiques comme le succinate), chimiolithotrophes (bactéries nitrifiantes, utilisant du NH_3^- ; bactéries utilisant le soufre sous forme de H_2S , S , $S_2O_3^{2-}$; bactéries oxydant le fer ferreux Fe^{2+} , bactéries oxydant l'hydrogène H_2) ou chimio-organotrophes.

II.2.2 Besoins en carbone

Selon la source de carbone utilisée, on distingue deux types de bactéries :

○ Les bactéries **autotrophes** sont capables de réduire le carbone inorganique du CO_2 . Les organismes autotrophes sont à l'origine de l'ensemble de la matière organique et ils se trouvent toujours à la base des chaînes alimentaires. Les plus connues des bactéries autotrophes sont les cyanobactéries ;

○ Les bactéries **hétérotrophes** ont besoin d'une source de carbone organique. L'extraction du carbone à partir de molécules du milieu externe suppose leur dégradation, ce qui constitue le stade le plus rudimentaire de la digestion. La digestion bactérienne est extracellulaire, elle comporte trois phases :

- La sécrétion à l'extérieur de la cellule bactérienne d'enzymes digestives,
- La digestion de la matière organique qui s'y trouve,
- L'absorption des produits de digestion.

Les principales molécules sources de carbone sont les glucides, les acides et alcools organiques. Pour les bactéries hétérotrophes, la présence de CO_2 dans le milieu de culture ne suffit pas à assurer la survie bactérienne, mais lorsque la source spécifique de carbone est présente dans le milieu, une forte concentration de CO_2 peut favoriser la croissance de certaines espèces.

L'utilisation d'une source d'énergie lumineuse ou chimique ne préjuge pas du type de source de carbone. On peut ainsi trouver des bactéries autotrophes chimiotrophes (*Nitrobacter*) ou phototrophes (Cyanobactéries) ou des bactéries hétérotrophes chimiotrophes (*Escherchia coli*) ou phototrophes (bactéries pourpres non sulfureuses).

II.2.3 Besoins en azote

L'azote est surtout nécessaire à la synthèse des protéines et autres substances azotées. Il peut provenir de l'azote moléculaire, atmosphérique, de substances inorganiques azotées (nitrites, nitrates, ammoniac, sels d'ammonium) ou de molécule azotées organiques (acides aminés, protéines).

Les bactéries fixatrices d'azote moléculaire sécrètent de la nitrogénase, enzyme catalysant la fixation de l'azote. Elles appartiennent à deux classes :

- Les *Azotobacter* vivent libres dans le sol et peuvent générer des kystes fixateurs de l'azote atmosphérique, phénomène capital pour la régénération des sols ;
- Les rhizobiacées entretiennent une relation symbiotique avec les légumineuses. L'établissement de cette relation induit l'apparition de nitrogénase.

Les bactéries utilisant **l'ammoniac et les sels d'ammonium** peuvent le faire grâce au glutamate déshydrogénase (capable de transformer l'acide Alpha- céto glutarique en acide glutamique par couplage avec une molécule d'ammoniac) ou au glutamate synthase (GOGAT), capable de transformer l'acide glutamique en glutamine par addition d'une molécule d'ammoniac.

Les bactéries utilisant **les nitrites (NO_2^-) et nitrates (NO_3^-)** le font essentiellement par le biais du nitrate réductase, qui permet d'utiliser ces molécules soit comme source d'azote, soit comme accepteur final d'électrons dans le cadre d'une respiration anaérobie.

Les **acides aminés** sont utilisés comme source d'azote et/ou de radicaux azotés par désamination ou décarboxylation.

Certaines bactéries possèdent des protéases ou des peptidases leur permettant d'utiliser ce substrat organique azoté.

II.2.4 Besoins en eau

Le rôle de l'eau dans le fonctionnement de la cellule bactérienne est fondamental. Cette importance se reflète directement dans la composition cellulaire, dont l'eau représente plus de 80%. La quantité d'eau libre disponible dans un milieu est mesurée par l' A_w (Activité de l'eau). La majorité des bactéries se développent à des A_w supérieures à 0.95. La diminution de ce paramètre peut entraîner des modifications majeures dans le métabolisme bactérien, comme une perte de toxicité (*Staphylococcus aureus*) ou même la mort cellulaire. Peu de germes résistent à des taux bas d'humidité ; c'est notamment le cas de *Listeria monocytogenes*, qui peut se développer à une A_w de 0.83. Seules les spores peuvent survivre à la dessiccation.

II.2.5 Besoin en minéraux

Le **soufre** est l'un des minéraux les plus importantes pour le développement bactérien, aussi bien pour le métabolisme de synthèse qu'en tant qu'accepteur final d'électrons dans le métabolisme énergétique.

Les sources utilisées sont :

- **Minérales** : les sulfates (bactéries sulfatoréductrices), le soufre élémentaire (bactéries sulforéductrices), les thiosulfates (bactéries thiosulfatoréductrices) ou le sulfure (bactéries chimiolithotrophes aérobies)
- **Organique**, par décomposition des protéines soufrées. Dans certains cas, les sources de soufre sont en même temps des facteurs de croissance : méthionine, biotine, cystéine, thiamine.

Le **phosphore** est un autre élément important pour la synthèse des acides nucléiques et pour la production d'ATP. Les bactéries utilisent les phosphates inorganiques comme source de phosphore.

D'autres éléments sont importants pour le métabolisme bactérien : le sodium, le potassium, le chlore... certains sont des cofacteurs enzymatiques comme magnésium, le manganèse, le fer, le zinc, le sélénium, le nickel, le cobalt...

II.2.6 Besoins en facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des substances ou des éléments strictement nécessaires au métabolisme bactérien mais que la bactérie ne peut pas synthétiser-elle-même. Les besoins en facteurs de croissance sont spécifiques pour chaque famille bactérienne, et parfois même pour une souche particulière. Les quantités requises sont généralement très faible, les facteurs de croissance servant principalement de catalyseurs ou de cofacteurs enzymatiques.

Les bactéries capables de se développer en l'absence de facteurs de croissance sont appelées **prototrophes**. Elles ont besoin de milieux de culture simples, contenant une source d'énergie, une source de carbone, d'azote et les principaux minéraux. Celles qui nécessitent au contraire un facteur de croissance dans leurs milieux de culture sont dites **auxotrophes**.

La nature de ces facteurs de croissance est très diverse : bases azotées, acides gras, vitamines, acides aminés, hème ou protoporphyrine (facteurs X), etc. Parfois, ces facteurs de croissance sont produits par d'autres bactéries présentes sur le même substrat. Dans ce cas, la relation qui s'établit entre les deux espèces est appelée **syntrophie** et se traduit par le développement de colonies « satellites » de bactéries auxotrophes autour d'une colonie qui produit le facteur de croissance.

Pour certaines bactéries, la croissance est proportionnelle à la quantité de facteur de croissance présente dans le milieu. Un exemple est la souche d'*Escherichia coli* 113 qui est auxotrophe pour la vitamine B₁₂ et dont la croissance permet de déterminer la quantité de cette vitamine présente dans un milieu.

A l'opposé des facteurs de croissance, certaines molécules ou certains éléments peuvent inhiber la croissance bactérienne : ce sont des antimétabolites, comme l'arsenic, le chrome, le mercure, le plomb, l'or, le radium... Les molécules de cette classe sont souvent des analogues des facteurs de croissance, capables d'entrer en compétition avec ceux-ci, comme par exemple l'acide para-aminobenzoïque (PAB) ou la para-aminobenzène sulfanylamide (PAS).

II.3 Absorption des nutriments

La première étape de l'utilisation des nutriments par la cellule microbienne est l'absorption. Les micro-organismes ne peuvent absorber que des molécules dissoutes. Les mécanismes d'absorption doivent être spécifiques, c'est-à-dire que ne doivent être absorbées que les substances nécessaires.

A cause de l'énorme variété de nutriments et de la complexité de l'absorption ; il n'est pas surprenant que les micro-organismes utilisent plusieurs mécanismes de transport différents. Les bactéries et les archées absorbent les nutriments par diffusion facilitée, transport actif et translocation de groupe.

II.3.1 Diffusion facilitée

La vitesse de diffusion à travers des membranes perméables sélectives augmente fortement grâce à des protéines de transport. Parfois appelées **perméases**, elles sont intégrées dans la membrane cytoplasmique et créent des canaux par lesquels la substance passe. C'est ce qu'on appelle la **diffusion facilitée**. La vitesse de diffusion facilitée augmente beaucoup plus rapidement en fonction du gradient de concentration et à de plus faibles concentrations en substance. Il faut noter que la vitesse de diffusion atteint un plateau au-dessus d'une valeur spécifique du gradient, parce que le transporteur est saturé, c'est-à-dire qu'il transporte autant de molécules qu'il est possible.

Les perméases ressemblent également aux enzymes par leur spécificité pour les substances à transporter. Chaque perméase est sélective et ne véhicule que des solutés apparentés. Certaines perméases sont proches de la famille des protéines intrinsèques majeures (MIP) qui facilitent la diffusion de petites molécules polaires chez presque tous les organismes. Les deux MIP les plus répandues chez les bactéries sont les **aquaporines**, qui transportent l'eau, et les facilitateurs du glycérol qui facilitent la diffusion du glycérol.

Bien qu'un transporteur soit impliqué, la diffusion facilitée est vraiment une diffusion. Un gradient de concentration à travers la membrane entraîne le mouvement des molécules et aucun apport d'énergie métabolique n'est nécessaire. Si le gradient de concentration disparaît, le mouvement des molécules vers l'intérieur de la cellule s'arrête.

S'il y eu de nombreux travaux sur le mécanisme de la diffusion facilitée, il n'est pas encore complètement élucidé. Après avoir fixé une molécule de soluté à l'extérieur de la membrane, on pense que le transporteur change de conformation et libère la molécule à l'intérieur de la cellule (**fig.2.14**). Le transporteur reprendrait alors sa conformation originale et serait prêt à reprendre en charge une autre molécule.

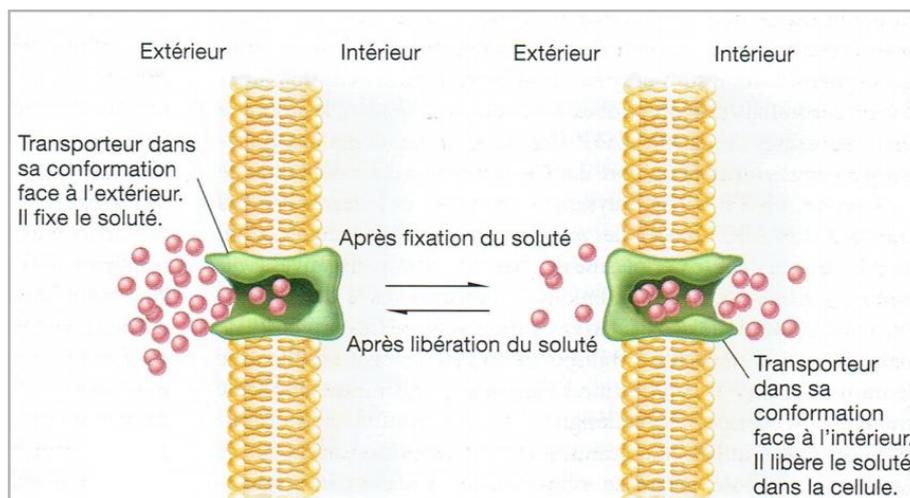


Figure 2.14 : Un modèle de la diffusion facilitée.

II.3.2 Transport actif

La diffusion facilitée ne pouvant déplacer efficacement des molécules vers l'intérieur de la cellule que lorsque leur concentration externe est suffisamment élevée, les micro-organismes doivent posséder des mécanismes de transport capables de fonctionner contre un gradient de concentration. Les micro-organismes utilisent des processus importants dans

ces situations : le transport actif et la translocation de groupe, deux processus consommant de l'énergie. Le transport actif est le transport de molécules solubles vers des concentrations plus élevées (c.-à-d. contre un gradient de concentration) grâce à l'apport d'énergie métabolique. Comme ce transport implique des perméases, il ressemble d'une certaine manière à la diffusion facilitée.

Le transport actif montre également un effet de saturation du transporteur aux concentrations élevées en soluté. Néanmoins le transport actif diffère de la diffusion facilitée parce qu'il utilise l'énergie métabolique et peut concentrer des substances.

On divise les protéines du transport actif en deux types : les transporteurs primaires et les transporteurs secondaires. Les premiers utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour mouvoir des substances contre un gradient de concentration. Les seconds couplent l'énergie potentielle des gradients ioniques au transport des substances.

Les transporteurs ABC (pour ATP binding cassette) sont des transporteurs actifs primaires importants. Certains sont utilisés pour importer des substances et d'autres pour exporter des substances. Ces transporteurs possèdent deux domaines transmembranaires hydrophobes associés du côté cytoplasmique à deux domaines de liaison d'ATP (**fig.2.15**). Les domaines transmembranaires forment un pore dans la membrane et les domaines de liaison fixent l'ATP et l'hydrolysent pour actionner le transport. Les transporteurs ABC utilisent des protéines de liaison particulières, qui sont localisées dans le périplasma des bactéries Gram négatives ou attachées aux lipides de la face externe de la membrane cytoplasmique des bactéries Gram positive. Ces protéines de liaison fixent la molécule à transporter et interagissent ensuite avec le transporteur pour la faire entrer dans la cellule. Comme une seule molécule est transportée, on désigne ce système comme un transport **uniport**. *E. coli* utilise ce mécanisme pour transporter divers sucres (arabinose, maltose, galactose, ribose) et des acides aminés (glutamate, histidine, leucine).

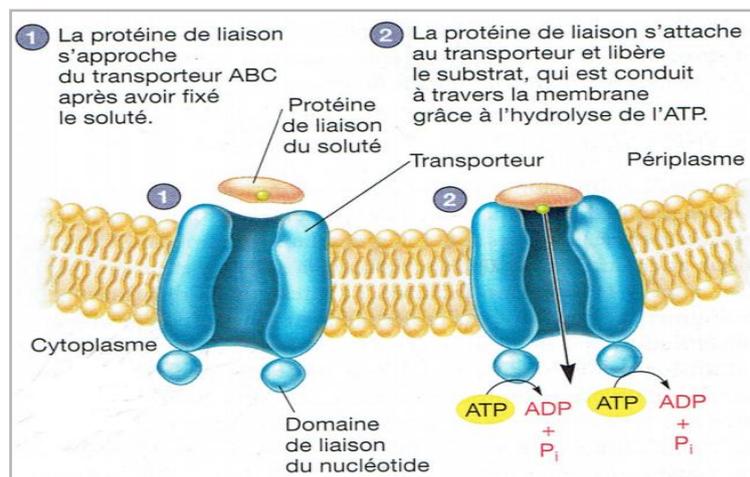


Figure 2.15: La fonction du transporteur ABC.

Les substances, qui pénètrent dans les bactéries Gram négatives, doivent traverser la membrane externe avant d'attendre les transporteurs ABC ou d'autres systèmes de transport actif. Il y a plusieurs moyens pour y parvenir. Si la molécule est petite, elle passe par une porine, comme par exemple la protéine **ompF** (pour « outre membrane protein F »). Le

transport de plus grosses molécules, comme la vitamine B12, fait intervenir des récepteurs spécialisés à haute affinité de la membrane externe qui interagissent avec des transporteurs spécifiques de la membrane cytoplasmique. Parmi les transporteurs actifs secondaires on compte les protéines de la super famille MFS (pour « major facilitator superfamily »).

L'assimilation du lactose par la perméase du lactose d'*E.coli* est un exemple bien connu de transporteur actif secondaire. Cette perméase une seule protéine, transporte une molécule de lactose vers l'intérieur de la cellule en même temps qu'un proton pénètre. Le proton redescend le gradient et l'énergie libérée actionne le transport du soluté. On désigne un transport commun de deux substances différentes dans le même sens comme le **symport** (fig.2.16).

Un système de transport commun de substances, qui se déplacent en sens opposés, est appelé antiport (fig. 2.16). Le gradient de sodium, qui est généré par ce système antiport de protons, actionne l'absorption de glucides et d'acides aminés. On pense qu'un ion sodium se fixe à un transporteur et induit un changement de conformation. Le transporteur fixe le glucide ou l'acide aminé et oriente ses sites de liaison vers l'intérieur de la cellule. Comme la concentration intracellulaire en sodium est faible, l'ion se dissocie du transporteur et l'autre molécule suit.

Les micro-organismes possèdent souvent plus d'un seul système de transport pour un nutriment, comme on le voit chez *E.coli*. Cette bactérie utilise au moins cinq systèmes de transport pour le galactose, trois systèmes pour l'acide glutamique et la leucine et deux systèmes complexes pour le potassium. Lorsqu'il y a plusieurs systèmes de transport pour une même substance, elles diffèrent par leur source d'énergie, leur affinité pour le soluté à transporter et leur mode de régulation. Cette diversité donne au micro-organisme un avantage compétitif supplémentaire dans un environnement qui change.

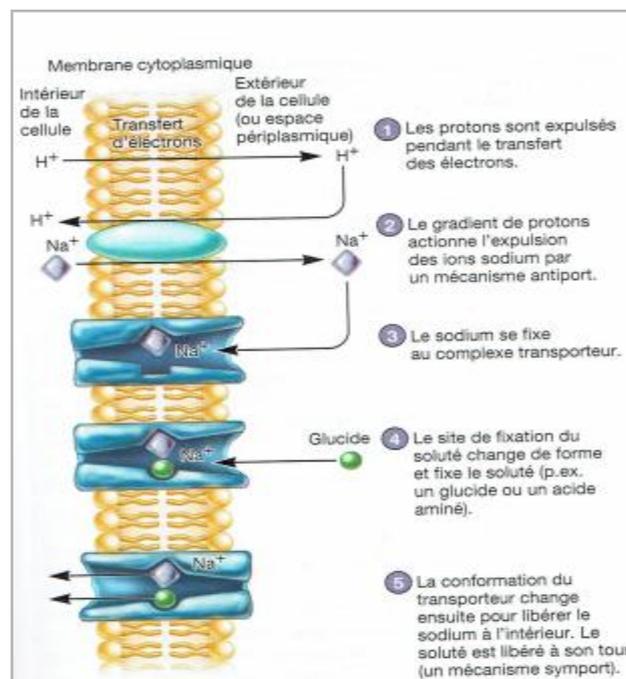


Figure 2.16: Un mécanisme du transport actif utilisant des gradients de protons et de sodium.

II.3.3 Translocation de groupe

Lors de transport actif, les molécules de soluté traversent la membrane sans modification. Un autre type de transport, appelé translocation de groupe, modifie chimiquement la molécule au cours de son transfert dans la cellule. Chez de nombreuses bactéries, le système le mieux connu est le système à phosphotransférase ou **PTS** (pour « phosphoenolpyruvate - dépendant transport system »). Il transfère divers sucres en les phosphorylant et en utilisant le phosphoenolpyruvate (PEP) comme donneur de phosphate.

Les **PTS** sont largement représentés chez les bactéries. La plupart des membres des genres *Escherichia*, *Salmonella* et *Staphylococcus* ainsi que de nombreuses autres bactéries anaérobies facultatives et quelques bactéries anaérobies obligatoires (*Clostridium*). Par contre la majorité des bactéries aérobies n'ont pas de PTS. Ces systèmes transportent de nombreux glucides. *E. coli* absorbe le glucose, le fructose, le mannitol, le saccharose, la N- acétylglucosamine, cellobiose et d'autres glucides par translocation de groupe. En plus du rôle dans le transport, les protéines du PTS peuvent fixer des molécules attractives vers lesquelles les bactéries se déplacent grâce au chimiotactisme.

II.4 Relations entre la cellule bactérienne et d'autres organismes vivants uni-ou pluricellulaires

II.4.1 Aspects trophiques – Modes de nutrition

Certaines bactéries sont capables d'**indépendance** nutritionnelle ; elles sont alors dites « saprophytes ». D'autres **dépendent** du point de vue nutritionnel (trophique) de l'existence d'un autre organisme, ce qui génère des associations dont les plus importantes pour le monde bactérien sont le parasitisme, le commensalisme et la symbiose.

II.4.1.1 Saprophytisme - indépendance trophique

Les micro-organismes saprophytes se nourrissent de matière organique en décomposition. Ils ne dépendent donc pas des autres organismes vivants et participent au recyclage de la matière, notamment par la transformation des restes organiques en matière minérale. Les saprophytes peuvent être autotrophes ou hétérotrophes.

La plupart de ces micro-organismes ne sont pas pathogènes mais certains peuvent le devenir de manière opportuniste, comme par exemple certaines clostridies du tube digestif humain.

II.4.1.2 Relations trophiques associatives entre plusieurs organismes

- Symbiose

La symbiose (ou mutualisme) désigne une relation entre deux organismes d'espèces différentes appelées symbiote et hôte. Ces deux organismes sont indépendants d'un point de vue physiologique mais leur association est obligatoire, forte et spécifique. En général, chacun des deux organismes possède une fonction qui manque à l'autre et qui est l'équivalent d'une fonction physiologique indispensable. La survie des deux organismes est en stricte interdépendance. Ainsi, certaines bactéries fixant l'azote atmosphérique dans le sol se développent en symbiose avec les légumineuses. La relation symbiotique ne nuit à aucun des partenaires, elle est à « avantage réciproque » à la différence du parasitisme.

- Parasitisme

Dans le cadre de ce type d'association, le parasite profite de l'hôte et vit à ses dépens, se nourrissant de sa substance. Cette relation est destructrice (et parfois mortelle) pour l'hôte, bien que ce ne soit pas le but du parasite. La relation qui se crée est de toute évidence à bénéfice unilatéral ; le parasite doit développer toutes les facultés susceptibles de l'aider pour reconnaître l'hôte « idéal » et pour le coloniser, alors que l'hôte potentiel doit développer tout moyen pour se protéger de cette invasion. Parfois la relation parasitaire aboutit à des changements du génome de l'hôte, qui peut inclure des fragments du génome du parasite. Dans la relation organisme humaine/bactéries, on assiste parfois à un parasitisme intracellulaire, la bactérie est phagocytée par une cellule de l'hôte et elle persiste et se développe à l'intérieur de celle-ci. Lorsque le parasite colonise un seul hôte, la relation est **monoxène**. Si plusieurs hôtes intermédiaires sont nécessaires à l'accomplissement d'un cycle de vie du parasite (en plus de l'hôte définitif), la relation est **hétéroxène**.

- Commensalisme

Dans cette relation, proche du parasitisme, le commensal se nourrit à partir des ressources nutritives de l'hôte, ce dernier n'a aucune contrepartie mais la relation est non destructrice pour l'hôte. Les deux organismes sont en relation temporaire et réversible, leurs survies respectives ne sont pas interdépendantes. Ainsi, certaines bactéries vivant à la surface des muqueuses ou de la peau humaine se nourrissent des restes alimentaires ou de la kératine des cellules mortes de la surface de la peau.

Selon l'organisme hôte, les conditions de vie, le nombre et la nature des organismes en présence..., une même espèce peut être saprophyte, commensale ou parasite. Les espèces occupant un même territoire vivent souvent en symbiose entre elles. Lorsque le « territoire » est un organisme vivant (la muqueuse du tube digestif humain par exemple), les relations sont complexes : symbiose entre les espèces bactériennes, commensalisme pour certaines ou symbiose pour d'autres, entre elles ou avec le macro-organisme.

III. Chapitre III : Métabolisme

III.1 Introduction

Tout organisme vivant réalise en permanence de nombreuses réactions chimiques destinées à construire les biomolécules indispensables à la vie, et particulièrement lipides, protéines, acides nucléiques et polysaccharides. Ces réactions ne sont possibles que grâce à l'énergie accumulée à la suite d'autres réactions chimiques. Parmi les organismes vivants, les procaryotes dans leur ensemble utilisent la plus grande diversité de réactions chimiques destinées à produire de l'énergie.

III.2 Rappels et définitions

Chaque cellule est délimitée par une membrane cytoplasmique, qui permet les échanges entre le compartiment intracellulaire et l'environnement. La cellule puise à l'extérieur tous les composés chimiques, les nutriments, indispensables à la synthèse des macromolécules. L'ensemble de ces réactions de biosynthèse constitue l'**anabolisme**. La cellule trouve également à l'extérieur les sources d'énergie (lumière ou composée chimiques) indispensables aux biosynthèses. L'ensemble des réactions permettant la transformation des sources d'énergie en énergie utilisable par la cellule porte le nom de **catabolisme**. L'énergie ainsi obtenue servira à la biosynthèse, mais aussi au transport des nutriments, à la mobilité cellulaire et à l'élimination des déchets et des produits indésirables de ces diverses réactions. Au total, anabolisme et catabolisme constituent le **métabolisme** cellulaire (**fig.3.1**).

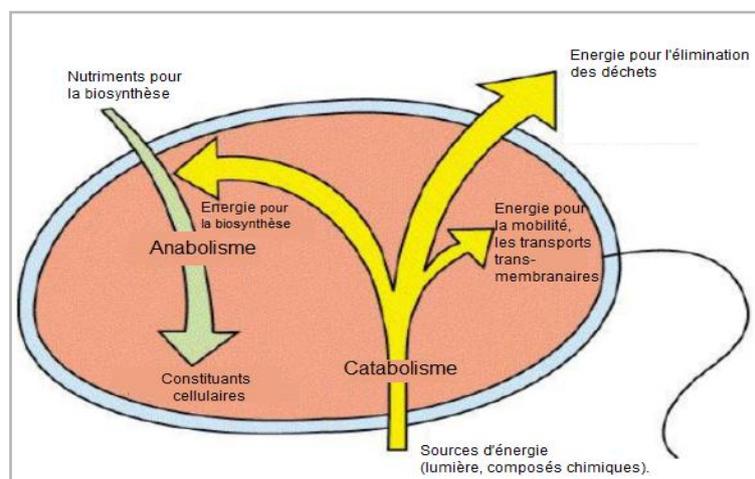


Figure 3.1 : Le métabolisme cellulaire.

III.3 Métabolisme énergétique

La production métabolique d'énergie fait intervenir des réactions d'oxydoréduction entre donneurs et accepteurs d'électrons. Trois principaux types trophiques sont associés à cette production d'énergie. Si la source d'énergie est une molécule organique réduite dont l'oxydation libère des électrons qui seront donnés à un accepteur (organique ou inorganique), on parle alors de **chimio-organotrophie** ; les micro-organismes chimio-organotrophes produisent l'énergie, soit par respiration (aérobie ou anaérobie), soit par fermentation. Si la source d'énergie est un substrat inorganique réduit dont l'oxydation fournit des électrons qui seront donnés à un accepteur terminal, on parle de chimio-lithotrophie ; les chimio-lithotrophes fabriquent de l'énergie par respiration (aérobie ou anaérobie). L'énergie peut provenir de la lumière. Dans ce cas, il s'agit de phototrophie,

processus au cours duquel un flux d'électrons est généré par l'absorption de photons par des photorécepteurs. En général, une même molécule réduite, organique ou inorganique, va être utilisée comme source d'énergie et d'électrons ; cela présente l'avantage de simplifier l'approvisionnement en molécules alimentaires. Ainsi, les hétérotrophes peuvent utiliser le même substrat organique réduit comme source d'énergie, d'électrons et de carbone ; l'organisme est alors chimio-organo-hétérotrophe. On peut donc définir cinq principaux types trophiques selon les sources d'énergie, d'électrons et de carbone utilisées; les hétérotrophes chimio-organotrophes (chimio-organo-hétérotrophe), les hétérotrophes chimio-lithotrophes (chimio-litho- hétérotrophes), les hétérotrophes photo-organotrophes (photo-organo-hétérotrophes), les autotrophes chimio-lithotrophes (chimio-litho-autotrophes), les autotrophes photo-lithotrophes (photo-litho-autotrophes).

III.3.1 Métabolisme chimio-organotrophe

Les organismes chimio-organotrophes emploient des molécules organiques comme donneurs d'électrons. Cette propriété est largement répandue dans le monde vivant et ne concerne pas uniquement les procaryotes. Cependant, ces derniers dans leur ensemble peuvent utiliser toutes les molécules organiques naturelles, et même certains résultants de l'activité humaine. Ils se distinguent aussi par la diversité des accepteurs d'électrons qu'ils peuvent employer. Le donneur d'électron étant organique, tous les chimio-organotrophes sont également hétérotrophes.

III.3.1.1 Respirations aérobies et anaérobies

En présence d'un donneur d'électron organique et d'oxygène moléculaire, les chimio-organotrophes réalisent la respiration aérobie de molécules organiques, métabolisme très répandu dans la nature. Il n'est pas possible de citer tous les donneurs d'électrons susceptibles d'être utilisés, mais on les trouve parmi les carbohydrates (pentoses, hexoses, polysaccharides), les acides aminés et protéines, les acides organiques, les lipides, les hydrocarbures, et des molécules beaucoup plus complexes. En l'absence d'oxygène, bon nombre de ces donneurs d'électrons seront oxydés par des accepteurs d'électrons inorganiques et organiques. Dans tous les cas, le transfert des électrons du donneur vers l'accepteur terminal au sein de la membrane cytoplasmique s'accompagne d'une translocation de protons. Il s'ensuit l'établissement d'un gradient de protons, formant une force proton-motrice utilisée par les ATPases pour la synthèse d'ATP.

III.3.1.2 Fermentations et syntrophie

Les fermentations constituent une forme particulière de métabolisme énergétique. Il s'agit d'un métabolisme anaérobie, nécessitant un donneur d'électrons organique. Aucun accepteur d'électron externe n'est nécessaire. Le donneur libère ses électrons et produit un composé intermédiaire. Ce composé intermédiaire reçoit un phosphate inorganique. Dans l'étape suivante, ce phosphate est libéré et s'associe à de L'ADP pour former de l'ATP. Ce processus se nomme phosphorylation au niveau du substrat. Les électrons venant du donneur sont transportés vers une molécule oxydée intermédiaire résultant de la dégradation du substrat initial (**fig.3.2**). Il s'ensuit une réduction de ce composé en plusieurs composés nommés produits de fermentation.

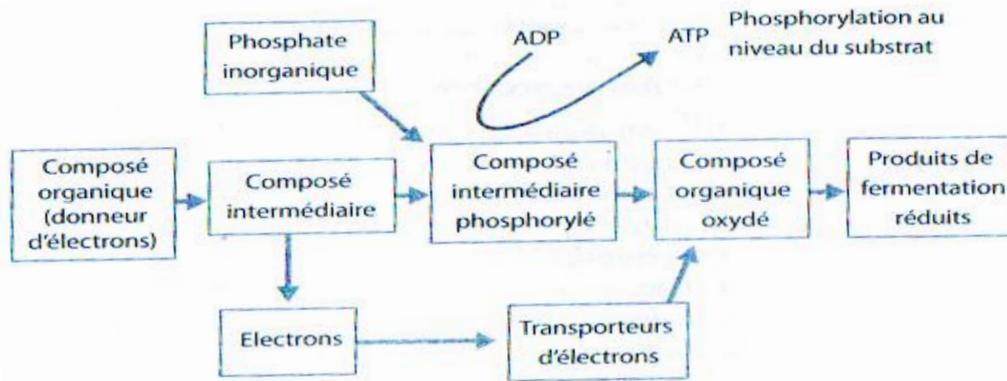


Figure 3.2 : Principe des fermentations.

Selon la molécule initiale, et selon le type de fermentation, ces produits de fermentation varient en qualité et en proportion. Les sucres sont très souvent fermentés, mais il existe des fermentations d'acides aminés, d'acétylène, de glycérol, etc. Les fermentations sont le plus souvent nommées par référence aux produits de la fermentation. Ainsi, la fermentation alcoolique produit de l'éthanol. Dans les figures (3.3 a et b), sont présentées deux fermentations classiques chez les bactéries : la fermentation dite des acides mixtes et la fermentation du butanediol. Certains produits sont communs aux deux types de fermentation (H_2 , CO_2 , lactate, acétate, éthanol), mais le butanediol est caractéristique de la fermentation qui porte son nom.

La réaction entre composés chimiques peut être exergonique, et donc susceptible d'être utilisée par les organismes possédant les enzymes adéquates, pour l'obtention d'énergie. Au contraire, une réaction endergonique, consommatrice d'énergie, n'est *a priori* pas utilisable dans le métabolisme énergétique. C'est pourtant le cas lors de réactions particulières, dénommées réactions syntrophiques. La quantité d'énergie libre libérée (ou consommée) par une réaction chimique est toujours calculée pour des conditions standard (réactifs et produits de la réaction ont une concentration de 1M). Il suffit que la concentration de l'un des composés concernés ait une concentration différente de 1M pour que le résultat du calcul soit modifié. Dans le cas de la syntrophie, deux organismes s'associent pour dégrader une substance que ni l'un ni l'autre ne pourrait dégrader seul. Le plus souvent, la production d' H_2 par l'un des organismes est liée à la consommation d' H_2 par l'autre, et l'on parle de transfert interspécifique d' H_2 . Ainsi, l'oxydation du butyrate en acétate est une réaction endergonique ($\Delta G_{O'} = + 48.2$ KJ). Pourtant, la bactérie syntrophique, *Syntrophomonas*, peut utiliser le butyrate si elle est associée à un partenaire (par exemple un méthanogène) qui consomme l' H_2 produit dans la réaction. Avec une très faible concentration d' H_2 , la réaction d'oxydation du butyrate devient légèrement exergonique (- 18KJ).

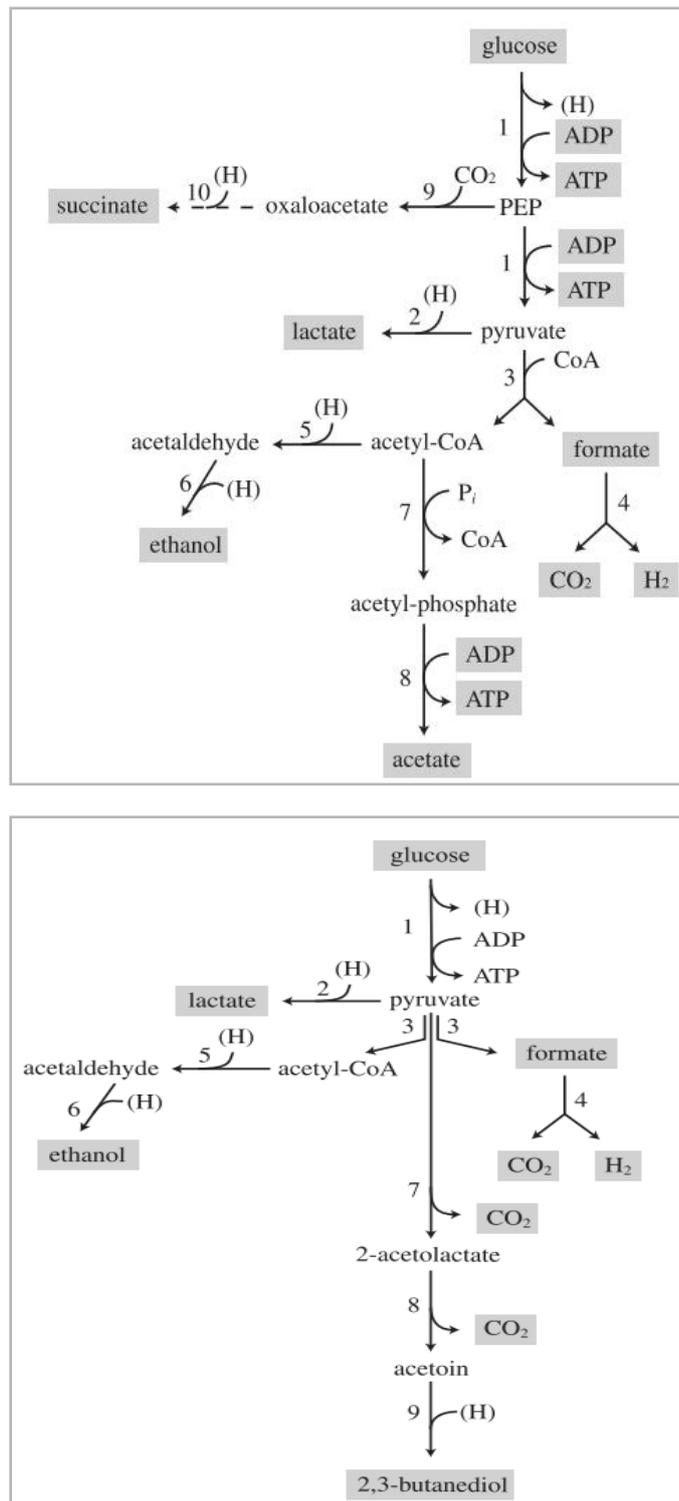


Figure 3.3 : Exemples de fermentations : acides mixtes (a), butanediol (b). Les composés encadrés sont les produits de fermentations.

III.3.2 Métabolismes chimio-lithotrophes

En l'absence de lumière, les organismes vivants utilisent des réactions chimiques pour l'obtention d'énergie. Les chimio-lithotrophes se distinguent par l'utilisation de donneurs d'électrons inorganiques, dont les principaux seront présentés ci-dessous. Les électrons sont

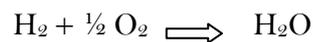
transférés vers l'accepteur d'électrons par des transporteurs membranaires. Il s'ensuit une translocation de protons, l'établissement d'un gradient de protons et d'une force proton-motrice utilisée par des ATPases pour la synthèse d'ATP. Ce processus de synthèse d'ATP se nomme **phosphorylation oxydative**.

III.3.2.1 Respiration aérobies

Une réaction d'oxydo-réduction nécessite un donneur d'électrons, mais également un accepteur. Dans tous les cas où l'accepteur d'électrons est l'oxygène moléculaire (O_2), les processus portent le nom de respiration aérobie (quel que soit la nature du donneur). Voici quelques exemples de respiration aérobie de molécules inorganiques.

○ Oxydation de l'hydrogène

L'hydrogène moléculaire (H_2) est un produit commun du métabolisme, ainsi qu'une bonne source d'énergie fréquemment utilisée par de nombreux micro-organismes, communément nommées hydrogénobactéries. Pour beaucoup d'entre elles, il s'agit d'un métabolisme facultatif car elles peuvent aussi fonctionner en chimio-organotrophie, ou utiliser d'autres accepteurs d'électrons que l'oxygène. L'équation de la respiration aérobie de l'oxygène s'écrit :



La réaction est très exergonique et l'énergie libre en condition standard est de -270 kJ. L'énergie obtenue et conservée sous forme d'ATP est utilisée pour la fixation autotrophe du CO_2 via le cycle de Calvin (fig. 3.4).

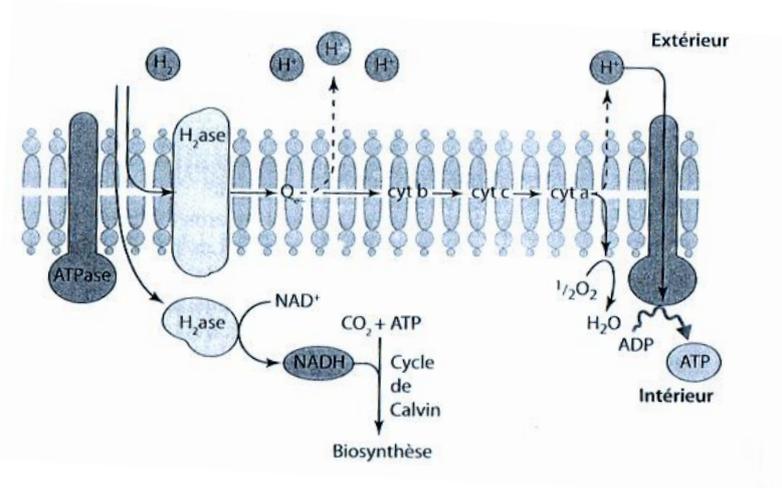


Figure 3.4 : Oxydation de l'hydrogène.

○ Oxydation du fer

L'oxydation du Fe^{++} en Fe^{+++} en présence d'oxygène est une réaction productrice d'énergie pour quelques bactéries nommées ferro-bactéries. A pH neutre, Fe^{++} s'oxyde rapidement sans intervention biologique. Il n'est stable en conditions aérobie que pour des pH acides, et beaucoup de ferro-bactéries sont donc acidophiles. La réaction s'écrit :



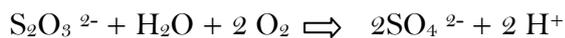
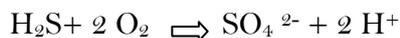
La quantité d'énergie produite n'est que -32.9 KJ , à $\text{pH} = 2$. Les ferro-bactéries n'obtenant que peu d'énergie de l'oxydation de Fe^{++} , elles ne produisent que peu de biomasse. Par contre, elles transforment de très grandes quantités de Fe^{++} en Fe^{+++} , qui s'accumulent dans l'environnement sous forme d'hydroxyde ferrique ($\text{Fe}(\text{OH}_3)$) insoluble.

En milieu oxygéné et à pH neutre, Fe^{++} est néanmoins stable à l'interface aérobie/anaérobie. Des bactéries comme *Galionella* vivent de la respiration aérobie du fer dans ces interfaces, mélangées avec les dépôts formés.

Le manganèse, chimiquement proche du fer, peut aussi être oxydé par des bactéries hétérotrophes, mais on ne sait pas si ces oxydations sont productrices d'énergie.

○ Oxydation du soufre

De nombreux composés soufrés réduits peuvent être utilisés comme donneurs d'électrons par des bactéries très variées, et non photosynthétiques, dites sulfo-oxydantes. Les composés soufrés les plus utilisés sont l'hydrogène sulfuré (H_2S), le soufre élémentaire (S^0), et le thiosulfate ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$). Les réactions d'oxydation s'écrivent:



Ces réactions sont très exergoniques avec des changements d'énergie libre de respectivement -798 , -587 -822 kJ . Les produits de ces réactions sont dans tous les cas des protons H^+ , et des ions sulfates, soit de l'acide sulfurique. Ces bactéries sont en très grande majorité acidophiles. Certaines peuvent vivre à des pH inférieurs à 1. L'oxydation des composés soufrés se produit par étapes. Dans le cas de l'hydrogène sulfuré, la première étape conduit à du soufre élémentaire qui peut être accumulé à l'intérieur de la cellule, puis être oxydé à son tour. Les bactéries sulfo-oxydantes sont en majorité autotrophes et utilisent l'énergie obtenue de l'oxydation des composés soufrés pour la fixation du CO_2 selon le cycle du Calvin. Certaines vont néanmoins utiliser du carbone organique comme source de carbone, s'il en est disponible dans l'environnement. Ces organismes chimiolithotrophes et hétérotrophes, portent souvent le nom de mixotrophes.

○ Oxydation de l'azote

Les composés azotés inorganiques, les plus souvent utilisés comme donneur d'électrons, sont l'ammoniac (NH_3) et le nitrite (NO_2^-). Les bactéries réalisant ces oxydations sont nommées nitrifiantes. On les distingue en fait en deux catégories. La première, les bactéries nitrosantes, réalise exclusivement l'oxydation de l'ammoniac en nitrite. La seconde catégorie, les bactéries nitratantes, oxyde les nitrites en nitrate. Ces deux réactions successives constituent la nitrification. Les réactions de ces réactions s'écrivent :



Les changements d'énergie libre sont respectivement de -287 kJ et -74 kJ. Cette énergie sert à la fixation autotrophe du CO_2 selon le cycle de Calvin.

- **Oxydation des composés en C¹**

Les composés en C¹ sont des molécules contenant un seul atome de carbone. Les plus simples sont le méthane (CH_4), le méthanol (CH_3OH) ou le formaldéhyde (HCHO). Le produit final de l'oxydation de ces composés est le CO_2 . On distingue, chez ces organismes oxydant les composés en C¹ : les méthanotrophes qui oxydent le méthane et d'autres molécules en C¹, ainsi que les méthylotrophes qui n'oxydent pas le méthane, mais diverses composées en C¹ et des molécules organiques plus complexes comportant plus de 1 atome de carbone.

Il convient de placer dans cette catégorie de micro-organismes les bactéries carboxydrotrophes, qui oxydent le monoxyde de carbone CO .

III.3.2.2 Respiration anaérobies

L'oxygène n'est pas toujours disponible dans l'environnement des micro-organismes. C'est en particulier le cas des boues, des sédiments profonds, ou des tractus digestifs. Ce n'est pas un handicap pour de nombreux micro-organismes, adaptés aux conditions anaérobies et qui ont la faculté d'utiliser de nombreux autres accepteurs d'électrons, inorganiques et organiques. Ce paragraphe présente les principaux accepteurs d'électrons utilisés en anaérobiose. Pour chacun de ces accepteurs sont très variées (inorganiques et organiques). Lorsque le donneur d'électrons est une molécule organique, il sert également de sources de carbone. L'utilisation d'un donneur d'électron inorganique comme l'hydrogène (H_2) implique la fixation autotrophe du CO_2 .

- **Métabolismes assimilatif et dissimilatif**

Les composés inorganiques comme les ions nitrate et sulfate, ou le dioxyde de carbone, sont utilisés par de nombreux micro-organismes comme accepteurs d'électrons. Ils constituent également des sources d'azote, de soufre ou de carbone dont les cellules ont besoin pour synthétiser leurs constituants. NO_3^- , SO_4^{2-} et CO_2 sont composés oxydés qui vont être réduits pour être incorporés dans diverses molécules au cours d'un processus dénommé métabolisme assimilatif. Lorsque ces mêmes composés (nitrate, sulfate, etc.) sont réduits au cours d'une respiration anaérobie, on parle de métabolisme dissimilatif. Dans ce cas, le produit réduit n'est pas conservé dans la cellule, mais excrété dans l'environnement.

- **Respiration du nitrate**

Les composés azotés inorganiques sont parmi les accepteurs d'électrons les plus communs de la respiration anaérobie. Le plus commun est l'ion nitrate NO_3^- . Sa réduction se fait en plusieurs étapes qui conduisent successivement à NO_2^- , N_2O , NO et N_2 . Les trois derniers composés sont des gaz, qui s'échappent de l'écosystème où ils ont été produits (sol, sédiment) vers l'atmosphère, d'où le nom de dénitrification donné à ce processus. Une autre voie, minoritaire, de la réduction du nitrate conduit à NH_3 , comme produit final.

N_2 , étape finale de la voie principale, est une forme très stable de l'azote. La réintégration de l'azote atmosphérique dans les écosystèmes se fait via un processus nommé fixation de

l'azote, qui produit de l'ammonium, utilisable par les organismes. D'assez nombreux procaryotes effectuent cette fixation d'azote, qui est un processus consommant de l'énergie.

Les donneurs d'électrons impliqués dans la réduction du nitrate peuvent être organiques, mais aussi inorganiques (H_2 , H_2S).

L'ion nitrite, première étape dans la réduction du nitrate peut servir d'accepteur d'électrons dans un processus dénommé « anammox » ou oxydation anaérobie de l'ammonium, qui produit de l'azote moléculaire (N_2). L'équation de cette réaction s'écrit :



○ Respiration du sulfate et du soufre

L'ion sulfate, forme la plus oxydée du soufre, est particulièrement abondant dans l'eau de mer. Il est très utilisé par les bactéries sulfato-réductrices (BSR). Le produit final de la réduction des sulfates est l'hydrogène sulfuré. De nombreux organismes (plantes, algues, champignons) et la plupart réalisent la réduction assimilative des sulfates leur biosynthèse. La réduction dissimilative, productrice d'énergie, est le fait des seules BSR. Elles peuvent utiliser plusieurs donneurs particulièrement l'hydrogène, le lactate et le pyruvate, mais aussi l'acétate, le fumarate, le benzoate, etc.

Le soufre élémentaire (S^0) peut également être réduit en sulfures par des bactéries sulfo-réductrice. Cette réduction peut se faire en présence de donneurs d'électrons organiques et inorganiques comme H_2 . D'autres molécules soufrées aux niveaux d'oxydations intermédiaires comme le thiosulfate, les sulfites ou le diméthyl-sulfoxyde, sont également employées comme accepteurs d'électrons.

Certaines BSR sont capables d'une forme particulière de métabolisme énergétique nommé dismutation. Le soufre élémentaire et d'autres composés soufrés de niveau d'oxydation intermédiaire peuvent être ainsi utilisés. La dismutation se traduit par la production de deux autres molécules soufrées, dont l'une est plus oxydée et l'autre plus réduite que la molécule initiale. Dans le cas du thiosulfate, un atome de S est oxydé en sulfate, l'autre réduit en H_2S . L'équation de la réaction s'écrit :



○ Respiration du fer

De nombreux micro-organismes peuvent réduire Fe^{+++} en Fe^{++} . Ce processus métabolique est présent chez certains champignons et de nombreux procaryotes chimio-organotrophes et chimio-lithotrophes. De nombreux donneurs d'électrons organiques et inorganiques peuvent être employés. Lorsque l'acétate est le donneur d'électrons, la réaction s'écrit :



Le manganèse (Mn^{4+}) peut également être réduit par de nombreux micro-organismes en Mn^{2+} .

○ Autres accepteurs d'électrons

Au-delà des exemples précédents, de nombreux accepteurs d'électrons inorganiques permettent une respiration anaérobie. Certains sont assez inattendus, comme le sélénium (SeO_4^{2-}) réduit en sélénite (SeO_3^{2-}), l'arsenate réduit en arsénite, ou le chlorate réduit en chlorite. Les accepteurs d'électrons organiques sont également très nombreux. Ainsi, le fumarate peut être réduit en succinate.

Le dioxyde de carbone (CO_2) est un composé très répandu dans la nature et c'est le produit majeur du métabolisme énergétique des chimio-organotrophes, résultat de l'oxydation des molécules carbonées. C'est également la principale source de carbone des organismes autotrophes, et en particulier des plantes. Enfin pour certains procaryotes, il joue le rôle d'accepteur d'électrons : les *Bacteria* homoacétogènes réduisent le CO_2 et produisent de l'acétate, et les *Archaea* méthanogènes réduisent le CO_2 et produisent du méthane (fig.3.5).

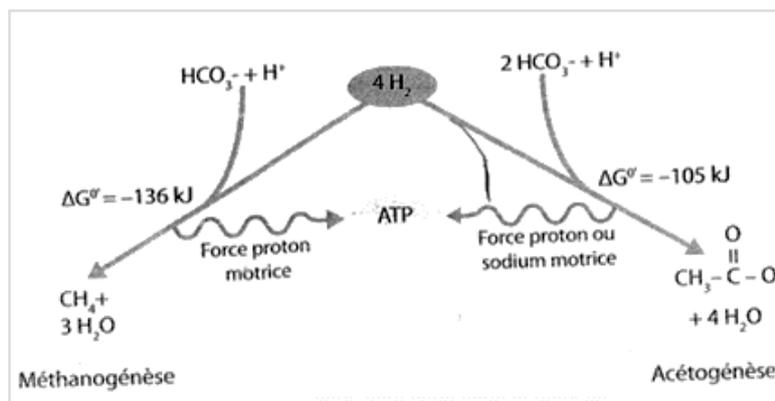


Figure 3.5 : Acétogénèse et méthanogénèse.

- Les acétogènes

Au cours de la fermentation des sucres, l'acétate est souvent formé en même temps que le CO_2 et d'autres molécules. Dans le cas de la réduction du CO_2 , l'acétate est le produit unique de la réaction, d'où le nom d'homoacétogénèse. Les homoacétogènes appartiennent à plusieurs lignées du domaine des *Bacteria* : il s'agit d'anaérobies obligatoires. Les électrons nécessaires à la réduction du CO_2 proviennent de l'hydrogène (H_2), mais aussi de nombreux composés en C^1 , de sucres, d'alcools, d'acides organiques ou d'acides aminés. Dans le cas des acétogènes autotrophes, le CO_2 sert également de source de carbone. Il est converti en acétate par la voie de l'acétyl-co-enzyme A (fig.3.6).

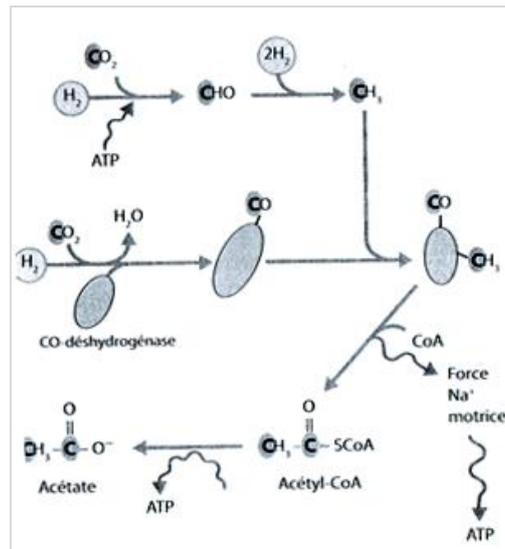


Figure 3.6 : Réactions de la voie de l'acétyl CoA.

- Les méthanogènes

Les méthanogènes appartiennent au domaine des *Archaea*. La réduction du CO_2 par des électrons venant de l'hydrogène (H_2) peut être considérée comme une respiration anaérobie, bien que le système de transport d'électron soit particulier. Outre le CO_2 , les méthanogènes peuvent utiliser d'autres substrats que l'on peut regrouper en trois classes. Les substrats de type CO_2 : CO , HCOO^- ; les substrats de type méthyle : méthanol (CH_3OH), méthanolamine ($\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$), et les substrats de type acétate (CH_3COOH).

III.3.3 Métabolismes phototrophes

De nombreux organismes vivants utilisent la lumière comme source d'énergie primaire : ce sont les phototrophes. Il s'agit bien sûr des plantes et des algues, mais aussi de certains micro-organismes de plusieurs groupes de procaryotes. Tous ces organismes ont en commun de posséder des pigments qui captent la lumière à des longueurs d'onde précises, le plus connu étant la chlorophylle. Le processus essentiel au cours duquel l'énergie lumineuse est convertie en énergie chimique se nomme la photosynthèse. On distingue deux catégories de phototrophes, selon la nature de carbone transformé en biomolécules grâce à l'énergie ainsi obtenue. Les photohétérotrophes utilisent de la manière organique, tandis que les photoautotrophes, utilisent cette énergie pour fixer le CO_2 . La fixation du CO_2 implique sa réduction, et donc l'intervention d'un pouvoir réducteur. Ce pouvoir réducteur provient soit de donneurs d'électrons présents dans l'environnement (photosynthèse anoxygénique), soit de la photolyse de l'eau (photosynthèse oxygénique).

La photosynthèse n'est pas connue chez les *Archaea*, mais certaines d'entre elles (halophiles extrêmes) peuvent aussi utiliser l'énergie lumineuse au cours d'un processus particulier.

III.3.3.1 Photosynthèse oxygénique

La photosynthèse oxygénique (fig.3.7), est réalisée par les plantes, les algues et une lignée particulière des *Bacteria*, les cyanobactéries. Le pigment principal est la chlorophylle a, molécule de type porphyrine (comme les cytochromes), mais possédant au centre un atome

de magnésium au lieu d'un atome de fer. La chlorophylle possède une chaîne alcool hydrophobe, permettant son association avec les lipides et les protéines des membranes photosynthétiques. Les molécules de chlorophylles en structures particulières nommées antennes, dont le rôle est d'absorber la lumière d'une longueur d'onde très précise : 430 et 680 nm pour la chlorophylle a.

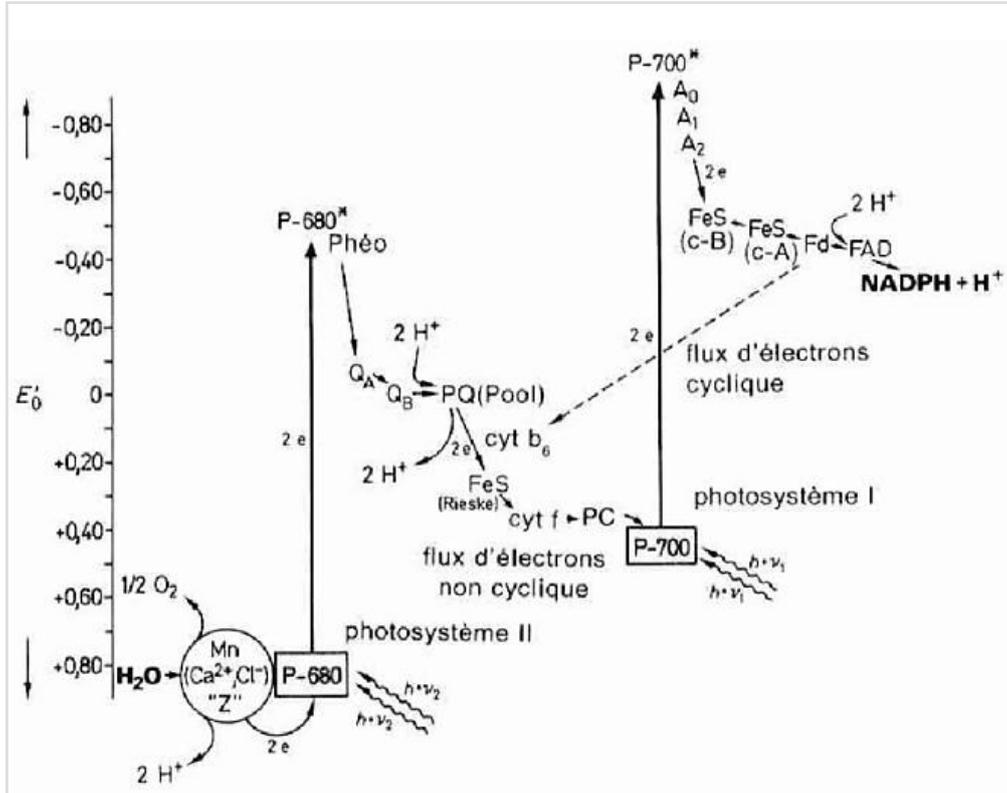


Figure 3.7 : Photosynthèse oxygénique.

Deux photosystèmes fonctionnent en interconnexion (fig.3.7). Dans le photosystème I, une chlorophylle particulière (P700) possède au repos un potentiel de réduction très positif (état oxydé). Sous l'excitation de la lumière, P700 devient très négatif, libère un électron qui chemine jusqu'à une molécule de ferrédoxine, puis via plusieurs transporteurs d'électrons jusqu'à la forme d'oxydée P700. Au cours de ce cycle, de l'ATP est synthétisé par un processus nommé phosphorylation cyclique.

A partir de la ferrédoxine, les électrons peuvent aussi réduire NADP⁺ en NADPH. Le photosystème II intervient en apportant les électrons nécessaires au P700 oxydé. De l'ATP est synthétisé également au cours d'une phosphorylation non cyclique. Le photosystème II possède une chlorophylle P680, qui acquiert un potentiel négatif sous l'action de la lumière provoquant une photolyse d'eau (H₂O). Il en résulte la libération d'électrons qui réduisent la P680, et d'oxygène moléculaire, d'où le nom de ce processus. C'est par ce processus que la Terre s'est progressivement oxygénée au cours de son histoire.

III.3.3.2 Photosynthèse anoxygénique

La photosynthèse anoxygénique est réalisée exclusivement par plusieurs lignées de *Bacteria* : les bactéries vertes, les bactéries pourpres et certaines bactéries Gram⁺, les Héliobactéries. Le pigment le plus répandu est la bactériochlorophylle a, qui absorbe

majoritairement la lumière à 360, 805 et 870 nm. Les phototrophes anoxygénique ne possèdent qu'un type de photosystème. Chez bactéries pourpres, les mieux étudiées (figure page 54, le composé P870 passe sous l'effet de la lumière d'un potentiel positif à un potentiel négatif. Il libère alors des électrons qui cheminent via plusieurs transporteurs et rejoignent le composé P 870, qui retrouve son potentiel de réduction initial. De l'ATP est synthétisé au cours de ce flux d'électrons cyclique. La réduction de NADP^+ en NADPH, nécessaire pour la réduction du CO_2 chez les photoautotrophes, est possible grâce à des donneurs d'électrons externes comme H_2S , Fe^{2+} ou S^0 . Les phototrophes anoxygéniques ne possédant pas le photosystème II capable de dissocier la molécule d'eau, il n'y pas de libération d'oxygène au cours de ce processus de photosynthèse, d'où son nom de photosynthèse anoxygénique.

III.3.4 Fixation du CO_2

Les organismes chimolithotrophes emploient des molécules dépourvues de carbone comme donneurs d'électrons. Le CO_2 est alors la source de carbone la plus fréquemment utilisée par ces organismes dits autotrophes. La transformation du CO_2 en carbone organique peut se faire selon plusieurs voies biochimiques. La plus courante, également rencontrée chez les organismes réalisant la photosynthèse oxygénique est le cycle du Calvin (**fig.3.8**). Ce cycle permet l'incorporation de 6 molécules de CO_2 et leur transformation en une molécule de fructose. Il repose sur plusieurs enzymes et tout particulièrement la ribulose biphosphate carboxylase, ou RubisCO, et la phosphoribulokinase. Pour fonctionner outre le CO_2 . Le cycle du Calvin requiert de l'ATP (fourni par le métabolisme énergétique) et un pouvoir réducteur, NADPH. Si le donneur d'électrons initial à un potentiel de réduction suffisamment négatif, il permettra aussi la réduction directe de NADP en NADPH. C'est le cas de l'hydrogène, H_2 . Dans le cas contraire, les électrons venant du donneur initial ne peuvent pas réduire NADP. Il s'en suit la mise en place d'un flux inverse d'électrons (les électrons se déplacent contre le gradient électrochimique), qui est consommateur d'énergie. Plus le potentiel de réduction du couple auquel appartient le donneur d'électron sera élevé, plus le flux inverse d'électrons sera long et consommateur d'énergie. C'est en particulier le cas des composés soufrés, azotés et surtout de Fe^{++} . Dans ce cas, malgré l'oxydation d'une grande quantité de donneurs d'électrons, l'énergie disponible pour la biosynthèse et la production de biomasse sera très faible.

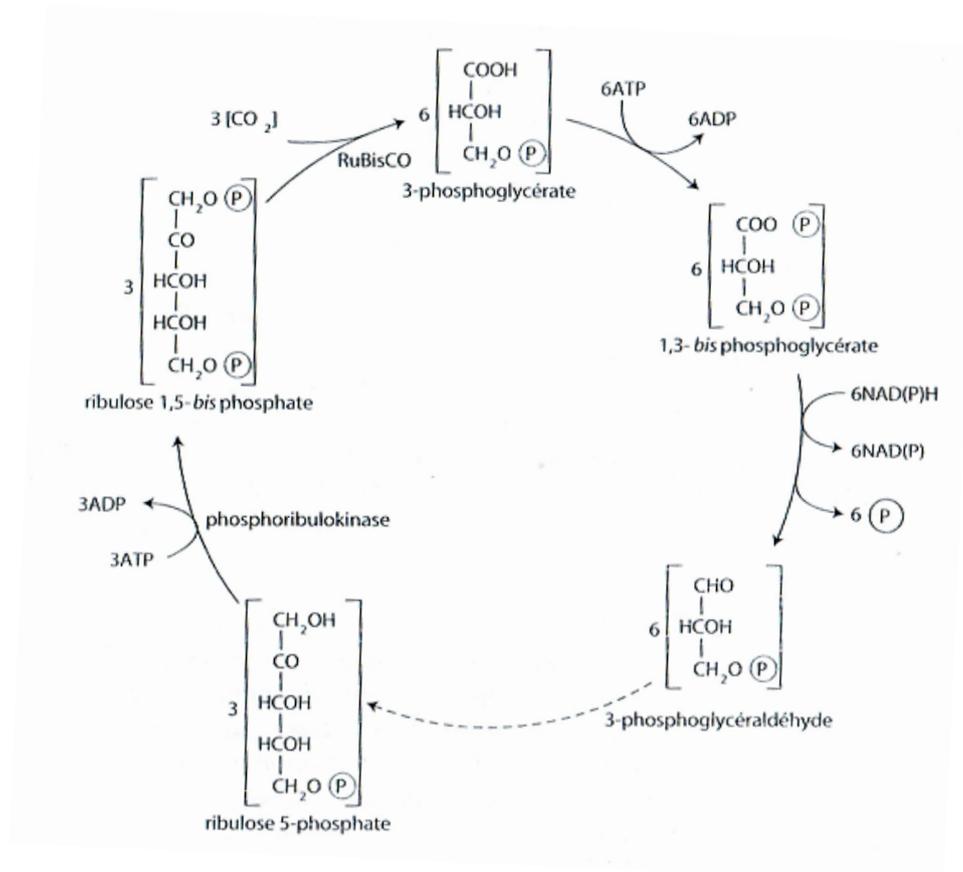


Figure 3.8 : Cycle de Calvin.

Outre le cycle de Calvin, il existe d'autres voies de fixation du CO₂. Les bactéries vertes sulfureuses comme *Chlorobium*, mais aussi certaines *Bacteria* et *Archaea* hyperthermophiles utilisent une voie, nommée le cycle inverse de l'acide citrique.

Chez la bactérie verte non sulfureuse *Chloroflexus*, la voie utilisée est la voie de l'hydroxypropionate, également rencontrés chez certaines *Archaea*.

Enfin les homoacétogènes, et les méthanogènes emploient une voie non cyclique, la voie de l'acétyl-CoA (fig.3.6).

IV. Chapitre IV : Génétique bactérienne

IV.1 Matériel génétique des bactéries

L'organisation des bactéries est infiniment plus complexe que celle des virus. Il s'agit de cellules possédant tous les types de macromolécules caractéristiques de la matière vivante : protéines, lipides, polysaccharides et les deux acides nucléiques, ADN et ARN. C'est pourtant chez ces organismes que le problème de la nature du matériel génétique a été résolu le premier, grâce aux expériences de transformation bactérienne chez le Pneumocoque, *Diplococcus pneumoniae*.

IV.1.1 Chromosomes et plasmides

Le chromosome consiste principalement en un polymère appelé acide désoxyribonucléique (ADN). Ce polymère est fait de sous-unités appelées nucléotides. Le nombre de nucléotides dans le polymère n'est pas le même dans les différents chromosomes. Par exemple, le chromosome de *Buchnera* (un des plus petits chromosomes bactériens) contient $\sim 640 \times 10^3$ nucléotides, tandis que celui de *Mycobacterium tuberculosis* en contient $4,4 \times 10^6$.

L'ADN et l'acide ribonucléique (ARN), un polymère apparenté, sont tous deux des acides nucléiques ; les deux types de molécules portent de l'information dans la séquence de leurs nucléotides. Dans la bactérie, l'ARN est nécessaire à la conversion de l'information contenue dans l'ADN, en processus physiologiques normaux.

L'ADN chromosomique régit la vie de la cellule en codant pour toutes les enzymes (contrôlant donc structure et métabolisme) et les diverses molécules d'ARN (impliquées dans la synthèse des protéines et certaines fonctions de contrôle). L'information contenue dans l'ADN régule et coordonne la croissance et la différenciation. En outre, l'ADN constitue un système auto-contrôlé : il dispose de divers mécanismes pour détecter et réparer ses portions endommagées ou modifiées.

Toute l'information contenue dans l'ADN est transmise aux cellules filles lorsque la cellule parentale se divise. Au cours de la réplication, l'ADN est normalement copié avec beaucoup de précision, de telle sorte que les caractéristiques de l'espèce restent stables d'une génération à l'autre. Les cellules filles ont donc tendance à hériter des caractères parentaux.

Chez la plupart des bactéries, la longue molécule d'ADN du chromosome se dispose en une boucle fermée ; chez d'autres, comme *Borrelia burgdorferi*, *Streptomyces spp.*, elle est linéaire.

Toute cellule bactérienne peut contenir une ou plusieurs copies du chromosome. Certaines espèces comportent normalement des copies multiples. Par exemple, *Deinococcus radiodurans* en a environ quatre, au minimum, tandis que *Desulfovibrio gigas* peut en compter plus de dix.

Habituellement, les bactéries ne contiennent qu'un seul type de chromosome. Cependant, chaque cellule de *Vibrio cholerae* contient deux chromosomes circulaires dissemblables

En plus du chromosome, de nombreuses bactéries, tant Gram-positives que Gram-négatives, contiennent un ou plusieurs plasmides. Un plasmide est un morceau d'ADN supplémentaire, souvent beaucoup plus petit que le chromosome, et qui peut se répliquer indépendamment.

Beaucoup, voire la plupart des plasmides sont « circulaires », c'est-à-dire que ce sont des boucles fermées d'ADN. Certains cependant sont linéaires. Il existe des bactéries (p. ex. *Borrelia burgdorferi*) qui contiennent à la fois des plasmides circulaires et linéaires.

Les plasmides codent pour diverses fonctions. Certains codent pour des enzymes qui inactivent des antibiotiques bien définis. Chez certaines bactéries pathogènes, d'importants facteurs de virulence sont encodés sur des plasmides ; notamment, la toxine du charbon chez *Bacillus anthracis* et une adhésine chez la souche entérotoxigène d'*E.coli* (ETEC)

Certains plasmides procurent la capacité de métaboliser des substrats particuliers. Ainsi, le plasmide Cit code pour un système de transport servant à l'absorption de citrate. Il y a aussi le plasmide TOL qui confère aux souches de *Pseudomonas* la capacité de métaboliser le toluène et le xylène

Bien qu'ils codent souvent pour des fonctions utiles, les plasmides ne sont généralement pas indispensables à leur cellule hôte.

IV.1.2 Réplication de l'ADN

La réplication est tout d'abord dite semi-conservative. Ceci signifie que sur les deux brins d'ADN de la double hélice, il y a toujours un brin parental (ou matriciel) et un brin nouvellement formé.

La réplication de l'ADN se fait dans le sens 5' vers 3', le phosphate en 5' du nucléotide arrivent se fixe à l'extrémité 3' -OH du nucléotide précédemment ajouté. L'unité d'ADN où se produit la réplication est appelée le **réplicon**. Ce réplicon a une origine où est initiée la réplication et un terminus où elle est arrêtée.

Chez *E. coli*, il existe au niveau de l'ADN bicaténaire une origine unique de la réplication appelée **OriC**. Cette séquence contient des sites de liaison pour une protéine appelée **DnaA** ou protéine d'initiation de la réplication. Cette étape est indispensable à la transformation localisée de l'ADN double brin en ADN simple brin.

Ensuite, il y a fixation de l'ADN hélicase (ou protéine **DnaB**). L'hélicase va catalyser le déroulement de la double hélice d'ADN en présence d'ATP, ce qui définira la future fourche de réplication.

La **primase** participe à la synthèse d'une courte séquence d'ARN portant à son extrémité un groupe 3'OH sur lequel sera ajouté le premier désoxyribonucléotide, cette amorce est complémentaire à l'ADN matrice. A ce moment, l'extension de la molécule se fait sous forme d'ADN et non d'ARN. L'amorce sera enlevée et remplacée par de l'ADN.

Les brins séparés de l'ADN sont stabilisés sous forme simple brin grâce à la fixation de protéines appelées **SSB** (pour « single strand binding »). Ces protéines SSB empêchent les deux brins d'ADN de se réapparier.

La réplication n'est pas identique entre les deux brins d'ADN. Au niveau de la fourche de réplication, l'un des deux brins peut être synthétisé de façon continue, il y a toujours un

groupement 3'-OH libre auquel un nouveau nucléotide pourra être ajouté par l'**ADN polymérase III** qui va catalyser la synthèse du brin néoformé, c'est le brin avancé. Ici une seule amorce est nécessaire au départ.

L'autre brin sera synthétisé par fragments, dits **fragments d'Okazaki** et est appelé brin retardé. Ces fragments de 1000 à 2000 résidus, nécessitent une amorce d'ARN synthétisée par une ARN polymérase-ADN dépendante ou primase. Plusieurs amorces seront ici nécessaires. L'ADN polymérase III s'insère au niveau de la fourche de réplication et utilise l'amorce d'ARN pour commencer la synthèse de l'ADN. Cette amorce d'ARN sera ensuite excisée grâce à l'activité exonucléasique de l'ADN polymérase I. Les délétions issues de cette excision sont remplacées par de l'ADN néoformé sous l'action de l'ADN polymérase I. Enfin, l'ADN ligase relie les différents fragments.

Les protéines impliquées dans la réplication forment un complexe multiprotéique appelé **réplisome** (fig.4.1).

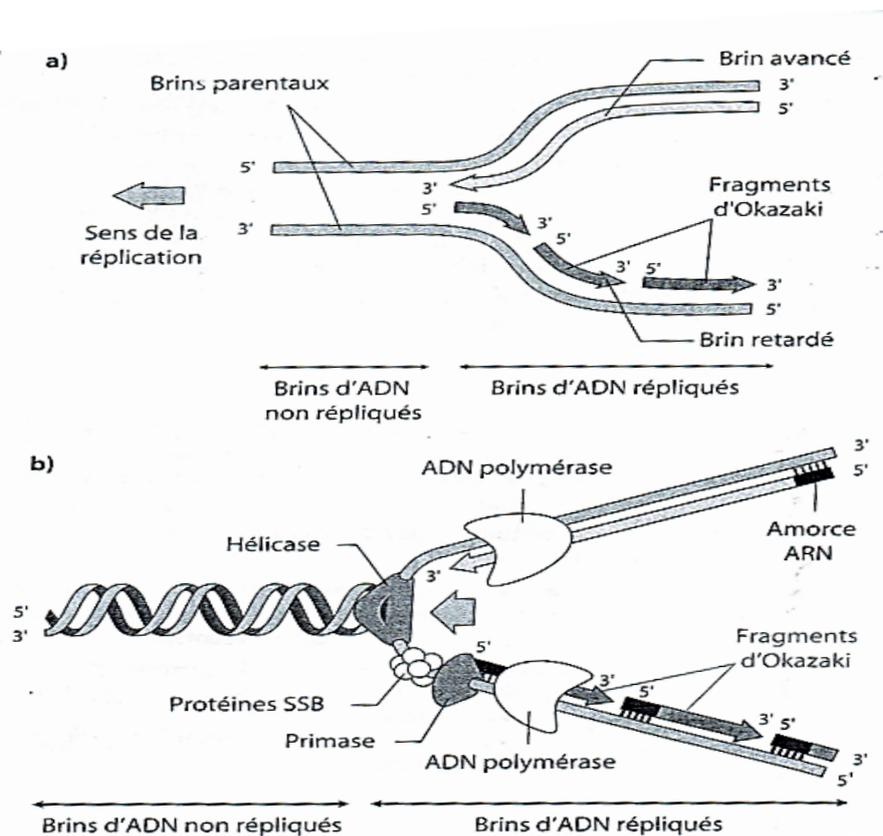


Figure 4.1 : Le réplisome

Lorsque la réplication d'un chromosome circulaire est achevée, les deux molécules obtenues sont reliées. Elles seront séparées par une **topoisomérase** et réparties dans chaque cellule fille.

IV.2 Variations génétiques

L'ADN bactérien peut être l'objet de variations qui se traduisent par l'apparition de différences héréditaires dans les structures et/ou les fonctions permanentes des bactéries. Les variations génétiques ou génotypiques (le génotype est l'ensemble des déterminants génétiques portés par une cellule) résultent d'une mutation, d'une transformation, d'une conjugaison, de l'acquisition d'un plasmide, d'une transduction... en somme d'un changement de nature d'un ou plusieurs gènes. Les variations génétiques doivent être distinguées des variations phénétiques ou phénotypiques (le phénotype est l'ensemble des propriétés observables d'une cellule). Les premières affectent le génome bactérien dans sa séquence nucléotidique alors que les secondes affectent le comportement de la bactérie.

Les variations phénotypiques qui résultent de l'adaptation de l'ensemble d'une population bactérienne ayant le même génotype à diverses conditions extérieures sont réversibles, non transmissibles à la descendance mais spécifiques (non aléatoires). Leur mécanisme est en relation avec l'activité des gènes qui peut être régulée par des systèmes plus ou moins complexes : induction comme dans l'opéron lactose ; répression comme dans l'opéron tryptophane (Jacob et Monod 1961...).

IV.2.1 Mutations

Une mutation est un changement dans la séquence nucléotidique de l'ADN de la cellule. Ce changement peut se voir par une altération du phénotype de la cellule, mais peut être silencieux s'il survient sur une partie non essentielle de la séquence protéique ou sur une partie non codante du génome. Des mutations au niveau des gènes essentiels comme ceux nécessaires à la réplication de l'ADN peuvent être létales et ne sont donc jamais isolées. Les changements dans la séquence d'ADN vont d'un changement d'une base isolée, appelé **mutation ponctuelle**, à des réarrangements étendus du génome, parfois appelés mutations multisites, qui comprennent des segments courts ou longs d'ADN et peuvent atteindre plusieurs gènes. Ces mutations multisites peuvent être des substitutions et des duplications des séquences, comme cela est présenté dans la figure 4.2.

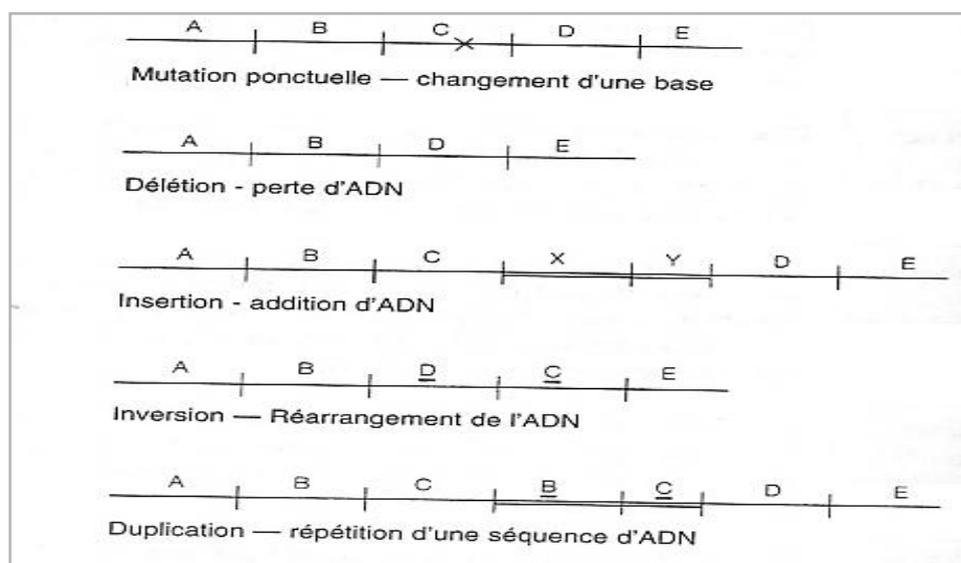


Figure 4.2 : Modifications possibles des séquences d'ADN pouvant donner une mutation.

IV.2.1.1 Les mutations ponctuelles

Les mutations ponctuelles peuvent consister en un changement d'une purine par une autre purine (A ↔ G) ou d'une pyrimidine par une autre pyrimidine (C ↔ T) et sont appelées **transitions**, tandis que les changements d'une purine par une pyrimidine ou l'inverse sont appelés **transversions**. L'effet d'un changement de base du génotype sur le phénotype dépend de la nature de la mutation et de son site. Il existe quatre types de mutations ponctuelles illustrés dans la figure 4.3 et décrits ci-dessous.

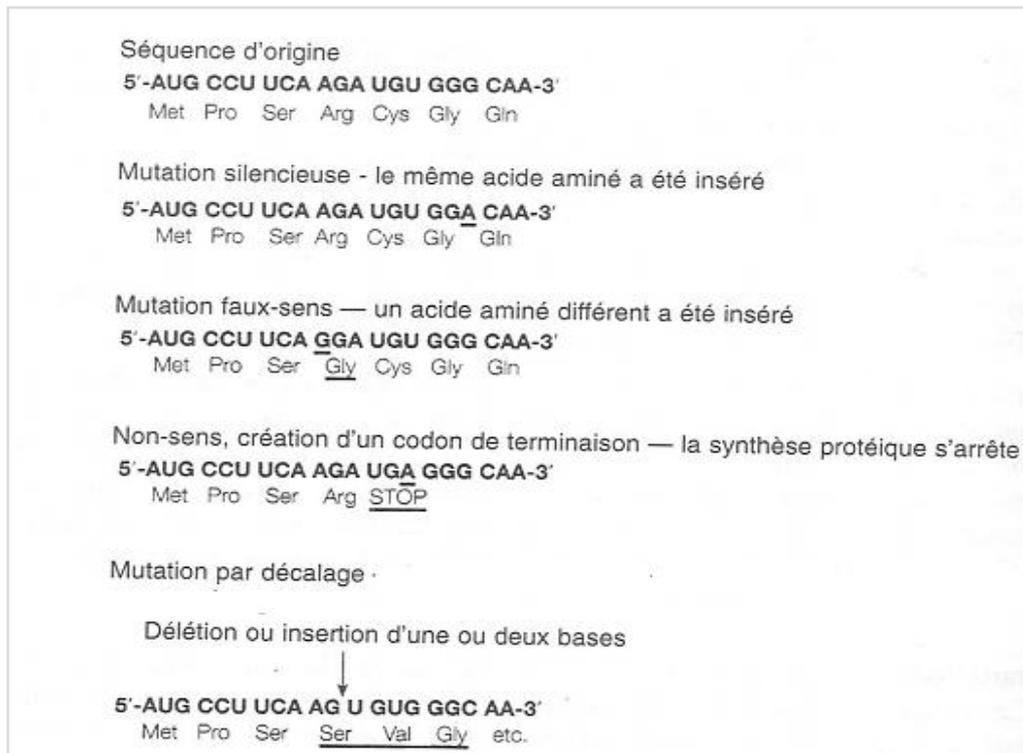


Figure 4.3 : La nature des mutations ponctuelles montrées sur la séquence d'ARNm et leurs conséquences sur la séquence protéique.

- **Les mutations silencieuses** sont liées à la redondance du code génétique, le même acide aminé est inséré dans la protéine et donc aucun changement n'est observé au niveau du phénotype.

- **Les mutations faux-sens** surviennent lorsqu'un acide aminé différent est inséré dans la chaîne. La conséquence de ce changement dépend de la localisation de l'altération sur une partie essentielle ou non essentielle de la protéine. Dans le premier cas, la fonction de la protéine peut être altérée ou perdue ; dans l'autre cas aucun changement au niveau du phénotype ne sera observé.

- **Les mutations non-sens** se caractérisent par le changement d'un codon codant par un acide aminé en un codon STOP (UAA, UAG, UGA). La synthèse protéique s'arrête prématurément, donnant une protéine tronquée.

- **Les mutations par décalage** (« **frame shift** ») surviennent lorsqu'un ou deux nucléotides sont délétés ou insérés dans la séquence d'ADN, alternant par conséquence la

lecture lors de la traduction et produisant une séquence d'acides aminés complètement altérée en aval du point de changement.

IV.2.1.2 L'isolement des mutants

Bien que des mutations surviennent spontanément chez les bactéries, elles se font à une fréquence très faible. Ainsi, il est souvent souhaitable d'utiliser un mutagène comme la lumière UV pour augmenter la chance d'isoler la mutation à laquelle on s'intéresse. L'identification de la présence de cette mutation dépend de la nature du gène auquel on s'intéresse ; généralement, on distingue trois catégories :

- Des mutations résistantes à certains composés toxiques comme les antibiotiques ou à une infection par le bactériophage. Ces mutations peuvent être sélectionnées par une culture en présence de cet agent toxique. Seules les souches de mutants résistants croîtront.
- Des mutants auxotrophes incapables de synthétiser un composé essentiel à la croissance comme un acide aminé ou une vitamine. Ces mutants ne peuvent être isolés directement mais peuvent être **repérés** par une réplique sur boîte décrite ci-dessous
- Des mutants incapables d'utiliser des substrats particuliers comme le lactose ou le maltose pour leur croissance. Ils peuvent aussi être identifiés par la réplique sur la boîte.

IV.2.1.3 La réplique sur boîte

C'est une méthode qui permet de détecter, au sein de nombreuses colonies, la présence d'une mutation particulière. Les bactéries sont étalées dans des boîtes, contenant un milieu dans lequel le parent et les mutants vont croître à une dilution où les colonies isolées peuvent être vues dans la boîte. Après incubation, les bactéries sont transférées en utilisant une pièce de velours stérile, dans des boîtes contenant un milieu qui permet la détection de mutation (**fig.4.4**). La nature du milieu dépend de la mutation recherchée. En cas de mutations auxotrophiques, les colonies peuvent se répliquer sur les boîtes avec ou sans un facteur de croissance particulier. Des souches de mutants incapables de synthétiser ce facteur ne croîtront pas dans un milieu minimal, mais le feront dans un milieu qui contient ce facteur de croissance. Après avoir identifié la colonie mutante par son absence de croissance, elle peut être enlevée et purifiée la colonie mutante par son absence de croissance, elle peut être enlevée et purifiée à partir de la boîte dans laquelle elle s'est multipliée.

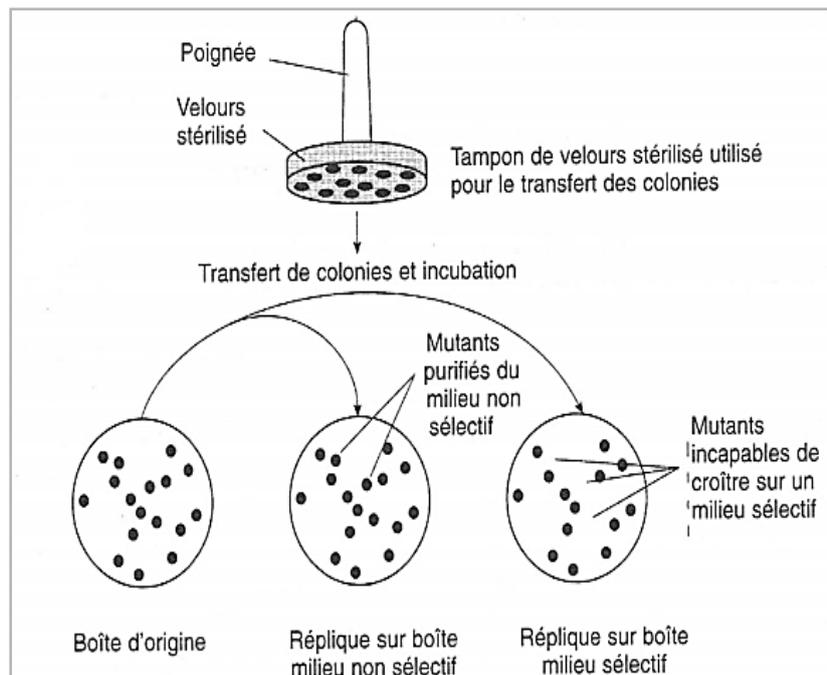


Figure 4.4 : Réplique sur boîte pour isoler des colonies de mutants.

IV.2.1.4 La réversion des mutations

L'effet d'une mutation peut être inversé par plusieurs moyens. La plus simple est la réversion ou une **seconde** mutation survient et reconvertit la seconde mutée en séquence initiale (type sauvage). La sélection des réversions est un bon test pour indiquer que la mutation initiale était une mutation ponctuelle, car les délétions ne s'inversent pas facilement.

Un autre moyen pour revenir au phénotype sauvage est la suppression, mécanisme pendant lequel une seconde mutation survient à un point différent du génome et compense l'effet de la première mutation. La seconde mutation peut être au niveau d'un site différent du même gène et, dans ce cas sera appelée mutation **suppresseur intragénique** ou sur un gène complètement différent ; on l'appellera alors mutation **suppresseur extragénique**.

IV.2.1.5 Mutagènes

Les agents chimiques et physiques qui se lient à l'ADN peuvent augmenter le taux de mutagenèse. Les mutagènes chimiques peuvent agir de différentes façons :

- **Des analogues de bases** comme le 5-bromouracile et le 2-aminopurine sont incorporés dans l'ADN durant la réplication normale, subissent des modifications tautomériques similaires aux bases normales mais à des fréquences plus élevées, ce qui aboutit à une mutation.
- **Des agents intercalants** sont des composés plats, à trois anneaux similaires en structure à une paire de bases. Ils peuvent s'intercaler dans l'ADN, provoquant une

distorsion de l'hélice et donc un glissement durant la réplication et insertion et la délétion de bases. Le bromure d'éthidium et l'orange acridine en sont des exemples.

- Des **agents alkylants** sont des composés qui modifient la structure d'une base et donc ses propriétés d'appariement lors de la réplication suivante. Par exemple, l'hypoxanthine qui transforme la cytosine en hydroxyl amino cytosine qui s'apparie avec l'adénine, provoquant la transition de G-C en A-T.

- Les **radiations ionisantes** peuvent provoquer des lésions d'ADN. La **lumière UV** est fréquemment utilisée en laboratoire pour induire des mutations et son mécanisme d'action est le plus connu. La lésion principale provoquée par la lumière UV est la formation de dimères de pyrimidine, les plus fréquents étant les **dimères de thymine**, entre des bases adjacentes ; ceci provoque une distorsion de l'hélice de l'ADN. Ce n'est pas un mutagène proprement dit mais des mutations surviennent lorsque la cellule essaie de réparer la lésion.

- La **mutagenèse *in vitro*** est fréquemment utilisée pour modifier des séquences précises de l'ADN, lorsque la séquence d'ADN est connue. Une copie de la séquence mutée est synthétisée chimiquement et utilisée pour remplacer le type sauvage dans le génome.

IV.2.1.6 Mécanismes de réparation de l'ADN

Des erreurs de réplication de l'ADN et des lésions de l'ADN secondaires à l'exposition à des mutagènes surviennent régulièrement ; les micro-organismes ont mis au point au cours de leur évolution des systèmes très complexes pour reconnaître et réparer ces lésions. Dans le meilleur des cas, l'organisme répare directement le dommage initial, sans induire de changement de la séquence des bases mais parfois le degré des dommages est si grand que la synthèse d'ADN ne peut continuer. Dans ces conditions, un **système de réparation SOS** est activé et permet la réparation rapide et étendue de l'ADN mais aux dépens de l'exactitude car on peut avoir une accumulation de mutations.

Une cellule d'*E.coli* normale peut supporter environ 30 lésions par molécule et au moins quatre systèmes de réparation différents sont présents pour rectifier ces dommages et résoudre ce problème.

- **La photoréactivation**

Dans un mécanisme de réparation lumière-dépendante, l'enzyme photolyase avec l'aide de la flavine adénine dinucléotide (FAD) coupe l'anneau cyclobutane entre deux pyrimidines adjacentes pour restaurer les monomères initiaux. Ceci est le mécanisme de défense premier vis-à-vis des dommages liés aux UV.

- **La réparation par excision**

La réparation par excision est appelée réparation « sombre » en opposition à la photoréactivation. C'est un système général utilisé pour réparer un certain nombre de dommages d'ADN comme ceux causés par des dimères de pyrimidine et des erreurs d'appariement de bases. Les produits des gènes *uvr A*, *B* et *C* se lient pour former une endonucléase qui reconnaît les distorsions de l'hélice de l'ADN causées par des modifications des bases. L'endonucléase *Uvr ABC* coupe l'ADN aux deux côtés de la lésion (**fig.4.5**) et l'ADN polymérase I enlève et remplace les bases. L'ADN ligase comble la lacune.

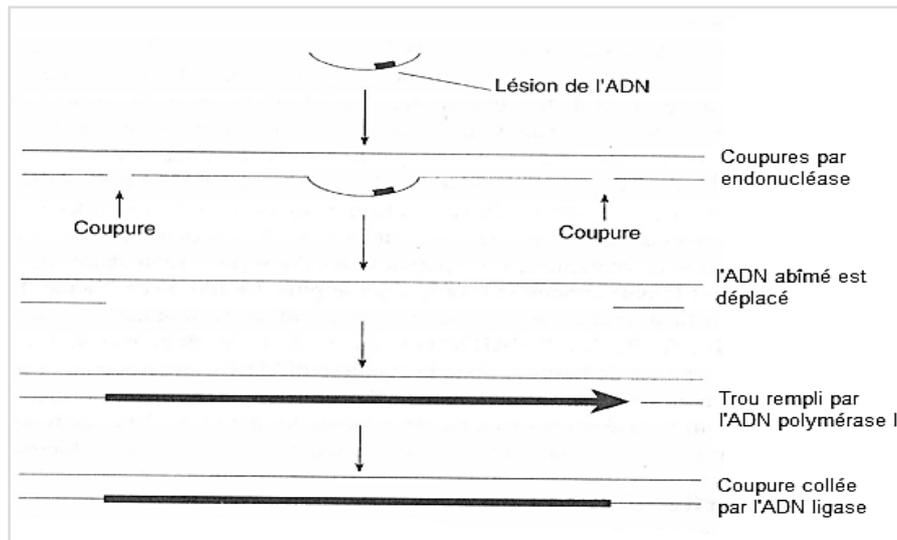


Figure 4.5 : Schéma montrant les étapes de base d'une excision-réparation.

○ **La réparation par recombinaison (postreplication)**

Les dimères de thymine ne peuvent être répliqués ; au niveau de ces sites, l'ADN polymérase peut sauter la lésion sans s'arrêter et continuer la synthèse à partir de l'ADN matrice. Ceci laisse en place une lacune dans le brin d'ADN synthétisé situé en regard du dimère. Elle ne peut pas être réparée par l'excision qui nécessite un brin intact, la matrice. La lacune peut être comblée par une recombinaison médiée par la protéine RecA avec l'hélice de l'ADN sœur qui contient la séquence intacte et qui devrait être en face du dimère (**fig.4.6 a**). Bien que la recombinaison ne répare pas la lésion, elle permet aux deux molécules neuves d'ADN d'être réparées par le mécanisme de réparation par excision.

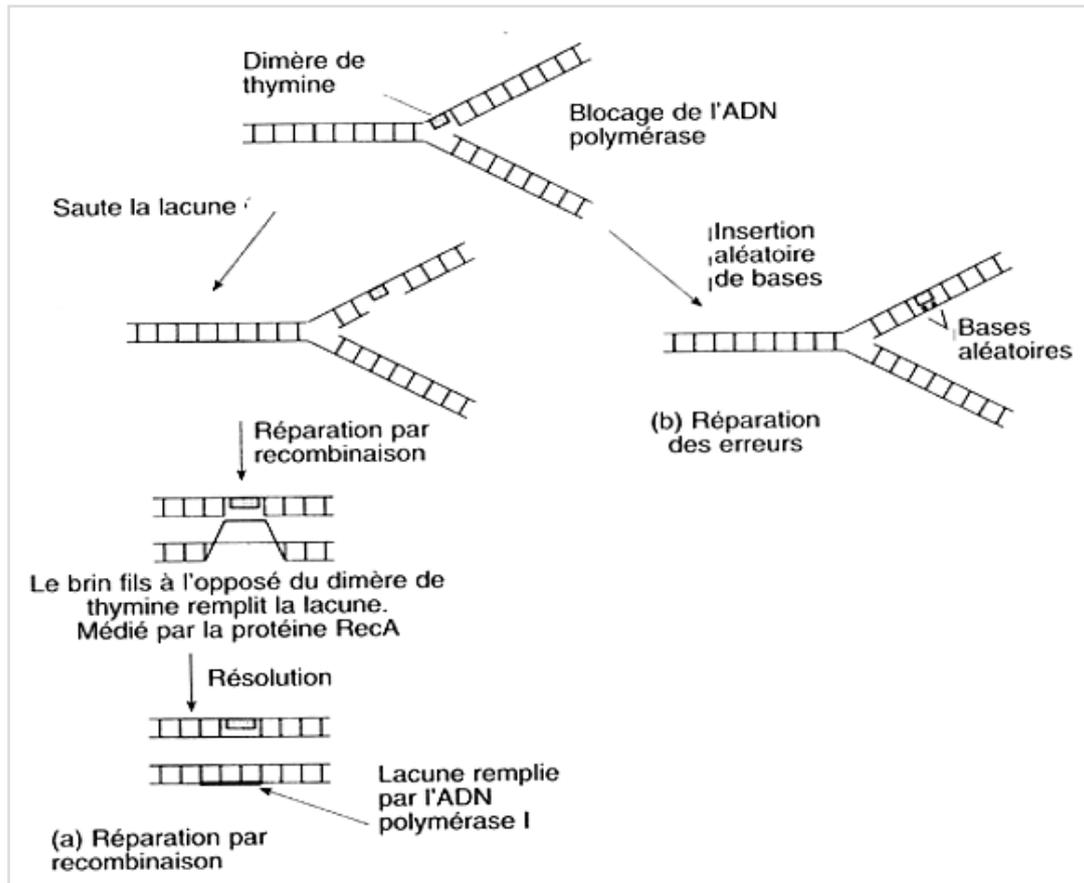


Figure 4.6 : (a) Recombinaison et (b) réparation des erreurs d'un ADN endommagé par les UV durant la réplication.

o La réparation SOS

Il existe un grand nombre de gènes et d'opérons dans la cellule qui sont régulés par la protéine RecA et un inhibiteur de la transcription le LexA. Ceux-ci sont impliqués dans la réparation de l'ADN et sont appelés systèmes de réparation SOS.

Il s'agit d'un système de réparation reconnaissant les erreurs, qui interagit avec l'ADN polymérase et lui permet de continuer la réplication de l'ADN en aval d'un dimère de pyrimidine (Fig4.6 b). Cette capacité de lecture dans le sens 3' → 5' de l'enzyme est inhibée afin que des bases puissent être insérées de façon aléatoire en regard du dimère sans complémentarité des bases. Ce mécanisme explique la principale raison pour laquelle la lumière UV est mutagène, puisque la plupart des autres systèmes réparent l'ADN correctement. La réparation SOS est induite par la protéine RecA activée par une modification de la conformation de l'ADN secondaire à la lésion. Les protéines RecA activées provoquent le clivage protéolytique de la protéine LexA qui ne pourra être un inhibiteur de la transcription. Les gènes dans le système peuvent ensuite être exprimés aussi longtemps que la lésion de l'ADN est présente dans la cellule. Une fois la lésion réparée, la protéine RecA n'est plus activée et n'induit pas la protéolyse de la LexA ; ainsi, la protéine LexA s'accumule dans la cellule et inhibe la transcription des gènes codant pour le système de réparation SOS.

IV.2.1.7 Caractères de la mutation

Les mutations bactériennes comme celles observées à partir des autres organismes se caractérisent par leur rareté, spécificité, stabilité, et leur spontanéité.

- **Rareté**

Chez les bactéries, la probabilité de mutation par génération (taux de mutation) est de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-8} . Cependant la fréquence des mutations bactériennes est considérablement augmentée par les agents mutagènes (rayons UV, rayons X, acridine etc...) qui modifient la structure d'une molécule d'ADN, et augmentent le taux de mutation pour l'ensemble des caractères. Toute mutation survient indépendamment d'autres mutations éventuelles, c'est ainsi que la probabilité d'apparition de mutation double portant sur deux caractères indépendants est très faible.

- **Spécificité**

Chaque mutation affecte un caractère déterminé, mais dans une population bactérienne il peut s'agir de caractères différents.

Exemple : Dans une même population de pneumocoques, les mutations peuvent toucher soit la perte de la capsule donc perte de virulence soit l'apparition de mutants auxotrophes.

- **Stabilité**

Le caractère nouvellement acquis se transmet de génération en génération, toutefois par mutation réverse on peut observer un retour vers le caractère d'origine.

- **Spontanéité**

Lorsqu'il s'agit d'un mutant isolé par un agent sélecteur, la mutation se produit toujours indépendamment de cet agent. C'est ainsi qu'un mutant résistant à un antibiotique isolé à l'aide d'un milieu contenant cet antibiotique est considéré comme ayant acquis son caractère de résistance avant tout contact avec l'antibiotique. Ceci est très important le plan médical car les antibiotiques ne déterminent pas la résistance mais sélectionnent les bactéries déjà résistantes. La spontanéité de la mutation a été prouvée par l'expérience des répliques de Lederberg.

Le but de la démonstration est d'obtenir des bactéries résistantes à un antibiotique par exemple la streptomycine à partir des bactéries sensibles sans que celles-ci n'aient été à aucun moment au contact de cet antibiotique.

IV.2.2 Recombinaison génétique

IV.2.2.1 Transformation

Les pneumocoques entourés d'une capsule de polysaccharides sont virulents (pathogènes) et ils forment sur un milieu solide des colonies dont le bord est lisse. Les pneumocoques sans capsule ne sont pas virulents et ils forment sur milieu solide des colonies dont les bords sont dentelés. Quand une souche non virulente est mise en contacte d'un extrait d'ADN purifié à partir d'une souche virulente, certaines cellules non virulentes sont transformées en cellules virulentes. Ce phénomène prouve donc que c'est bien l'ADN qui est le matériel génétique. Dans certaines espèces, la transformation peut se produire à des fréquences de l'ordre de 25%, mais le plus souvent ce phénomène se produit beaucoup plus rarement.

Le vieillissement de certaines cultures bactériennes peut provoquer une rupture cellulaire spontanée (autolyse) qui entraîne un relâchement et une fragmentation de l'ADN dans le milieu ; si d'autres cellules sont présentes, on peut observer des transformations.

Une cellule, pour être transformée, doit être physiologiquement réceptive ou « compétente » mais cet état de compétence ne dure qu'une fraction du cycle cellulaire (selon certaines indications, le calcium interviendrait en modifiant la structure de la paroi chez la cellule receveuse). Pendant cet état physiologique particulier, l'ADN peut s'accorder de façon transitoire à la surface cellulaire. Chaque cellule possède un certain nombre de sites sur lesquels l'ADN peut s'accrocher. On peut saturer ces sites récepteurs avec de l'ADN non transformant (de l'ADN d'un organisme différent) et empêcher ainsi l'apparition de transformants. Seuls les fragments d'ADN suffisamment grands peuvent pénétrer dans la cellule compétente ; une fois à l'intérieur de la cellule, l'ADN n'est jamais à l'état libre. Un seul brin de l'ADN transformant (exogène) s'intègre au chromosome de l'hôte. Dans le cas des bactéries Gram positif, l'autre brin est dégradé au cours du processus de pénétration. On suppose que le génome de la cellule hôte, sous l'effet d'un facteur de compétence, exprime une autolysine qui démasque sur la membrane cellulaire une protéine de fixation de l'ADN associée à une exonucléase : cette dernière serait responsable du phénomène de dégradation et de pénétration. Dès son entrée, le brin subsistant est habillé par un petit polypeptide (phase d'éclipse).

Chez les bactéries Gram négatif, le duplex exogène pénètre au complet : la séparation et la dégradation d'un des brins ont lieu à l'intérieur de la cellule. Si le brin exogène est identique au brin endogène qu'il remplace (non transformant), l'intégration n'a pas de conséquence phénotypique. Sinon elle produit un hétéroduplex (et, comme l'appariement des bases est incomplet, elle peut entraîner l'intervention d'un mécanisme de l'ADN, auquel cas son effet est annulé). Une fois l'exogénote intégré sur une chaîne, le segment complémentaire endogène peut être excisé et dégradé : le chromosome de l'hôte devient entièrement recombiné. Dans l'hypothèse contraire, c'est un des deux chromosomes fils qui le sera. Une explication du processus d'intégration repose sur le modèle de réplication du chromosome à partir d'une fourche de réplication stationnaire, liée à la membrane cellulaire et dans laquelle défile l'ADN circulaire de la bactérie : le brin d'ADN transformant pénétrerait seulement en deux sites qui correspondraient aux sites de réplication localisés sur la membrane interne et se trouverait donc dans la région de la fourche. Quand se présenterait le segment homologue sur la chaîne complémentaire de l'hôte, la synthèse serait interrompue et l'exogénote viendrait s'intégrer à la chaîne l'ADN néosynthétisée. Habituellement, seul un petit fragment de l'ADN transformant s'intègre. On ne trouve jamais d'ADN transformant libre dans le cytoplasme et il ne peut s'exprimer phénotypiquement qu'après avoir été intégré. La fréquence de transformation augmente quand la concentration d'ADN augmente, et ceci jusqu'à un plateau de saturation. Si un même fragment d'ADN transformant porte deux marqueurs très liés, ils pourront être tous deux intégrés et s'exprimer phénotypiquement. De telles « doubles transformations » sont rares et leur fréquence est fonction du degré de liaison entre les marqueurs.

IV.2.2.2 Conjugaison

Le matériel génétique des bactéries et des virus est organisé en une seule structure circulaire et non en plusieurs structures linéaires comme chez les organismes supérieurs. La

conjugaison consiste en un transfert d'ADN d'une cellule donneuse (mâle) à une cellule receveuse (femelle). Dans la souche *Escherichia coli* K12, la cellule mâle possède de nombreux exemplaires du facteur sexuel F ; quand ce facteur sexuel est dans sa phase extrachromosomique (autonome), la cellule mâle est appelée F⁺. Les cellules femelles ne possèdent pas de facteur sexuel et sont appelées F⁻. Quand des cellules F⁺ et des cellules F⁻ se conjuguent, un facteur sexuel ou plusieurs sont transmis par l'intermédiaire d'un pont cytoplasmique entre les conjuguants, et, plus précisément, d'un appendice tubulaire de la cellule mâle, appelé *pilus* : les receveuses F⁻ sont infectées et deviennent F⁺ (cellules mâles). Aucun autre matériel génétique n'est transmis dans les conjugaisons F⁺x F⁻.

Il arrive qu'un facteur F s'intègre dans le « chromosome » bactérien de certaines cellules F⁺. Ces cellules qu'on appelle alors Hfr (haute fréquence de recombinaison) ont la potentialité de transférer du matériel génétique. Les particules F autonomes disparaissent rapidement dans les cellules Hfr nouvellement formées. Le facteur F s'intègre à un endroit du chromosome en cassant l'anneau chromosomique à cet endroit : le facteur F se trouve donc à une extrémité du chromosome linéaire résultant de la rupture de l'anneau. L'autre extrémité (l'extrémité distale, c'est-à-dire la plus éloignée par rapport à F) est transférée la première pendant le processus de conjugaison. Le facteur F, à l'extrémité terminale du chromosome Hfr, est rarement transmis car le pont cytoplasmique ne dure qu'un temps bref. La rupture du pont interrompt le transfert du matériel génétique de la cellule Hfr à la cellule receveuse. Donc, dans un croisement Hfr x F⁻, la cellule receveuse, devenue exconjugant après le processus de conjugaison, reste toujours F⁻, à moins que le chromosome entier ne soit transmis (avec le facteur F à l'extrémité terminale). Chaque souche Hfr transmet ses marqueurs dans un ordre particulier qui dépend du point, caractéristique de la souche, où le facteur F s'intègre dans le chromosome circulaire.

Pendant quelques générations après la conjugaison, l'exconjugant est diploïde partiel (mérozygote) pour la portion du chromosome qu'il a reçu de l'Hfr. Ce fragment de chromosome qu'il a reçu de l'Hfr. Ce fragment de chromosome (exogénote ou mérogénote) peut soit s'intégrer dans le chromosome de l'hôte, soit être perdu et le mérozygote redevient haploïde (fig.4.7).

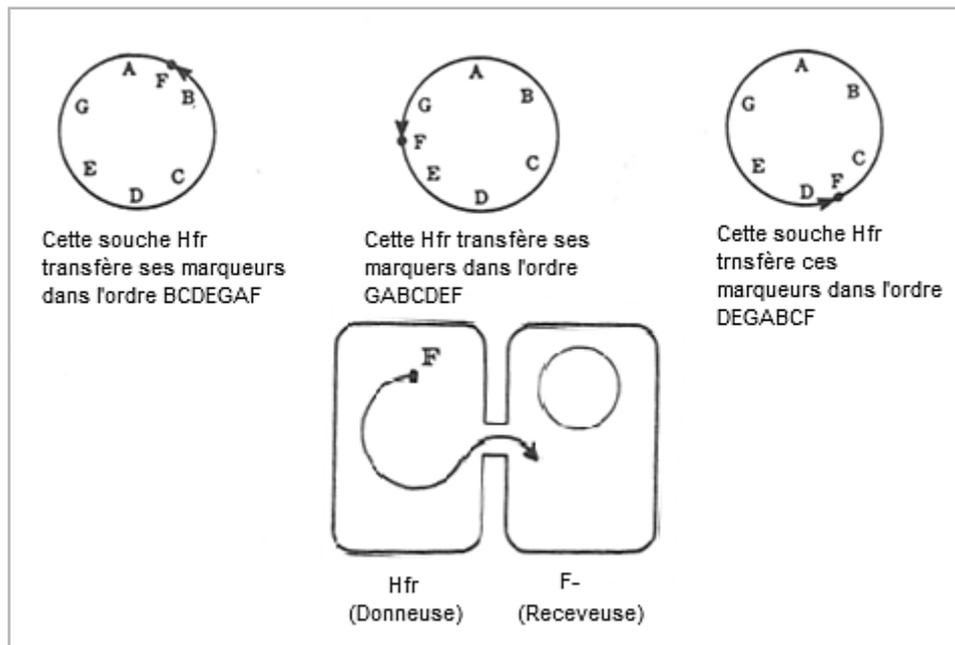


Figure 4.7 : Intégration du chromosome par conjugaison

IV.2.2.3 Transduction

Pour comprendre le mécanisme de transduction, il est nécessaire de bien connaître le cycle des bactériophages. Le système transducteur le mieux connu est celui de phage lambda (λ) et de son hôte *E. coli*, et celui du phage P22 et de son hôte *Salmonella typhimurium*. La **figure 4.8** représente le cycle lytique des phages virulent T-pairs (2, 4, 6) infectant *E. coli*.

Quand un virus infecte une cellule, deux mécanismes mutuellement exclusifs peuvent se produire : (1) ou bien ce virus se comporte comme un phage virulent et se reproduit végétativement (**cycle lytique**), (2) ou bien il se comporte comme un phage non virulent (tempéré) et s'intégrant dans le chromosome de la cellule hôte en tant que **prophage**, il se réplique alors en même temps que le chromosome bactérien. On dit qu'une cellule qui abrite un prophage est **lysogène** car l'ADN du prophage peut, dans certaines conditions (induction spontanée ou provoquée), se décrocher du chromosome bactérien et se reproduire végétativement en lisant la cellule hôte. Habituellement, les bactéries lysogènes ne se distinguent pas des cellules normales, si ce n'est par leur insensibilité aux infections phagiques de la même espèce que le prophage. Chez certaines bactéries lysogènes, on peut induire le relâchement de l'ADN phagique du chromosome bactérien par traitement aux ultraviolets (induction UV) ou par conjugaison (induction zygotique).

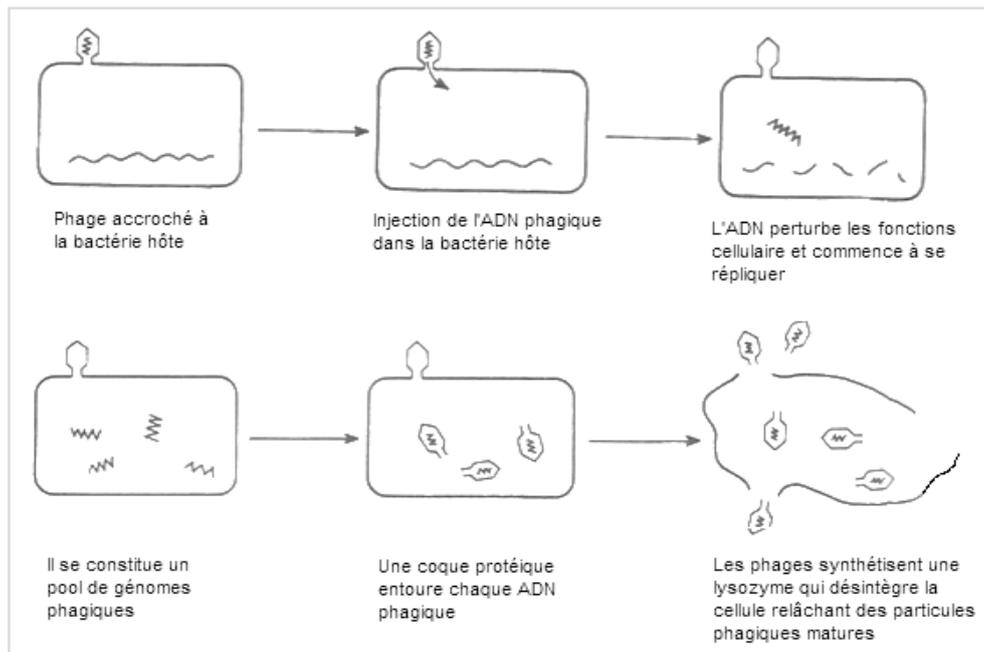


Figure 4.8 : Cycle des phages T-pairs.

Quand un prophage se décroche du chromosome bactérien, il peut emmener avec lui un petit segment adjacent de ce chromosome et laisser un fragment de son propre génome en compensation. Une telle particule phagique peut permettre le passage d'un gène bactérien ou d'une portion d'un gène d'une bactérie à une autre, dans un processus appelé **transduction**. Tous les phages transducteurs sont défectifs pour une portion de leur propre génome. Il existe deux grandes classes de phages transducteurs : les transducteurs généralisés et les transducteurs localisés.

Les **transducteurs généralisés** n'ont pas de site d'attachement spécifique sur le chromosome bactérien, ils peuvent s'accrocher n'importe où : ils ont donc une égale probabilité de transduire n'importe quel gène. Le fragment d'ADN transporté dans la coque est de la dimension du génome initial du phage. Si l'exogénote s'intègre dans le génome de la bactérie receveuse, on obtient un clone de cellules haploïdes recombinées. On parle alors de **transduction totale**. Si, par contre, l'exogénote ne s'intègre pas mais se maintient tout en ne se répliquant pas, on obtient un clone dans lequel une seule cellule est mérozygote (**transduction abortive**).

Les **transducteurs localisés** ne se produisent que pour les cellules qui possèdent un prophage intégré au niveau d'un locus spécifique du chromosome bactérien (locus dit « site d'attachement du prophage ». Seul le locus immédiatement adjacent au site phagique pourra être transduit. L'exemple le plus connu est celui du phage λ dans la souche E.coli K12. Le site d'intégration de λ est adjacent au gène bactérien contrôlant la fermentation du galactose (gal^+). Si on induit la lyse d'une souche gal^+ lysogène pour lambda à l'aide d'ultraviolets, quelques particules lambda (10^{-6}) porteront le gène gal^+ . Une particule transductrice lambda qui a « échangé » une partie de son propre génome pour le marqueur gal^+ est dite λdg (lambda galactose défectif) et, dès lors, n'est plus capable par elle-même de lyser une cellule hôte, ni de la lysogéniser. Si une souche bactérienne gal^- (contenant un prophage normal lambda) est exposée à un lysat contenant λdg , les rares transductants gal^+ deviennent des

hétérogénotes instables gal⁺/gal⁻ (double lysogénisation). Dans la transduction localisée, l'exogénote ne s'intègre pas au chromosome bactérien, mais il peut se répliquer en même temps que lui pour donner un clone d'hétérozygotes. Quand on induit la lyse de ces hétérogénotes grâce à l'activité d'un phage normal dit « helper », presque toutes les particules λ portent des gènes gal, ce qui réalise donc une haute fréquence de transduction (Hft).

Une partie phagique peut être lysogène (devenir prophage) si elle possède son génome entier mais un phage transducteur, déficient pour une partie de son propre génome, ne le peut pas. La lysogène et la transduction sont deux propriétés mutuellement exclusives pour une même particule phagique.

IV.3 Régulation génétique chez les bactéries

IV.3.1.1 Opéron lactose chez *E. coli*

Le sucre appelé lactose ne peut être utilisé tel quel comme source d'énergie chez *E. coli*, il doit d'abord être hydrolysé en glucose et galactose. Cette réaction est catalysée par la β-galactosidase, enzyme tétramérique composée de quatre sous-unités identiques de 135 000 daltons chacune (fig.4.9).

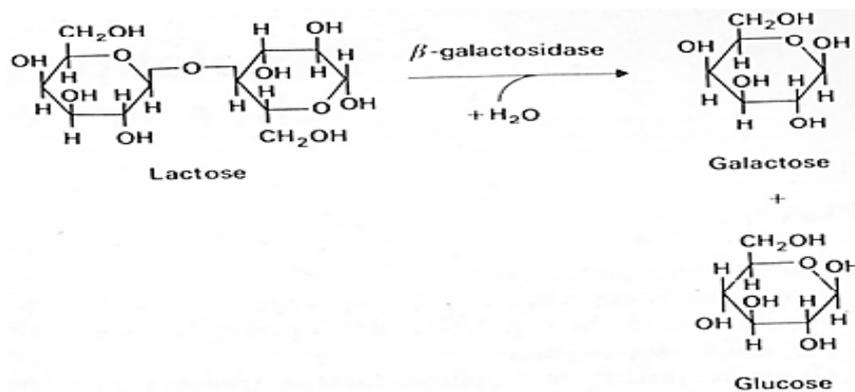


Figure 4.9 : Hydrolyse du lactose.

Dans une cellule de type sauvage cultivée sur un milieu dépourvu de lactose, il y a seulement un très petit nombre de molécules de β-galactosidase. Si la cellule est transférée dans un milieu contenant du lactose comme seule source de carbone et d'énergie, elle fabrique jusqu'à 3000 copies de cette enzyme. En d'autres termes on observe une induction de la synthèse de la β-galactosidase en réponse à la présence du lactose. Des travaux récents ont montré que le lactose n'était pas le véritable inducteur du système enzymatique, mais que le maximum d'induction est vraisemblablement obtenu en présence d'allolactose, formé à partir du lactose sous l'action des quelques molécules de β-galactosidase toujours présentes dans les cellules non induites (fig.4.10). Tant que le lactose est présent, le système demeure induit et le taux de β-galactosidase reste élevé, mais dès que la concentration du lactose chute, la quantité d'enzyme diminue rapidement. Cependant il ne s'agit pas d'un phénomène de tout ou rien : la quantité d'enzyme synthétisée est directement proportionnelle à la quantité d'inducteur présent (jusqu'à la quantité maximum observable dans la cellule pleinement induite) (fig.4.11).

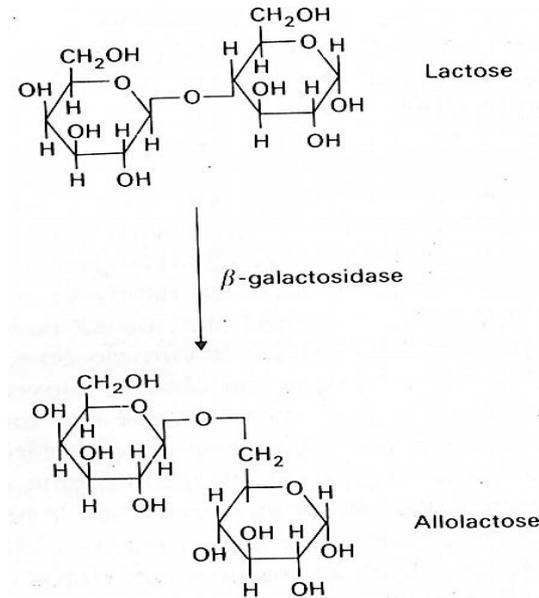


Figure 4.10 : Synthèse du véritable inducteur de l'opéron lactose.

L'addition de lactose au milieu de culture augmente non seulement la quantité de β -galactosidase mais aussi celle de la β -galactoside perméase et de la thiogalactoside transacétylase, deux enzymes dont la cellule a besoin pour dégrader le lactose.

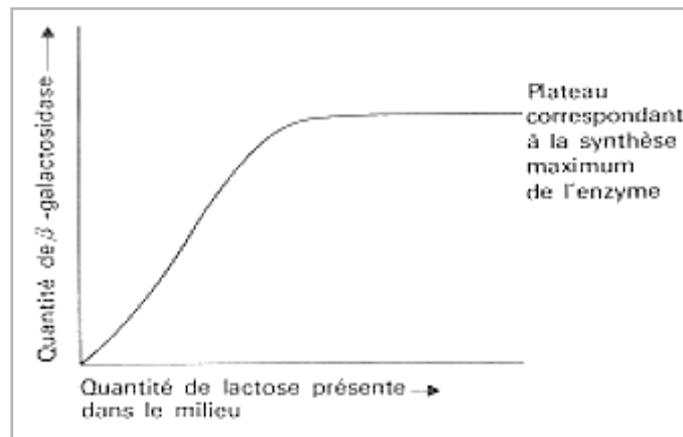


Figure 4.11 : Courbe de proportionnalité entre la quantité de β -galactosidase produite et la quantité du lactose présente dans le milieu de culture.

Des expériences génétiques ont montré que les gènes correspondant à ces trois protéines sont liés sur le chromosome et qu'ils sont adjacents à deux sites régulateurs, l'opérateur et le promoteur. A une courte distance se trouve le **gène i** qui code pour un répresseur des gènes impliqués dans la régulation du système. A partir de l'étude des propriétés phénotypique des mutants de régulation, F. Jacob et J. Monod ont proposé le modèle désormais classique de l'opéron, pour expliquer le contrôle de l'expression des gènes chez les bactéries.

D'abord il faut définir le terme d'opéron : c'est une unité génétique composée de gènes contigus qui fonctionnent de façon coordonnée sous le contrôle conjoint d'un opérateur et d'un répresseur.

On voit sur la **figure 4.12** un schéma de l'opéron lactose, montrant les sites régulateurs et le gène du répresseur, dans une souche sauvage cultivée en absence de lactose.

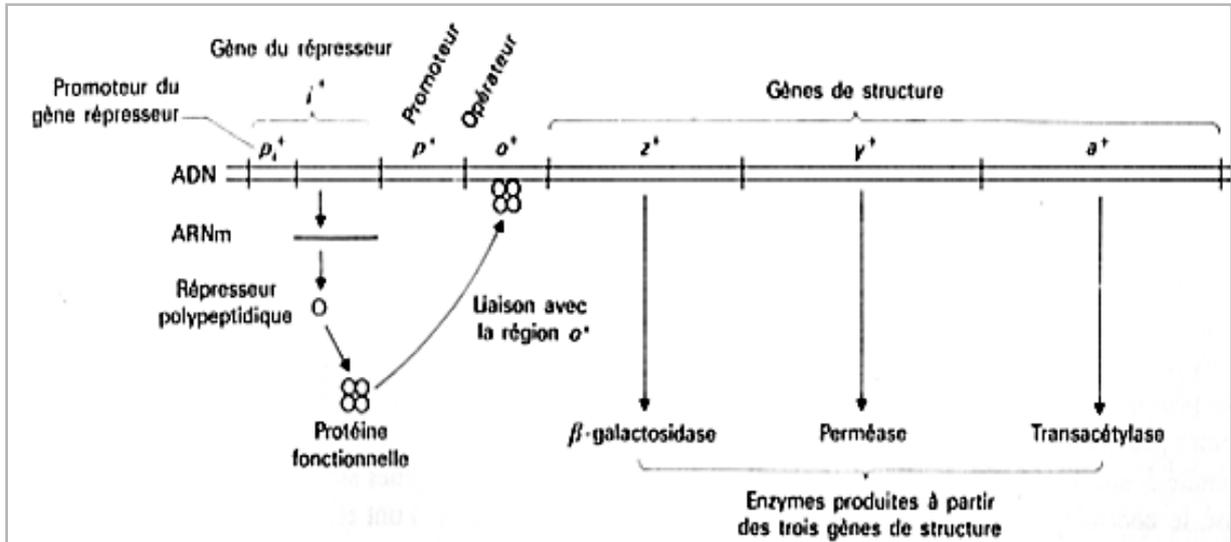


Figure 4.12 : Caractéristiques de l'organisation de l'opéron lactose.

Les gènes de structure z^+ , y^+ et a^+ codent respectivement pour la β -galactosidase, la perméase et la transacétylase. Des expériences génétiques portant sur des souches mutantes dépourvues d'une des activités enzymatiques ont montré que les trois gènes étaient adjacents sur le chromosome. Le gène i (ou gène de répresseur) code pour une protéine appelée répresseur. Ce gène est constitutif ce qui veut dire qu'il synthétise son produit que l'inducteur soit présent ou non. Le contrôle de la quantité d'enzyme synthétisée est fonction de la vitesse à laquelle l'ARN polymérase se fixe sur le promoteur du gène i (p_i^+) et initie la transcription de l'ARN messager du répresseur. La traduction du messenger produit un polypeptide qui s'agrège en tétramère pour former le répresseur actif. Si la cellule pousse dans un milieu dépourvu de lactose, le répresseur s'associe à la région de l'opérateur (o^+) localisée à côté du gène z^+ . Quand le complexe est formé, l'ARN polymérase ne peut plus s'associer à la région du promoteur des gènes de structure, ce qui empêche la transcription de ces derniers.

Quand on transfère les cellules dans un milieu contenant du lactose comme seule source de carbone, le lactose est transporté à l'intérieur de la cellule grâce aux quelques molécules de perméase toujours présentes. Dans la cellule le lactose est converti en allolactose par la β -galactosidase. L'inducteur s'associe au répresseur mole à mole, ce qui provoque un changement conformationnel de celui-ci et lui fait perdre son affinité pour l'ADN. Le répresseur se détache donc de l'opérateur et libère le site pour l'ARN polymérase qui peut alors transcrire les gènes de structure z , y et a en une molécule d'ARNm unique polycistronique. Cet ARNm est traduit par les ribosomes qui se fixent à l'extrémité 5' correspondant au début du gène z et se déplacent le long de la molécule en direction de l'extrémité 3'. La β -galactosidase est synthétisée d'abord, puis le ribosome dépasse le codon

d'arrêt et continue de progresser. Il reconnaît la séquence d'initiation du gène de la perméase et commence à la traduire. A la fin du message le processus de franchissement du codon de terminaison se répète et le ribosome traduit la transacétylase.

On peut donc retenir comme principe que les ribosomes peuvent seulement initier la traduction à l'extrémité 5' sur un ARNm polycistronique. Ceci rend aisé le contrôle de la coordination de la synthèse des protéines qui participent à la même fonction physiologique. Les ribosomes sont incapables de se lier à l'ARNm et d'initier la traduction au niveau des codons de départ spécifiques de la transacétylase et de la perméase, probablement parce que la séquence d'initiation correcte ou complète n'existe qu'à l'extrémité 5' de l'ARNm. Le modèle est résumé sur la figure 4.13. Tant que le lactose est présent en quantité suffisante pour s'associer au répresseur, l'opéron est transcrit et les trois enzymes traduites.

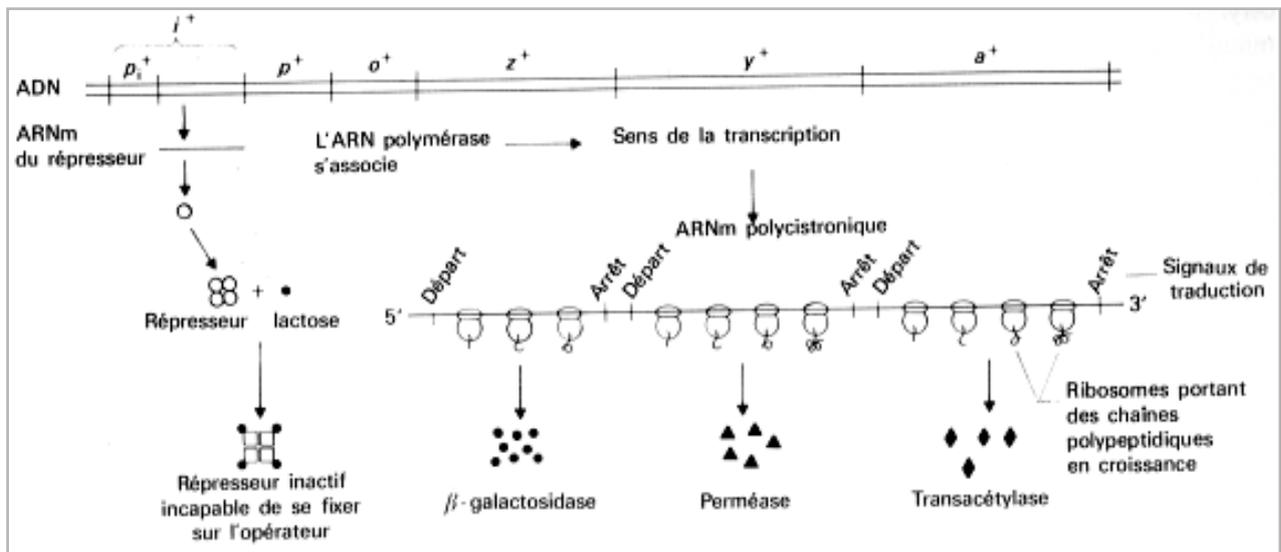


Figure 4.13 : Induction de l'opéron lactose chez *E. coli* de type sauvage en présence de lactose.

IV.3.1.2 Opéron tryptophane d'*E. coli*

C'est un exemple d'opéron gouvernant une voie de biosynthèse dont le fonctionnement peut être réprimé. Il est régulé grosso-modo selon le schéma établi par Jacob et Monod. Le tryptophane est un acide aminé qui entre dans la composition des protéines. En l'absence de tryptophane dans le milieu de culture la bactérie synthétise les enzymes nécessaires à sa biosynthèse ; par contre en présence de tryptophane dans le milieu, l'expression des gènes codant pour ces enzymes est réprimée. Ceci est aisément compréhensible en termes de coût énergétique. La plupart des opérons responsables de la biosynthèse d'un composé sont répressibles, alors que ceux qui sont impliqués dans la dégradation d'un produit (par exemple une source carbonée) sont en général inductibles. Les opérons répressibles possèdent un gène régulateur qui code pour un apo-répresseur inactif, incapable de se fixer sur l'opérateur. Le produit final de la voie de biosynthèse ou un de ses dérivés (par exemple l'ARNt chargé de l'acide aminé) intervient comme co-répresseur (et non comme inducteur) et, en se combinant avec l'apo-répresseur protéique, donne naissance à un répresseur actif capable de se fixer sur l'opérateur et de bloquer la transcription. Les caractéristiques générales d'un opéron répressible sont schématisées sur la **figure 4.14**.

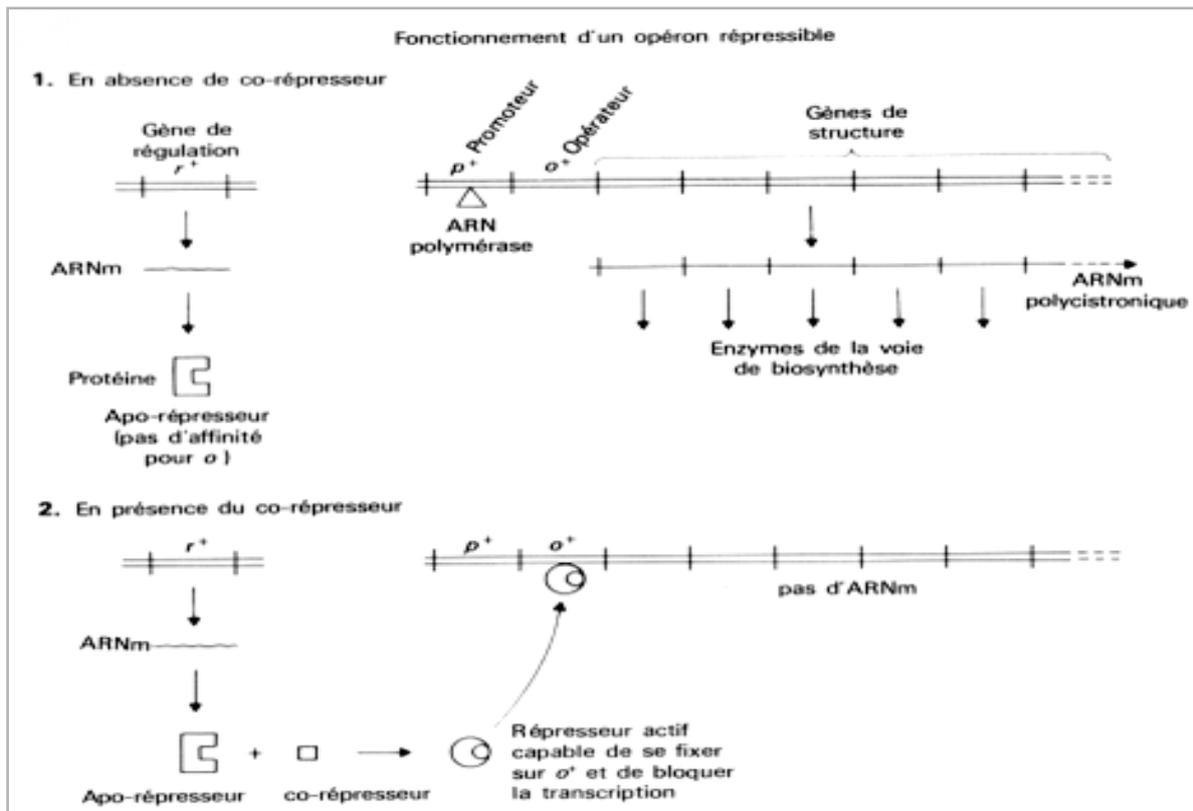


Figure 4.14 : Schéma général du principe de fonctionnement d'un opéron répressible chez une bactérie.

Ce type de régulation est à l'œuvre dans le cas de l'opéron tryptophane, bien que celui-ci présente quelques variations supplémentaires intéressantes, comme l'ont montré essentiellement C. Yanofsky et ses collaborateurs.

L'opéron tryptophane de *E. coli* est représenté sur la figure 4.15 à l'échelle des longueurs estimées des gènes de structure et des autres régions de l'ADN. On trouve dans cet opéron, deux promoteurs p_1 et p_2 , le premier est adjacent à l'opérateur (o) et le second, placé à la fin du cistron $trpD$ joue le rôle de promoteur interne avec une faible efficacité. Le fonctionnement de l'opéron est contrôlé par une protéine, l'apo-répresseur, produit polypeptidique du gène $trpR$. En présence de tryptophane dans le milieu, le répresseur se complexe avec le L-tryptophane et se fixe sur la région opératrice, ce qui réprime la transcription du message en empêchant l'ARN polymérase de se fixer sur le promoteur p_1 .

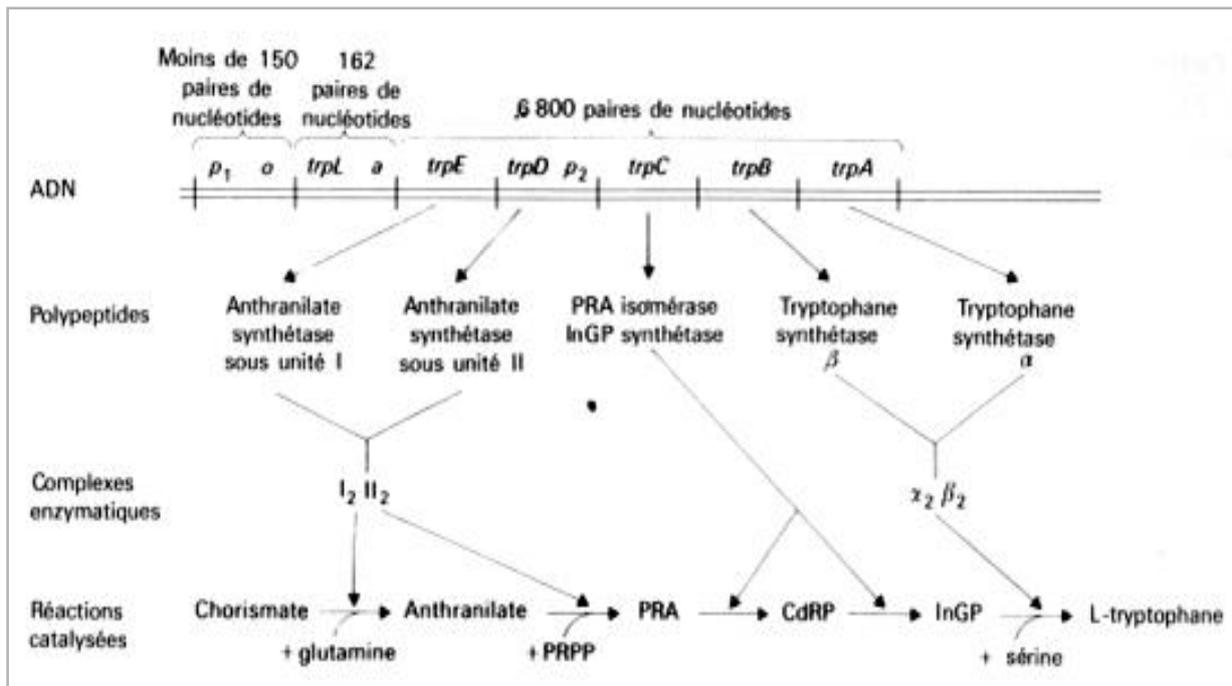


Figure 4.15 : L'opéron tryptophane chez *E. coli*.

En absence de tryptophane, l'opéron n'est pas réprimé et la transcription de l'ARNm polycistronique transcrit à partir de l'opéron contient une séquence guide de 162 nucléotides par la région $trpL$. Cette séquence guide précède le codon d'initiation du polypeptide codé par $trpE$. Une courte molécule d'ARN, qui contient seulement les 142 premiers nucléotides de l'ARNm tryptophane est également transcrite. Cette molécule est issue de la terminaison de la transcription au niveau de l'atténuateur (a sur la figure 4.15), site régulateur situé dans la région guide de l'opéron. L'atténuateur joue un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes de structure de l'opéron tryptophane.

L'existence de la séquence guide fut démontrée en déterminant la séquence du segment du côté du segment 5' de l'ARNm de l'opéron trp , synthétisé aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Des délétions internes dans l'opéron tryptophane s'étendant entre p_1 et un des gènes de structure et couvrant environ 130 nucléotides de la séquence guide provoquent en général une augmentation de l'expression génétique de l'opéron. Par ailleurs, des délétions internes qui laissent intacte la séquence guide ne produisent pas cet effet. Ceci indique qu'il existe un site, appelé atténuateur, qui limite normalement l'expression de l'opéron.

Ceci n'est pas propre à l'opéron tryptophane, on le rencontre chez un certain nombre d'autres opérons, par exemple celui de l'histidine de *E. coli*. Des expériences d'hybridation quantitative font apparaître un rapport de 10 à 1 entre le nombre de copies de l'ARNm guide et de l'ARNm des gènes de structure. Ceci étaye l'hypothèse de l'atténuateur. Comme on trouve des molécules d'ARN transcrit, longues de 142 nucléotides, cela signifie que l'atténuateur doit se situer dans cette position dans la séquence guide sur l'ADN. Avec un système de transcription *in vitro*, on a montré que l'ARN polymérase terminait la transcription dans la région de l'atténuateur.

Comment ce système fonctionne-t-il ? Quand l'opéron est réprimé (parce que les cellules sont cultivées en présence d'un excès de tryptophane) l'atténuateur fonctionne au maximum,

pour empêcher la transcription des gènes distaux, en amplifiant l'effet de l'interaction répresseur-opérateur d'environ 10 fois. La terminaison de la transcription sur l'atténuateur est régulée par des changements dans la concentration des molécules d'ARNt chargées par le tryptophane. Plus elle est élevée moins la transcription peut dépasser le site atténuateur. Quand elle est faible, la répression est levée et l'atténuation se relâche. Dans des conditions de manque extrême en tryptophane, l'atténuation est complètement supprimée. Il semble donc que le rôle de l'atténuateur soit d'élargir l'éventail de l'expression de l'opéron, au-delà des possibilités intrinsèques de l'interaction répresseur-opérateur. Le mécanisme de contrôle par l'atténuateur n'est pas encore complètement compris bien qu'on pense que la capacité de traduction et la structure secondaire de l'ARN guide joue un rôle essentiel dans ce processus, comme l'a montré l'étude génétique de certains mutants, la séquence de cet ARN et des expériences de transcription *in vitro*. Plus particulièrement on a mis en évidence l'existence de deux codons tryptophane (UGG) adjacents, proches du codon de terminaison (UGA) de l'ARNm guide. Entre le codon UGA et le site atténuateur (à environ 142 nucléotides sur la séquence guide de l'ARN) la séquence nucléotidique peut former des structures secondaires variées par formation de ponts hydrogène entre les bases. Dès que l'ARN polymérase a synthétisé cette partie, la molécule d'ARNm peut se replier. L'ARN guide commence à être traduit par les ribosomes tandis que la transcription continue et on pense que les ribosomes suivent de très près l'ARN polymérase.

En présence d'un excès de tryptophane, le ribosome lit les deux codons tryptophane et parvient au niveau du codon UGA, adjacent à l'ARN replié. Dans ce cas la position du ribosome entraîne la formation d'un appariement particulier entre les nucléotides de l'ARN replié qui affecte à son tour la combinaison entre l'ARN polymérase et l'ADN. Il en résulte un arrêt de la transcription au niveau de l'atténuateur. A l'inverse, quand le tryptophane fait défaut, les molécules d'ARNt^{trp} restent non chargées et le ribosome s'arrête sur les deux codons adjacents du tryptophane. Dans ce cas on pense qu'un appariement favorable des nucléotides intervient au niveau de l'ARN replié, l'ARN polymérase peut continuer sa route, dépasser la région de l'atténuateur et poursuivre la transcription jusqu'aux gènes de structure. Nous sommes en présence ici d'un bon modèle expérimental pour expliquer comment la transcription d'un segment d'ADN en ARN peut être contrôlée par la longueur de la portion déjà traduite de ce même ARN. Il semble que ce modèle soit applicable à d'autres opérons bactériens munis d'une région atténuatrice.

Pour terminer, disons que l'étude des mutants portant des délétions internes a montré l'existence d'un promoteur p₂ à l'intérieur du gène *trpD* dans le segment distal du gène par rapport à l'opérateur. L'efficacité de ce promoteur est faible seulement quelques % de celle de p₁ et il ne semble pas sujet à la répression par le tryptophane. Son rôle physiologique est inconnu.

V. Chapitre V : Méthodes d'identification et culture des bactéries

V.1 Principes de l'identification bactérienne

En microbiologie clinique ou alimentaire, on est souvent amené à identifier une souche microbienne responsable d'une maladie infectieuse, d'une intoxication ou d'une contamination. Il est possible d'identifier des bactéries, des moisissures, des levures, des protozoaires, voire des virus, des toxines bactériennes, des mycotoxines ou des prions, mais l'analyse bactériologique demeure la plus répandue. La caractérisation des espèces bactérienne est souvent nécessaire pour pouvoir adapter les mesures à suivre face à une toxoinfection ou à une contamination : choix du traitement à prescrire, choix de l'antibiotique, déclaration obligatoire pour certaines maladies, révision de l'hygiène et des bonnes pratiques de fabrication, interdiction de la commercialisation de l'aliment...

L'identification peut se faire à partir de divers milieux organiques d'origine humaine : sang, liquide céphalo-rachidien, fragment de tissu (biopsie), selles, urines... afin de déterminer un agent infectieux. Elle peut aussi être pratiquée sur des aliments, à partir de milieux d'origine animale ou végétale plutôt liquides (lait, jus de fruits, eau minérale, œuf frais, yaourt...) ou plutôt solides (viande, poisson, plats cuisinés, crudités, légumes en conserve...) afin de déterminer un agent contaminant. Il est possible également d'identifier la flore présente à la surface de matériaux inertes (outils, équipements, supports de travail).

L'identification précise d'une souche bactérienne ne peut se faire, le plus souvent, qu'à partir de cultures pures (et non avec des mélanges bactériennes). La phase préliminaire consiste donc à isoler physiquement les espèces les unes des autres. Il existe diverses techniques à cet égard. L'isolement des diverses souches peut parfois être suivi d'une remise en culture de celles qui nous intéressent. A partir de cultures pures, de multiples techniques d'analyses peuvent être pratiquées afin d'étudier les caractères morphologiques (microscopiques et culturaux), biochimiques et physiologiques. Les premières analyses permettent au départ d'orienter et de préciser les analyses à poursuivre afin de permettre (dans une seconde phase) l'identification de l'espèce bactérienne. Pour des identifications plus poussées ou plus sensibles, relatives à un sérotype ou à un génotype donné, il convient d'utiliser d'autres techniques exploitant le profil antigénique ou génomique de la bactérie.

V.1.1 Etude des caractères morphologiques

V.1.1.1 Cultures bactériennes

Les micro-organismes prolifèrent dans des conditions nutritionnelles et physico-chimiques spécifiques. Le milieu de croissance doit pouvoir apporter tous les éléments édificateurs et énergétiques dont les bactéries ont besoin pour leur division et doit correspondre à leur exigence vis-à-vis du pH, de la température, de l'oxygène et de l'humidité (eau libre). Ces conditions sont retrouvées *in vivo* dans leur milieu naturel de prédilection (humus, aliment, chyme colique, peau, tissus animaux ou végétaux...). Elles peuvent être aussi artificiellement reconstituées *in vitro* : on parle alors de **cultures**. La plupart des micro-organismes pathogènes ou alimentaires sont des bactéries chimio-hétérotrophes qui utilisent des molécules organiques comme sources de carbone et d'énergie.

La mise en culture de micro-organismes doit répondre à ces besoins nutritionnels, en élaborant des milieux favorables à la croissance des espèces qu'on souhaite cultiver. Il existe

une grande diversité de milieux destinés à la culture de micro-organismes en laboratoire. On peut se procurer la majorité d'entre eux dans le commerce sous la forme de mélanges auxquels on doit ajouter de l'eau et que l'on doit ensuite stériliser.

Les **milieux liquides** sont fort utiles mais, lorsqu'il est préférable de faire croître des bactéries sur un **milieu solide**, on ajoute un agent de solidification tel que l'**agar-agar**, aussi appelé simplement **agar**. L'agar-agar est un polysaccharide extrait d'une algue marine. Très peu de micro-organismes sont capables de le dégrader, de sorte que l'agar reste solide. L'agar forme avec l'eau un gel solide à une température inférieure à environ 60° C, il se liquéfie à environ 100°C.

En laboratoire, on conserve la gélose préparée dans un bain-marie maintenu à 50°C car à cette température on peut soit la verser dans une boîte de Petri, soit la verser directement sur des bactéries qui tolèrent bien la chaleur. Une fois qu'elle s'est solidifiée, il est possible d'incuber la gélose à des températures atteignant près de 100°C sans qu'elle se liquéfie de nouveau.

En générale on place un milieu contenant de l'agar dans une éprouvette ou dans une boîte de Petri. La gélose est dite inclinée si elle s'est solidifiée lorsque l'éprouvette était maintenue en position inclinée de manière à agrandir la surface de croissance ; elle est dite profonde lorsque l'éprouvette est maintenue en position verticale et que le contenu se solidifie. Selon la quantité d'agar ajoutée les milieux peuvent être solides ou semi-solides (gélouses molles).

- **Milieux synthétiques**

On appelle milieu synthétique (chemically defined medium) un milieu de culture dont on connaît exactement la composition chimique, qualitativement et quantitativement. Pour répondre aux besoins nutritifs d'une bactérie chimiohétérotrophe, un milieu synthétique contiendra une quantité connue de facteurs organiques de croissance, qui servent de sources d'énergie et de carbone.

- **Milieux complexes**

La majorité des bactéries hétérotrophes (qui utilisent les composés chimiques comme sources de carbone) est mise en culture dans des milieux naturels appelés milieux complexes ou milieux empiriques. Les milieux complexes sont constitués de nutriments tels que des extraits de levure, de viande ou de plantes, ou de macérations de protéines contenues dans ces extraits ou d'autres sources. Ils contiennent donc des ingrédients dont la composition chimique est indéterminée.

Dans un milieu de culture complexe, ce sont essentiellement les protéines qui fournissent aux micro-organismes l'énergie, le carbone, l'azote et le soufre dont ils ont besoin pour leur croissance.

Les vitamines et d'autres facteurs organiques de croissance sont fournis par les extraits de viande ou de levure. Les extraits fournissent aussi l'azote organique et des composés du carbone. Les extraits de levure sont particulièrement riches en vitamine B. Les milieux

complexes sont de composition et de préparation assez simples et contiennent une même base nutritive.

- Milieux sélectifs

Milieux conçus pour inhiber la croissance des bactéries indésirables et stimuler celle des microbes recherchés. Par exemple, une gélose au sulfite de bismuth constitue un milieu approprié pour extraire de fèces (selles) la bactérie à Gram négatif responsable de la typhoïde, *Salmonella typhi*. Le sulfite de bismuth inhibe la croissance des bactéries à Gram positif, de même que celle de la majorité des bactéries intestinales à Gram négatif autres que *S.typhi*.

- Milieux différentiels

Conçus pour faciliter la distinction entre les colonies du microbe recherché et les autres colonies qui se développent sur la même boîte de Petri. De plus, les cultures pures de micro-organismes ont les réactions caractéristiques reconnaissables sur les milieux différentiels en éprouvette ou sur boîte de Petri. Les microbiologistes utilisent souvent comme milieu la gélose au sang (qui contient des érythrocytes) pour identifier les espèces bactériennes qui détruisent les érythrocytes.

La gélose de Mac Conkey est à la fois un milieu sélectif et un milieu différentiel. Elle contient des sels biliaires et du violet de cristal, qui inhibent le développement des bactéries à Gram positif. Comme ce milieu contient en outre du lactose, il permet de distinguer les bactéries à Gram négatif qui peuvent croître sur le lactose de celles qui en sont incapables. Les bactéries qui fermentent le lactose forment des colonies rouges ou roses, les bactéries qui ne le fermentent pas forment des colonies incolores.

- Milieux d'enrichissement

Etant donné qu'un petit nombre de bactéries peut facilement passer inaperçu, surtout si d'autres bactéries sont présentes en beaucoup plus grand nombre, il est parfois nécessaire d'utiliser un milieu d'enrichissement. C'est souvent le cas pour les échantillons de sol ou de fèces. Un milieu d'enrichissement est d'ordinaire liquide, et il fournit des nutriments et des conditions favorables à la croissance d'un seul microbe donné. En ce sens, il s'agit aussi d'un milieu sélectif, mais il est conçu pour favoriser la multiplication du micro-organisme recherché, initialement présent en très petit nombre, de manière qu'il forme des colonies observables sur une gélose.

Lorsque les cultures sur des milieux différentiels et sélectifs ont permis de mettre en évidence la croissance d'une espèce pathogène, il faut encore procéder à une identification précise. Les milieux d'identification sont alors utiles parce qu'ils servent à mettre en évidence des particularités biochimiques et métaboliques spécifiques.

- Milieux des anaérobies

La culture des bactéries anaérobies pose un problème particulier. Puisque les anaérobies peuvent être tués du fait de la présence de molécules d'oxygène, on doit utiliser un **milieu réducteur**. Les milieux de ce type contiennent des ingrédients, tel que le thioglycolate de sodium, qui réagissent avec les molécules d'oxygène dissoutes et éliminent

ainsi celles-ci du milieu de culture. Pour obtenir des cultures pures d'anaérobies stricts et les conserver, les microbiologistes emploient souvent des milieux réducteurs entreposés dans des éprouvettes ordinaires hermétiquement fermés. Ils réchauffent légèrement les éprouvettes juste avant de s'en servir, de manière à éliminer toutes les molécules d'oxygène qui auraient pu y pénétrer.

- Milieu de transport

Un milieu de transport sert à l'expédition ou au stockage temporaire de matériel (tel qu'un prélèvement) qui sera examiné ultérieurement pour la présence de certains organismes. La fonction principale du milieu est de maintenir ces organismes en vie, au cas où ils seraient présents. Il n'est pas nécessaire qu'un milieu de transport permette la croissance. En fait, celle-ci peut être un désavantage puisque les déchets formés sont susceptibles d'avoir un effet défavorable sur la survie des organismes. Le milieu de transport de Stuart est un de ces milieux ; il convient pour toute une gamme de bactéries anaérobies et pour des organismes « fragiles », comme *Neisseria gonorrhoeae*.

V.1.1.2 Méthodes d'inoculation

- Inoculation d'un milieu liquide

Pour inoculer un milieu liquide avec un inoculum *liquide*, on trempe simplement la boucle (ou le fil droit) portant l'inoculum, dans le milieu ; on l'agite un peu, puis on la retire. L'inoculation peut aussi s'effectuer au moyen d'une pipette Pasteur. Pour un inoculum *solide*, on frotte légèrement la boucle ou le fil droit contre la paroi intérieure du récipient pour s'assurer qu'une partie au moins de l'inoculum soit abandonnée quand on retire l'instrument.

- Inoculation d'un milieu solide

Les milieux solides peuvent être inoculés de diverses manières, en fonction du but poursuivi.

On recourt à **l'ensemencement en stries ou striation** quand on veut obtenir des colonies distinctes, bien séparées l'une de l'autre, et qu'on sait que l'inoculum (liquide ou solide) contient un grand nombre de cellules. Dans cette méthode, l'inoculum est progressivement « épuisé » de telle sorte que, sur une partie au moins de la surface de la boîte, des cellules soient déposées individuellement et bien séparées. On arrive habituellement à ce résultat dans la troisième, quatrième ou cinquième série de stries (**fig.5.1**). A l'incubation, chacune de ces cellules isolées donne naissance à une colonie distincte.

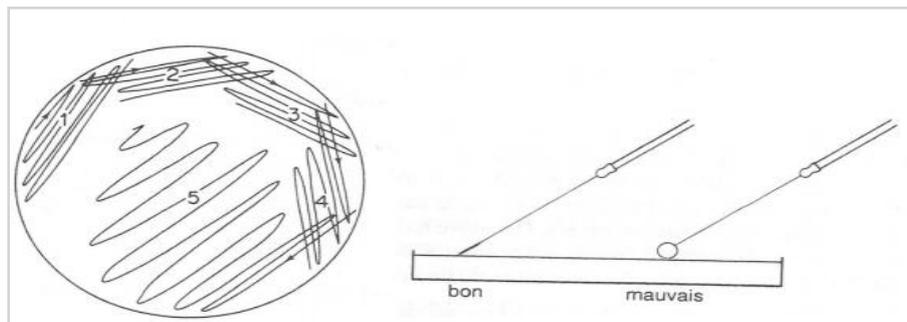


Figure 5.1 : Striation : inoculation d'une boîte pour obtenir des colonies isolées.

La **piqûre en gélose profonde** consiste à ensemer un milieu solide, par exemple, le fond d'une pente en plongeant le fil droit, verticalement dans le milieu. L'inoculum (à la pointe du fil) est ainsi distribué tout le long du trajet dans la gélose. On utilise ce procédé pour inoculer en profondeur les zones microaérobies ou anaérobies du milieu.

Un **étalement sur boîte** consiste à étaler un petit volume d'inoculum liquide (0,05 à 0,1 ml par exemple) à la surface du milieu solide au moyen d'une tige de verre stérile en forme de L (un « étaloir »).

On peut encore ensemer une boîte de Petri en inondant la surface de la gélose avec un inoculum liquide dont l'excès est enlevé à la pipette Pasteur stérile.

Dans ce dernier procédé et dans l'étalement, si l'inoculum contient suffisamment de cellules, l'incubation fait apparaître un gazon bactérien : couche de croissance confluyente qui recouvre toute la surface du milieu.

La boîte peut aussi être inoculée au moyen d'un **écouvillon** : petite boule d'ouate compacte, bien fixée à l'extrémité d'une mince tige de bois, de plastique ou de métal. On utilise un écouvillon stérile pour prélever un échantillon à un endroit donné (dans la gorge, par exemple). Une fois chargé, l'écouvillon est promené délicatement sur toute la surface d'une boîte d'un milieu adéquat, en veillant à ce que tous les côtés de la boule d'ouate soient mis en contact avec le milieu. On peut ainsi inoculer toute la surface de la boîte ou se contenter d'une petite zone périphérique d'où l'inoculum est ensuite répandu par striation.

V.1.1.3 Préparation d'une culture pure à partir d'un mélange d'organismes

Pour illustrer quelques-unes des techniques bactériologiques de base, nous allons décrire une méthode courante : l'isolement d'une souche ou d'une espèce particulière à partir d'un mélange d'organismes. Le texte qui suit détaille l'isolement d'*E. coli* à partir d'un échantillon d'eau d'égout, où l'on trouve habituellement toute une variété d'organismes entériques et non entériques.

Une boîte de gélose de MacConkey est striée avec une boucle chargée d'eau d'égout, puis mise à incuber pendant 18-24 heures, à 37 °C. On incube les boîtes, fond vers le haut. Si elles sont placées normalement, la vapeur d'eau du milieu peut se condenser à la face intérieure du couvercle et goutter sur le milieu, d'où une perturbation possible de la striation. Lors de l'incubation, chaque cellule isolée (de toute espèce capable de croître sur le milieu) donnera naissance à une colonie distincte. Après 18 à 24 heures sur la gélose de MacConkey, *E. coli* donne des colonies rouges, rondes, d'un diamètre de 2 à 3 mm environ. Mais toutes les colonies qui ont cet aspect ne sont pas nécessairement des colonies d'*E. coli*. L'étape suivante consiste à choisir plusieurs de ces colonies pour un autre examen. Puisqu'*E. coli* est très commun dans les eaux d'égout, il est vraisemblable qu'au moins l'une des colonies sélectionnées provienne de cet organisme.

Avant d'essayer la moindre identification, il faut s'assurer que dans chacune des colonies sélectionnées, toutes les cellules sont de la même espèce. Il est toujours possible qu'une colonie — même bien isolée — contienne des cellules de deux espèces différentes. Ceci peut arriver si, au cours de la striation, deux cellules différentes se sont déposées (par hasard) au même endroit à la surface de la gélose. Pour lever ce doute, on repique chaque colonie. Le

repiquage consiste à transférer des cellules d'une culture ou d'une colonie développée, dans un milieu stérile frais. Pour repiquer une colonie donnée, on en touche légèrement la surface avec une boucle stérile. Une petite quantité de cellules de la colonie adhère ainsi à la boucle et peut être déposée par striation sur une boîte de gélose de MacConkey. Certaines bactéries forment de très petites colonies et dans de tels cas, il est souvent plus facile d'effectuer le repiquage en touchant la surface de la colonie avec l'extrémité d'un fil droit. L'inoculum (sur le fil droit) est alors transféré sur un milieu frais, où il est dispersé en stries au moyen d'une boucle stérile. Les boîtes inoculées à partir d'une seule colonie sont alors incubées. Si chacune des colonies rouges ne contenait qu'une seule espèce, nous aurions maintenant plusieurs cultures pures — dont au moins une serait faite d'*E. coli*. Chaque culture pure peut alors être identifiée.

V.1.1.4 Conservation d'une culture bactérienne

La réfrigération permet de conserver des cultures bactériennes pendant un court laps de temps, mais les deux méthodes les plus courantes pour la conservation durant une longue période sont la surgélation et la lyophilisation. La **surgélation** consiste à placer une culture microbienne pure dans un liquide en suspension et à la refroidir rapidement à des températures variant de -50 à -95°C . Ce traitement permet d'ordinaire de décongeler, la culture et de la faire croître, même au bout de plusieurs années. La **lyophilisation**, ou cryodéshydratation, consiste à congeler rapidement une suspension de microbes à des températures allant de -54 à -72°C tout en éliminant l'eau par la création d'un vide poussé (processus de sublimation). Le récipient est scellé alors qu'il est encore sous vide au moyen d'une torche à haute température. Le produit qui contient les microbes ayant survécu est entreposé sous forme de poudre, et il peut être conservé pendant les années. Il est possible en tout temps de ranimer les micro-organismes par hydratation avec un milieu nutritif liquide approprié.

V.1.1.5 Observations macroscopiques

On peut observer les cultures bactériennes en milieu solide ou liquide. En milieu gélosé, une bactérie isolée qui se multiplie donnera naissance à une **colonie** visible à l'œil nu. En milieu liquide, le développement bactérien se traduira par un **trouble**, également visible à l'œil nu. En fonction de la composition du milieu de culture et de la manière dont les germes sont cultivés (en surface ou en profondeur), on peut ainsi déterminer :

- **L'aspect des colonies bactériennes** : taille, brillance, texture, contour, couleur, opacité, relief. Cette observation peut apporter certains éléments pour identifier une espèce. L'aspect peut varier en fonction du milieu utilisé et de l'ensemencement réalisé (en profondeur, en surface) ;
- **Le type respiratoire** : aérobic strict, anaérobic strict, micro aérophile, aéro-anaérobic facultatif. Pour cela, on ensemence un tube droit, contenant une gélose riche (milieu viande-foie) maintenue à l'état liquide (surfusion), avec la suspension bactérienne à analyser. Après croissance à température idéale (pendant 24h) on observe l'apparition d'un trouble (ou de colonies dispersées) qui se développe dans la masse à un niveau caractéristique du tube (les aérobies se trouvent en surface, les anaérobies en profondeur, les aéro-anaérobies facultatifs sur toute la hauteur) ;

- La **résistance aux antibiotiques** : elle peut être mise en évidence par la technique de l'**antibiogramme**. Pour cela, on dépose une goutte d'antibiotique sur une pastille de papier absorbant stérile qu'on dépose sur une gélose nutritive solide (milieu de base de type Mueller- Hinton) dans lequel on a préalablement incorporé les bactéries (technique de Kirby-Bauer). L'antibiotique diffuse dans la gélose et empêche la croissance bactérienne tout autour de la pastille, ce qui se traduit par une absence de trouble. Plus la surface d'inhibition est large, plus l'espèce testée est sensible à l'antibiotique. On teste généralement plusieurs antibiotiques sur une même boîte ;
 - Les **substrats carbonés consommés** : les bactéries sont capables d'utiliser une ou plusieurs sources d'énergie et de carbone (glucides souvent). Cette capacité nutritionnelle peut être mise en évidence par la technique de l'**auxanogramme** (fig.5.2). Les bactéries sont incluses dans la gélose (milieu synthétique sans source de carbone et d'énergie). On dépose une goutte de solution de glucides sur une pastille de papier absorbant stérile.
- Après croissance, on observe un trouble autour du disque signifiant l'utilisation du sucre déposé. On teste généralement plusieurs glucides sur une même boîte.

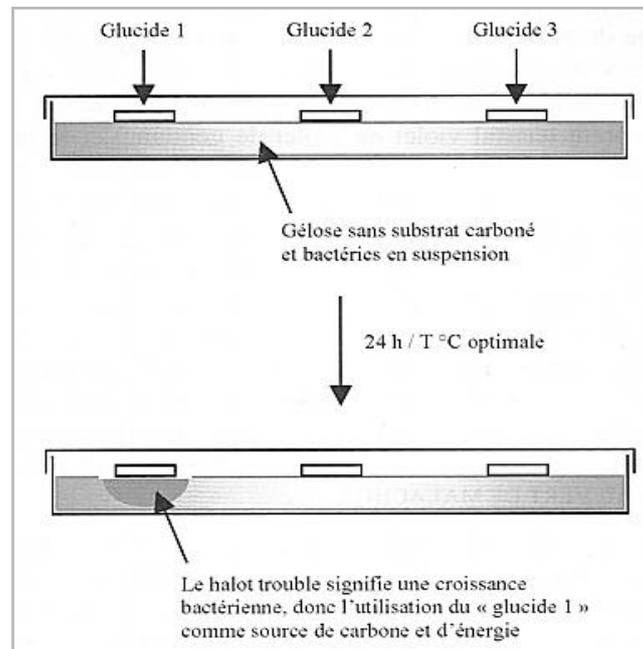


Figure 5.2 : Technique de l'auxanogramme.

V.1.1.6 Observations microscopiques - colorations

Il est possible d'observer l'aspect des bactéries au microscope et d'identifier certaines structures cellulaires caractéristiques d'une espèce. On distingue :

- **L'observation « à l'état frais »** (les bactéries sont vivantes). En disposant une goutte de suspension bactérienne sur une lame microscopique, il est possible de déterminer la morphologie bactérienne (bacille, coccobacille, coque, vibrion), la longueur et l'épaisseur du germe (long bacille fin, petit coccobacille trapu, gros bacille), le mode de groupement (germes isolés ou associés par paires, en grappes ou en chaînettes) et parfois le déplacement (bactéries mobiles). Le contraste peut être amélioré avec du bleu de méthylène ;

- **L'observation après coloration** (les bactéries sont mortes). Après avoir disposé une goutte de suspension bactérienne sur une lame microscopique et fixé les bactéries au support (par simple séchage par exemple), on peut colorer les bactéries par différentes techniques.

-

- **Coloration de Gram**

Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de cristal ; il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante, traité pendant une minute par la solution de Lugol (solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium) et de nouveau rincé rapidement. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec un solvant comme l'éthanol (95 %), l'acétone ou l'acétone iodée. Il s'agit là de l'étape critique : la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 1 à 3 secondes seulement, jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau courante. À ce stade, les cellules Gram-négatives seront incolores, les cellules Gram-positives violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre-coloration de 30 secondes à la fuchsine basique diluée, pour colorer (en rouge) les cellules Gram-négatives présentes. Après un bref rinçage, on sèche le frottis au buvard et on l'examine à l'objectif à immersion (grossissement x1.000 environ).

Certaines bactéries ne réagissent pas clairement ou réagissent de façon aléatoire - parfois positivement, parfois négativement - à la coloration de Gram. Ces bactéries sont dites **Gram-variables**. Pour éviter les problèmes posés en taxinomie (classification) par cette variabilité, beaucoup de bactéries sont déclarées de type Gram-positif ou de type Gram-négatif, selon la structure de leurs parois cellulaires.

- **Coloration de Ziehl—Neelsen (coloration acidorésistante)**

Les bactéries « acidorésistantes » diffèrent de toutes les autres bactéries en ceci : une fois qu'elles ont été colorées par la fuchsine basique concentrée, chaude, il est impossible de les décolorer par les acides minéraux ou par des mélanges d'acide et d'éthanol. Citons parmi ces bactéries, *Mycobacterium tuberculosis*. Un frottis fixé à la chaleur est recouvert d'une solution concentrée de fuchsine basique et la lame est chauffée jusqu'à ce que la solution se mette à fumer ; elle ne devrait pas bouillir. On maintient la lame chaude pendant environ 5 minutes, on la laisse refroidir puis on la rince à l'eau courante. L'étape de décoloration consiste à passer la lame dans des bains successifs d'acide-alcool (par exemple, 3 % v/v d'acide chlorhydrique concentré dans de l'éthanol à 90 %). Après un lavage à l'eau, le frottis subit une contre-coloration avec un colorant de contraste (comme le vert de malachite), puis est à nouveau lavé et séché. Les cellules acidorésistantes se colorent en rouge, les autres en vert.

- **Coloration au vert de malachite**

La coloration au vert de malachite permet de mettre en évidence les spores (endospores ou exospores). Cette coloration peut être utile pour mettre en évidence des genres sporulants (*Clostridium*, *Bacillus*). Le colorant (vert de malachite) teinte en vert sombre les enveloppes sporales. En colorant les bactéries végétatives (et les sporanges),

grâce à la fuchsine rose ou à la safranine orange, il est possible de visualiser la disposition des endospores (centrales, terminales, déformantes). Les espèces de *Clostridium* font apparaître des sporanges en forme de massue caractéristique (endospore terminale déformante).

○ Coloration à l'encre de Chine

La coloration à l'encre de Chine permet de mettre en évidence la présence de capsules. Le colorant ne pénètre pas dans la capsule mais assombrit le milieu environnant (coloration négative). Les bactéries munies de capsules apparaissent entourées d'un halo lumineux.

V.1.2 Etudes des caractères biochimiques et physiologiques

V.1.2.1 Etude du métabolisme respiratoire

Deux activités enzymatiques typiques du métabolisme respiratoire aérobie peuvent être mises en évidence : la catalase et l'oxydase. Ces tests sont très utilisés car ils permettent très rapidement d'orienter l'identification bactérienne.

Ils sont mis en œuvre après la coloration de Gram : le test de la catalase s'effectue sur les bactéries Gram positives (Firmicutes), le test de l'oxydase sur des bactéries Gram négatives (Gracilicutes).

- La **catalase** est une enzyme de détoxification du stress oxydatif qui dégrade le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (forme activée de l'oxygène produit par le métabolisme aérobie) en O_2 gazeux. Dans ce test simple, un prélèvement bactérien est mis au contact d'une goutte de peroxyde d'hydrogène. Une réaction positive (présence de bulles) suggère la présence de catalase. Ce test permet de distinguer les principaux genres de Firmicutes entre eux : *Staphylococcus*, *Bacillus* et *Listeria* sont catalase positifs ; *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Clostridium* sont catalase négatifs.

- L'**oxydase** est une enzyme faisant partie de la chaîne respiratoire. Elle permet d'oxyder un réactif incolore (le diméthyl paraphylène diamine) en un produit coloré violet. Dans ce test simple, un prélèvement bactérien est mis au contact d'une pastille imprégnée de réactif. Une réaction positive (virement de couleur) suggère la présence d'une oxydase. Ce test permet de distinguer les Gracilicutes entre elles : les entérobactéries (*Escherchia*, *Salmonella*, *Yersinia*) sont oxydase négatives ; *Vibrio* et *Pseudomonas* sont oxydase positifs.

V.1.2.2 Etude du métabolisme glucidique

Le métabolisme glucidique peut être étudié pour distinguer certaines espèces par l'identification de produits du métabolisme ou la recherche d'enzymes particulières.

- **Acidification**

La fermentation glucidique produit divers acides organiques dans le milieu alors que la respiration produit du CO_2 gazeux. La présence d'un indicateur de pH permet de rendre compte de l'acidité produite en présence ou en absence d' O_2 . Les tests MEVAG et CTA, effectués en gélose en tube, utilisent le glucose comme source glucidique et le rouge

de phénol qui vire au jaune quand le milieu s'acidifie. La présence d'un virement de coloration signifie que l'espèce bactérienne fermente le glucose. Les tests colimétriques en milieu solide ou liquide utilisent le lactose et le rouge neutre ou le bleu de bromophénol.

- **Test à l'ONPG**

L'utilisation du lactose fait souvent intervenir deux enzymes : (a) une **galactoside « perméase »** (qui facilite l'absorption du lactose), et (b) une **β -D-galactosidase** (qui scinde le lactose en glucose et galactose). Des espèces comme *E. coli* peuvent habituellement synthétiser ces deux enzymes. Certaines bactéries qui n'utilisent pas le lactose ou qui le métabolisent très lentement, peuvent néanmoins produire de la β -D-galactosidase. L'incapacité de ces organismes à avoir un métabolisme normal du lactose peut être due à une incapacité de synthétiser la galactoside perméase. Pour détecter la présence de β -D-galactosidase dans de tels organismes, on recourt à une substance, l'o-nitrophényl- β -D-galactopyranoside (ONPG), qui peut pénétrer dans la cellule sans perméase spécifique. Dès qu'il est dans la cellule, l'ONPG est clivé par la galactosidase en galactose et en o-nitrophénol de couleur jaune. Dans le test à l'ONPG, on cultive l'organisme pendant 18 à 24 heures dans du bouillon contenant de l'ONPG. L'apparition de l'o-nitrophénol (jaune) dans le milieu indique la présence de β -D-galactosidase (test positif).

- **Test de Voges-Proskauer (test VP)**

Ce test détecte la capacité qu'a un organisme de fabriquer de l'acétoïne (acétylméthylcarbinol) voir la fermentation butanediolique. On inocule un milieu peptone-glucose tamponné au phosphate avec la souche à tester et on le met à incuber à 37 °C pendant 2 jours ou à 30 °C pendant 5 jours au moins. Dans une version du test (la méthode de Barritt), on ajoute successivement à 1 ml de culture, 0,6 ml d'une solution d' α -naphthol à 5 % dans de l'éthanol et 0,2 ml d'une solution d'hydroxyde de potassium à 40 %. Le tube ou la bouteille est alors vigoureusement agité, placé en position inclinée (pour exposer un maximum de la culture à l'air), puis examiné après 30 et 60 minutes. Si l'acétoïne est présente, elle est apparemment oxydée en diacétyle ($\text{CH}_3\text{CO.CO.CH}_3$) lequel, dans les conditions du test, donne une coloration rouge (test VP positif).

V.1.2.3 Etude de métabolisme protidique

L'étude du métabolisme protidique se fait essentiellement par l'identification d'enzymes utilisant des acides aminés : désaminases, décarboxylases et autres enzymes intervenant dans le métabolisme azoté.

- **Test de la phénylalanine désaminase (test de l'APP)**

Ce test détermine si un organisme est capable de désaminer la phénylalanine en acide phénylpyruvique (APP). On cultive l'organisme pendant une nuit sur de la gélose à la phénylalanine contenant de l'extrait de levure, du Na_2HPO_4 , du chlorure de sodium et de la DL-phénylalanine). On ajoute ensuite à la culture, 0,2 ml d'une solution de chlorure ferrique à 10 %. S'il est présent, l'APP donne une coloration verte avec le chlorure ferrique. *Proteus vulgaris* fait partie des bactéries APP-positives.

- **Tests de décarboxylases**

Ces tests détectent la capacité qu'a un organisme de produire des décarboxylases, enzymes qui décarboxylent les acides aminés arginine, lysine et ornithine, respectivement en agmatine, cadavérine et putrescine. On inocule avec l'organisme à tester, trois tubes de bouillon décarboxylase de Møller, contenant chacun du glucose, de la peptone, un des acides aminés et les indicateurs de pH : le pourpre de bromocrésol et le rouge de crésol. Dans chaque tube, le bouillon est recouvert d'une couche de paraffine stérile (pour l'isoler de l'air). On met à incuber à 37 °C et on examine quotidiennement pendant 4 jours. Tout d'abord, le milieu s'acidifie (et devient jaune) suite à la métabolisation du glucose. Si aucune décarboxylase n'est synthétisée, le milieu reste jaune. Par contre, la décarboxylation de l'acide aminé donne naissance à un produit alcalin. Le pH s'élève donc et le milieu devient pourpre. Il faut prévoir un milieu témoin, semblable au milieu du test, mis à part l'acide aminé qui est omis. Ce témoin doit devenir et rester jaune.

- **Tryptophanase**

Hydrolyse le tryptophane en indole. Un réactif (de Kovacs) permet de caractériser la présence d'indole.

V.1.2.4 Galerie d'identification

L'identification d'une espèce bactérienne fait appel à un ensemble de milieux, de réactifs et de techniques standardisées qu'on appelle **galeries**. Celles-ci exploitent les caractéristiques biochimiques et physiologiques des bactéries par la mise en évidence d'enzymes spécifiques ou de produits du métabolisme. On distingue trois types de galeries :

- **La galerie traditionnelle en tubes** : comporte une dizaine de milieux de culture et doit être inoculée avec une souche préalablement isolée, selon une méthodologie précise. Cette galerie n'est plus utilisée en laboratoires d'analyses, mais comporte un intérêt pédagogique ;

- **La galerie miniaturisée** se présente sous la forme d'une plaque en plastique rectangulaire comportant plusieurs microtubes (cupules). Chacun comporte un milieu déshydraté dans lequel on dépose quelques gouttes de suspension bactérienne. Certaines cupules doivent être recouvertes d'une goutte d'huile de paraffine afin d'établir une anaérobiose. Le principe des tests repose sur celui de la galerie traditionnelle, mais l'analyse est plus simple et plus rapide.

Les résultats obtenus dans chaque cupule (réaction positive ou négative) sont convertis en un nombre qui permet, à l'aide d'une table de référence, d'identifier avec plus ou moins de précision une espèce bactérienne. Par exemple, la galerie Api[®]20E des laboratoires Biomérieux permet l'identification précise des espèces de la grande famille des Enterobacteriaceae. Ce type de galerie est très utilisé en laboratoire. Cette analyse est pratiquée après le test à la catalase ou à l'oxydase pour différencier les espèces au sein de plusieurs genres ;

- **La carte d'identification** est un procédé automatique de lecture assistée par ordinateur. Elle se présente sous la forme d'une carte dans laquelle se trouve un ensemble de cavités contenant un milieu déshydraté qu'il convient de remplir par la suspension bactérienne à identifier. La carte est placée dans un lecteur optique automatique et l'ordinateur donne très rapidement le nom de l'espèce bactérienne, avec plus ou moins de précision. Par exemple, la carte Vitec®GPI des laboratoires Biomérieux permet l'identification précise des espèces Gram positives, comme *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ou *Listeria monocytogenes*, La carte GNI+ permet l'identification des entérobactéries. Cette technique est couramment employée dans les laboratoires équipés de ce système.

V.1.2.5 L'hémolyse

Lorsque certaines bactéries se développent sur de la gélose au sang, chaque colonie s'entoure d'un « halo » où le milieu est modifié, soit que les érythrocytes y aient été lysés, soit que le sang y ait été décoloré. Ce phénomène s'appelle l'hémolyse et est dû à l'action de protéines (les hémolysines) libérées par les bactéries. Certaines espèces donnent une hémolyse incolore, transparente qui contraste nettement avec le milieu rouge opaque. C'est le cas de *Streptococcus pyogenes*, par exemple, et pour certaines souches de *Staphylococcus aureus*. On appelle souvent β - hémolyse, l'hémolyse transparente due à *Streptococcus*, et alpha-hémolyse, celle due à *S.aureus* ; il est probablement préférable de désigner ce type d'hémolyse par le seul terme d' « hémolyse claire ».

Pour une bactérie hémolytique donnée, l'hémolyse ou une forme particulière de l'hémolyse ne peut se manifester que si l'organisme a été cultivé sur des milieux préparés avec du sang d'un type animal spécifique (cheval, lapin, Homme, etc.).

V.1.3 Etude des caractères génétiques et immunologiques

V.1.3.1 Tests génétiques

Afin de pallier les limites de l'identification phénotypique, différentes méthodes moléculaires (c'est-à-dire utilisant l'ADN comme objet d'étude) ont été proposées.

○ Hybridation de sondes d'identification

Ces sondes oligonucléotidiques (ADN simple brin de petite taille) sont liées à une enzyme (dont l'activité donne une coloration) ou à un composé chromophore (dont l'activité émet une lumière). Ces sondes d'identification d'une bactérie ou d'un virus (pathogènes) sont commercialisées et simples d'utilisation (kit de détection). Ces sondes se fixent spécifiquement sur une séquence définie de l'ADN de leur cible (ADN chromosomique bactérien ou génome viral) par complémentarité de bases (**fig.5.3**). Pour cela, on détruit les bactéries à analyser par application de sonde. L'ADN bactérien est extrait et fixé sur un support (filtre ou membrane) puis chauffé afin de dissocier les deux brins complémentaires (la chaleur a pour effet de rompre les liaisons hydrogènes associant les deux brins). La sonde est ajoutée puis le filtre est rincé. Les sondes qui se sont fixées sont détectées par la présence du marqueur (signal coloré ou lumineux) : la présence du signal signifie que l'ADN qu'on analyse correspond bien à celui de la bactérie recherchée. Ces sondes sont commercialisées sous forme de kits prêts à l'emploi

(ex. : le Kit Accuprobe® des laboratoires GenProbe permet la détection de germes pathogènes comme *Listeria monocytogenes*).

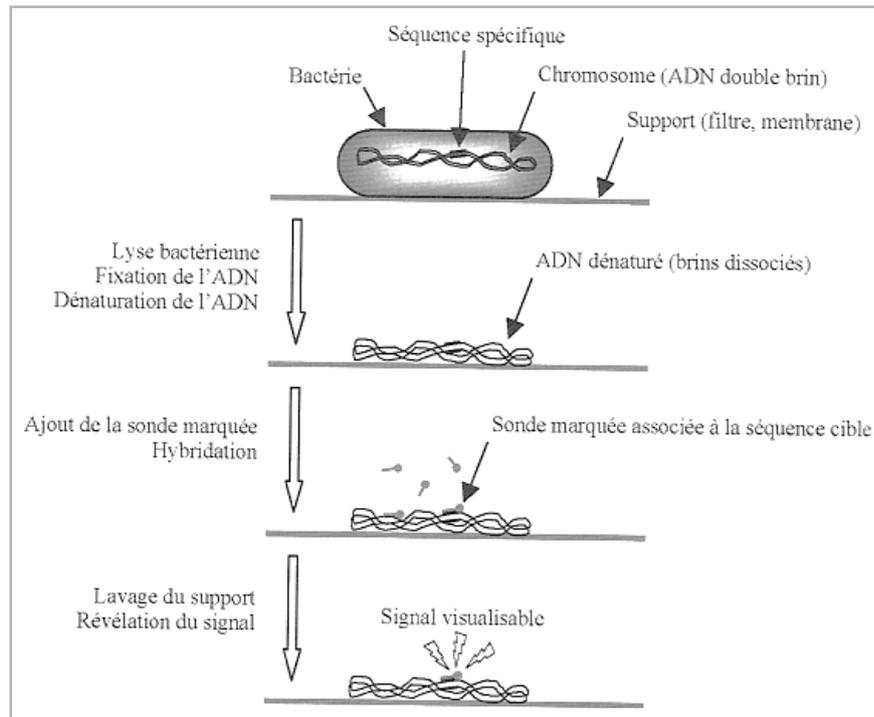


Figure 5.3 : Principe de l'identification par hybridation de sondes.

○ PCR

La PCR (polymerase chain reaction) est une technique très sensible et très répandue en laboratoire d'analyses. Elle permet d'identifier une séquence d'ADN présente dans un extrait bactérien en l'amplifiant par réplication multiple grâce à une ADN polymérase thermorésistante (conduisant à une accumulation de copies de la séquence spécifique) (**fig.5.4**). Pour cela, on utilise des oligonucléotides marqués spécifiques qui reconnaissent les deux extrémités de la séquence de l'ADN cible et qui après la fixation sur l'ADN cible (hybridation), permettent d'initier la réplication (les oligonucléotides font office d'amorce pour l'enzyme de réplication). L'hybridation se fait à 60°C et la réplication se fait à 72°C. L'hybridation est rendue possible par dénaturation préalable de l'ADN qui permet la séparation des deux brins de la séquence cible. Cette dénaturation se fait par élévation de la température du milieu à 95°C. L'utilisation d'un appareil particulier (thermocycleur) permet de faire alterner l'étape de dénaturation, d'hybridation et de réplication un grand nombre de fois (cycles) en chauffant les tubes selon un cycle de températures (95°C/60°C/72°C). Après plusieurs cycles, on parvient à amplifier la séquence choisie par accumulation de copies d'ADN double-brin marquées. Celles-ci peuvent être détectées par mesure de la fluorescence, après élimination des sondes marquées non hybridées par électrophorèse ou par chromatographie.

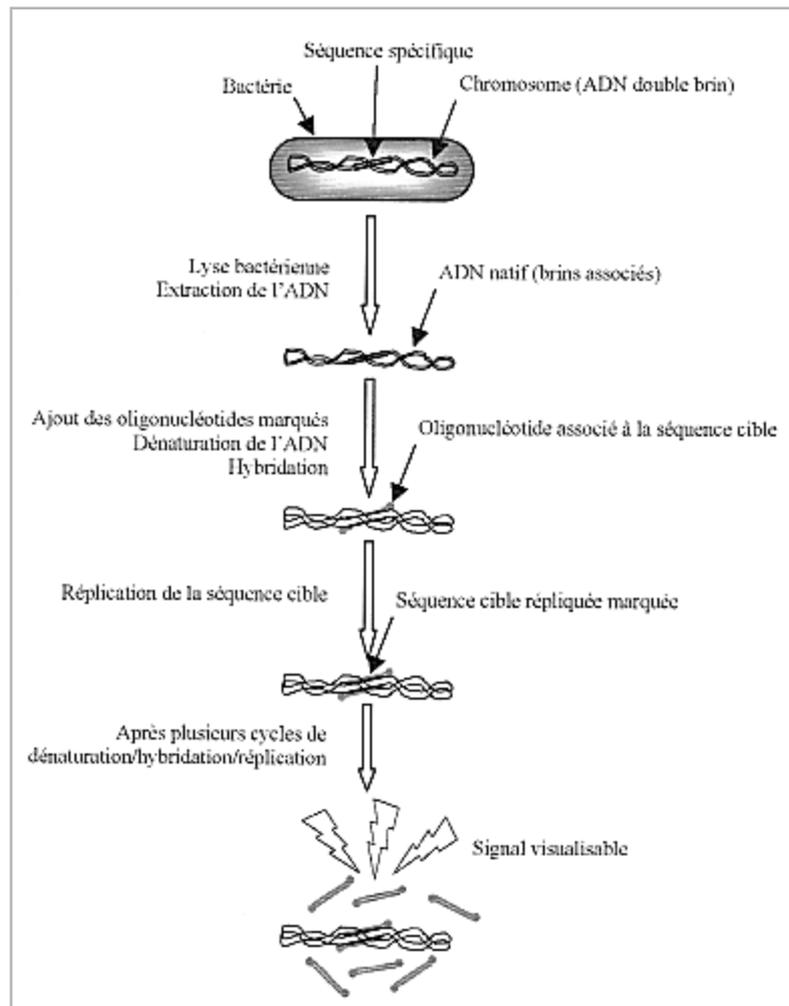


Figure 5.4 : Principe de l'identification par réaction PCR.

La PCR permet une identification précise à partir de très peu de matériel génétique. Elle est utilisée souvent pour identifier les virus dans les selles ou les bactéries pathogènes dans les aliments. Les oligonucléotides marqués sont commercialisés sous forme de kits prêts à l'emploi (ex. : le kit Bax[®] de la société Dupont Qualicon permet, entre autres, la détection de *Salmonella*).

○ Le gène de l'ARNr 16S

Présent chez tous les procaryotes. Ce gène a permis d'élucider l'histoire évolutive de l'ensemble des organismes vivants. Du fait même de sa grande conservation chez tous ces organismes, ce gène présente toutefois peu de variabilité intragénérique (au niveau du genre et en dessous). Les régions plus variables du gène (les neuf régions dites hypervariables) ne suffisent pas toujours à discriminer des espèces proches. Quoi qu'il en soit, le séquençage et la comparaison des séquences de l'ARN 16S sont maintenant l'étape préalable, quasi systématique, lors de l'identification d'une souche procaryote inconnue. Cette première étape permet de déterminer avec une très bonne fiabilité le genre de la Bactérie ou de l'Archée. En ce qui concerne l'identification au niveau de l'espèce, par comparaison avec la technique d'hybridation ADN-ADN (tab. 5.1), il a été établi que deux souches présentant des séquences de leur ARNr 16S différant de plus de 3 % (c'est-à-dire que leur pourcentage d'identité est inférieur à 97

%), appartiennent très probablement à deux espèces différentes. Cependant la réciproque n'est pas vraie : des souches d'espèces différentes peuvent avoir des séquences de l'ARNr 16S ayant un pourcentage d'identité supérieur à 97 %. Certains auteurs proposent l'utilisation du seuil de 99 % d'identité pour considérer que deux souches appartiennent à la même espèce, proposition qui ne fait cependant pas l'unanimité et doit être utilisée avec précaution.

Tableau 5.1: Seuils moléculaires de délimitation d'une espèce procaryote.

Technique moléculaire	Seuil de l'espèce
Hybridation ADN-ADN	50%-70%
Gène de l'ARN 16S	97%-99%
MLSA	94%-96%
AFLP	80%-90%
ANI	94%-96%

○ **Technique AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)**

Consiste à réaliser une digestion enzymatique de l'ADN génomique (par des enzymes de restriction), à fixer des adaptateurs (courtes séquences d'ADN double-brin) aux extrémités des fragments obtenus, à réaliser une amplification par PCR puis une migration électrophorétique. Chaque souche présente un profil de migration type « code-barres » caractéristique, le nombre de bandes communes entre deux souches reflétant la proximité génétique. Cette technique est très sensible et permet de discriminer des souches de la même espèce. La bonne correspondance entre les techniques AFLP et hybridation ADN-ADN permet de fixer le seuil de délimitation des espèces autour de 80-90 % de similarité de profils AFLP (**tab. 5.1**). En plus de sa sensibilité plus grande que celle du séquençage de l'ARNr 16S, cette technique présente l'avantage d'être multi-locus, c'est-à-dire qu'elle cible différentes régions réparties sur tout le génome. Elle est donc peu sensible aux transferts horizontaux. Sa portabilité et son archivabilité sont toutefois limitées.

○ **Technique MLSA (MultiLocus Sequence Analysis)**

Consiste à séquencer et comparer 5 à 7 gènes de ménage, codant des fonctions cellulaires conservées. Les séquences cumulées de ces gènes présentent à la fois une longueur totale et une variabilité plus importantes que le gène de l'ARNr 16S, tout en reflétant l'histoire évolutive des souches étudiées. La résolution taxonomique de la technique MLSA est du même ordre de grandeur que celle de la technique AFLP, avec un seuil de délimitation de l'espèce autour de 94-95 % d'identité entre les gènes (**tab. 5.1**). Cette technique est, tout comme la technique AFLP, multi-locus et donc relativement peu sensible aux transferts horizontaux, tout en étant totalement portable

et archivable. Seul son coût par souche, qui tend toutefois à diminuer, limite quelque peu son utilisation.

- **Technique ANI (Average Nucleotide Identity)**

Cette technique consiste à séquencer entièrement le génome de la souche à identifier et à comparer l'ensemble des séquences avec les génomes de références de la base de données. Cette méthode est, par définition, la plus résolutive puisqu'elle peut discriminer deux souches ne différant que par quelques nucléotides répartis sur l'ensemble de leur génome. Le seuil de délimitation de l'espèce se situe autour de 94-95 % d'identité sur l'ensemble des gènes. En plus de l'identification très précise du micro-organisme, cette technique permet également d'accéder au « potentiel phénotypique ». Ainsi, dans un contexte clinique, cette technique permet notamment de rechercher la présence de gènes de résistance à des antibiotiques ou de gènes impliqués dans la virulence bactérienne, et à la fois d'identifier avec le maximum de fiabilité et de précision un micro-organisme, d'évaluer rapidement son danger potentiel et de définir le traitement antibiotique le plus adapté. Cette technique est également totalement portable et archivable. Son coût et son temps d'analyse sont encore relativement importants, ce qui limite fortement sa large diffusion, notamment dans un contexte clinique. Les importants progrès actuels et probablement futurs dans les techniques de séquençage à haut débit devraient la rendre de plus en plus compétitive.

V.1.3.2 Tests immunologiques

Les tests immunologiques permettent de déterminer le sérotype d'une bactérie donnée (souche présentant un antigène particulier). La spécificité antigénique des bactéries à identifier est évaluée par utilisation d'anticorps primaires (se fixant sur l'antigène bactérien) et secondaires (se fixant sur l'anticorps primaire). Les antigènes bactériens peuvent être situés au niveau des lipopolysaccharides (antigène O), des *pili* ou des flagelles (antigène H). Deux souches d'une même espèce peuvent ainsi être distinguées. Le sérotypage est la technique permettant d'identifier le sérotype de la bactérie (très utilisé pour *Salmonella enterica* car il existe de très nombreux sérotypes). Le test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) est la méthode la plus utilisée pour l'identification des virus et bactéries pathogènes. On utilise une plaque en plastique présentant de nombreux puits (cupules) et des anticorps marqués. Le marqueur est une enzyme produisant une substance colorée (technique immunoenzymatique) aisément visualisable. D'autres techniques utilisent un fluochrome qui émet un signal lumineux (détection par immunofluorescence). La technique peut être automatisée et assistée par ordinateur (systèmes Vidas® des laboratoires Biomérieux). On distingue deux techniques :

- **L'immuno- essai indirect**

Utilisé en analyses médicales (sérologie) pour déterminer la présence d'un anticorps spécifique dans le sérum sanguin (niveau d'immunisation). Un antigène déterminé (connu) est fixé à la plaque au fond du puits et on y dépose le sérum à analyser (susceptible de contenir l'anticorps spécifique de l'antigène). Après rinçage, on dépose l'anticorps secondaire marqué (qui reconnaît tous les anticorps primaires au niveau de leur partie constante) et on rince de nouveau. Le marquage n'apparaît que si un anticorps (primaire) s'est fixé à l'antigène, c'est-à-dire que si le sérum testé contient

les anticorps recherchés. On peut réaliser cette même opération dans plusieurs puits avec différents antigènes ;

- **L'immuno essai direct (fig.5.5)**

Utilisé en analyses médicales ou alimentaires pour déterminer la présence d'un germe pathogène, d'un virus ou d'une toxine (porteurs d'antigènes spécifiques) dans un milieu biologique (sang, selles, aliments.). Un anticorps monoclonal déterminé, spécifique de l'antigène recherché, est fixé à la plaque au fond du puits (1) et on y dépose le fluide à analyser susceptible de contenir le germe porteur des antigènes spécifiques de l'anticorps (2). Après rinçage, on dépose le même anticorps mais marqué (qui est encore capable de reconnaître d'autres éléments antigéniques du germe fixé au premier anticorps) et on rince de nouveau (3). Le marquage n'apparaît que si un antigène s'est fixé au premier anticorps, c'est-à-dire que si le fluide contient les antigènes recherchés. On peut réaliser cette même opération dans plusieurs puits avec différents anticorps.

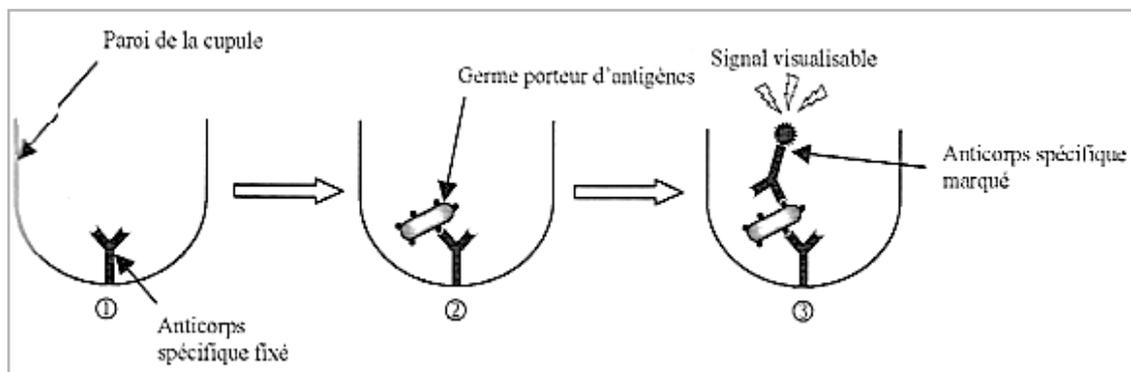


Figure 5.5 : Principe de l'identification par la technique ELISA directe.

En pratique, on peut détecter aussi (et identifier) un sérotype donné au moyen d'anticorps spécifiques dont on sait qu'ils ne se combinent qu'avec les antigènes d'un ou de sérotypes connus. On obtient ces anticorps en injectant à un animal de laboratoire, des antigènes d'un sérotype connu. Après un certain temps, le sérum de l'animal contiendra des anticorps dirigés contre ces antigènes. Ce sérum est appelé antisérum spécifique. Quand on mélange l'antisérum avec des cellules du sérotype voulu, les anticorps s'associent aux antigènes de surface correspondants. Les complexes bactérie-anticorps forment souvent, dans le tube à essai, une masse blanchâtre visible, en suspension ou sédimentée (c'est la **réaction d'agglutination**). Si ce même antisérum peut agglutiner une souche non identifiée, on peut en conclure que la souche inconnue et le sérotype original possèdent des antigènes communs. On peut donc identifier un sérotype inconnu en le testant avec toute une série d'antiséras, dont chacun contient les anticorps d'un sérotype particulier, connu.

On peut obtenir des résultats rapides avec les tests d'agglutination de latex, dans lesquels le réactif consiste en particules de latex minuscules (microscopiques), enrobées d'anticorps (dont les sites de fixation des antigènes sont dirigés vers l'extérieur). Les bactéries portant les antigènes de surface correspondants vont lier ces particules l'une à l'autre, provoquant leur agglutination en flocons visibles. Le test est donc positif lorsque ces flocons se forment.

VI. Chapitre VI : Notion d'espèce, souche et de biodiversité

VI.1 Introduction à la classification et à la taxinomie

Les microbiologistes sont confrontés à la tâche intimidante de comprendre la diversité de formes de vie qu'on ne peut pas voir à l'œil nu, mais qui peuvent apparemment se trouver n'importe où sur la terre.

Un des premiers outils nécessaires pour étudier un tel niveau de diversité est un système de classification fiable. La taxinomie (du grec taxi, disposition ou ordre et nomos, loi ou nemein, distribuer ou gouverner) se définit comme la science de la classification biologique. Au sens large, elle est faite de trois parties séparées, mais reliées entre elles : la classification est choisie, on l'utilise pour répartir les organismes en groupe appelés taxons, sur la base de leur similarité mutuelle. La nomenclature est la branche de la taxinomie qui donne des noms aux groupes taxinomiques, selon des règles publiées. Les biologistes utilisent le système binomial. L'identification est le côté particulier appartient à un taxon connu, et si c'est le cas, lequel le terme systématique est souvent utilisé pour taxinomie. De nombreux taxinomistes le définissent cependant en termes plus généraux comme « l'étude scientifique des organismes dans le but ultime de les caractériser et de les arranger de manière ordonnée ». Toute étude de la nature des organismes, est utilisé en taxinomie, fait partie de la systématique.

VI.2 Notion d'espèce

L'espèce est le taxon de base en taxonomie. Sa détermination est l'objectif principal de la plupart des démarches d'identification d'une souche inconnue

VI.2.1 Définition de l'espèce chez les procaryotes

Chez les macro-organismes (eucaryotes pluricellulaires sexués), une espèce se définit selon le « concept biologique de l'espèce », soit une population dont les individus peuvent naturellement se croiser et produire une descendance fertile. Chez les eucaryotes, la reproduction sexuée est donc le mécanisme évolutif qui permet à la fois de séparer génétiquement les organismes appartenant à deux espèces différentes et d'homogénéiser la diversité (le polymorphisme) génétique à l'intérieur d'une espèce. D'autres mécanismes, en plus de la reproduction sexuée, comme la dérive génétique suite à une séparation géographique de deux sous-populations, participent à la spéciation (c'est-à-dire à la séparation génétique de deux espèces proches). Ce concept biologique de l'espèce n'est évidemment pas applicable pour les micro-organismes procaryotes, leur reproduction étant asexuée. Les transferts horizontaux sont trop rares pour jouer le rôle de l'homogénéisation intraspécifique réalisée par la reproduction sexuée. De plus, le flux génique entre les procaryotes ne se limite pas aux organismes d'une même espèce, des transferts horizontaux pouvant concerner des micro-organismes éloignés du point de vue évolutif.

Cette incapacité à appliquer le concept biologique de l'espèce à l'ensemble des organismes vivants a eu pour conséquence l'élaboration d'une nouvelle définition universelle de l'espèce : « une espèce est une catégorie qui circonscrit un groupe de souches cohérent au niveau de leur génome et présentant un fort degré de similarité pour de nombreuses caractéristiques phénotypiques indépendantes et testées comparativement sous des

conditions hautement standardisées ». Des organismes appartiennent donc à la même espèce s'ils ont une proximité génotypique (c'est-à-dire évolutive) et phénotypique (c'est-à-dire fonctionnelle). Selon cette définition, sont considérés comme appartenant à la même espèce deux micro-organismes ayant un pourcentage d'hybridation ADN-ADN de leur génome supérieur à 70 % (fig.6.1).

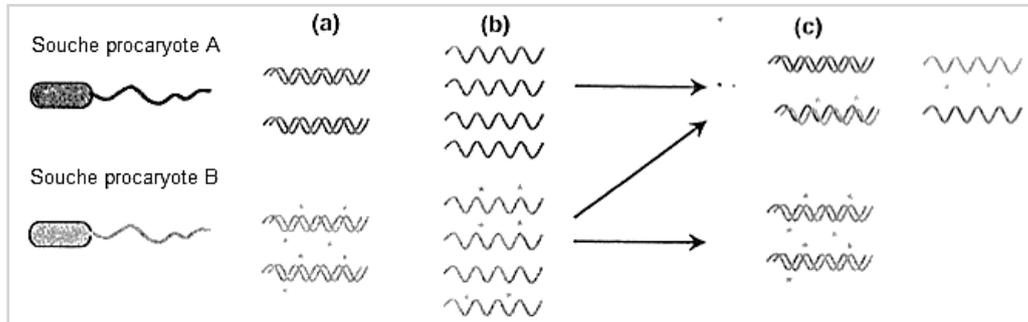


Figure 6.1 : Comparaison de deux souches par la technique d'hybridation ADN-ADN.

La définition de l'espèce se fait donc sur une base technique à l'aide d'une mesure moléculaire reflétant la similitude au niveau génétique entre des procaryotes. Cette technique a été choisie car elle est très sensible, permettant de différencier des souches et espèces très proches, mais cette grande sensibilité limite toutefois les comparaisons entre espèces éloignées (appartenant à deux genres différents). Cette technique consiste à extraire, fragmenter et dénaturer (par la chaleur) l'ADN génomique des deux souches à comparer, l'un des génomes étant marqué par un isotope radioactif (^{32}P ou ^3H). Des renaturations des génomes, séparément ou en mélange, permettent de déterminer le pourcentage des génomes s'hybridant entre eux, qui est fonction de la similarité génétique entre les deux génomes.

VI.3 Rangs taxonomiques intraspécifiques d'intérêt

Même si l'espèce est très souvent le rang taxonomique recherché, il est parfois nécessaire d'identifier un rang taxonomique inférieur (intraspécifique). C'est particulièrement le cas lors d'études épidémiologiques.

VI.3.1 Différents rangs taxonomiques intraspécifiques

Le terme de sous-espèce est le rang taxonomique supporté phylogénétiquement le plus faible de la nomenclature moderne. Il correspond à un groupe de souches génétiquement cohérentes ayant des variations phénotypiques caractéristiques.

- Le **génomovar** est un groupe de souches cultivées qui constitue une entité génétique similaire à la sous-espèce mais dont les caractères phénotypiques requis pour sa caractérisation comme sous-espèce au sens strict sont manquants.
- Le terme **biovar** est utilisé pour différencier des souches d'une même espèce ayant des phénotypes différents mais pas nécessairement de différences génomiques cohérentes (sinon le terme de sous-espèce peut être appliqué) ou même détectables (simples mutations ponctuelles par exemple).
- Un **pathovar** est un groupe de souches pathogènes dont les spécificités d'hôte et les propriétés pathogéniques sont communes.

- Le **sérovar**, défini en fonction des propriétés antigéniques, est très utilisé dans le domaine médical. Les sérovars dépendent de la spécificité des anticorps et peuvent présenter une réactivité croisée.

Idéalement, une **souche** est une prolifération clonale d'un organisme, dont les descendants doivent être génétiquement identiques. Cependant la probabilité d'obtenir des variations génomiques dans un clone n'est pas négligeable. Au sens le plus large, une souche procaryote est ainsi considérée comme une population d'organismes dérivant d'un isolat de culture pur. C'est le niveau le plus fin de l'identification chez les procaryotes.

VI.3.2 Détermination des rangs taxonomiques intraspécifiques

De nombreuses techniques ont été développées pour typer (discriminer) les souches chez les procaryotes, spécialement dans un contexte clinique. Ainsi, dans un cadre médical, il peut être important de différencier des souches d'une espèce bactérienne dont certains représentants sont pathogènes et d'autres non (par exemple *Escherichia coli* et la souche pathogène O157 :H7). Une discrimination fine est également très utile en épidémiologie pour suivre la propagation d'un pathogène ou identifier l'origine d'une infection. Lors de ces typages, l'objectif est d'être le plus résolutif possible, idéalement jusqu'au niveau de la souche. Certaines approches phénotypiques (métabolisme particulier, propriétés antigéniques) sont très sensibles mais manquent parfois de spécificité et de reproductibilité. Parmi les techniques moléculaires les plus utilisées, nous pouvons citer la REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic-PCR*), la PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) et la technique MLST (*MultiLocus Sequence Typing*). Ces trois techniques ciblent plusieurs régions réparties sur l'ensemble du génome.

VI.3.2.1 REP-PCR

Consiste à amplifier par PCR des séquences répétitives présentes dans les génomes procaryotes. Le nombre et le polymorphisme de taille de ces régions permettent, après séparation par électrophorèse, de déterminer un profil caractéristique pour chaque souche.

VI.3.2.2 PFGE

Consiste à couper le génome en une vingtaine de fragments à l'aide d'enzymes de restriction à sites rares. Le nombre et la taille des gros fragments générés (jusqu'à quelques centaines de milliers de nucléotides) ne peuvent pas être estimés par une électrophorèse classique mais nécessitent d'alterner l'orientation des champs électriques lors de la migration électrophorétique (principe de la PFGE). Le profil électrophorétique obtenu est caractéristique de la souche étudiée.

VI.3.2.3 Technique MLST

Consiste à séquencer et comparer des fragments de 5 à 7 gènes de ménage (environ 500 pb). Cette technique est très proche de la technique MLSA (**Chap.5**). Cependant les gènes ne sont pas comparés selon une analyse phylogénétique classique, mais en attribuant un nombre caractéristique à chaque souche. Pour chacun des gènes, il est attribué un chiffre, en fonction de l'allèle (c'est-à-dire de la séquence particulière du gène) représenté dans la souche étudiée. Chacune des souches est donc caractérisée par 5 à 7 chiffres (en fonction du nombre de gènes choisis pour l'étude), correspondant au « type de séquences multigéniques ». Ces types de séquences sont comparés, leurs distances étant représentées sous forme de

dendrogramme. Cette technique présente une très fine résolution avec une portabilité et une archivabilité également grandes. Elle permet de différencier des souches très proches mais n'est pas adaptée à la comparaison de souches appartenant à des espèces différentes, puisqu'elles doivent au minimum posséder plusieurs allèles en commun (des séquences identiques pour certains gènes). Lorsque les souches sont trop éloignées, il peut toutefois être réalisé une étude MLSA avec les mêmes séquences. Enfin la technique MLST permet également d'étudier le degré de clonalité, c'est-à-dire l'impact des transferts horizontaux sur l'histoire évolutive de différents pathogènes.

Comme évoqué précédemment, la technique ANI est sans contexte la plus sensible des méthodes de typage de Bactéries. Le séquençage complet du génome permet ainsi de mettre en évidence une seule mutation sur l'ensemble du génome. La généralisation de cette technique lors de la réalisation de diagnostic clinique est toutefois dépendante des progrès futurs des techniques de séquençage à haut débit, afin de diminuer encore le temps et le coût d'analyse.

VI.4 Biodiversité des *Bacteria*

La figure 6.2 présente l'arbre phylogénétique simplifié du domaine des *Bacteria*.

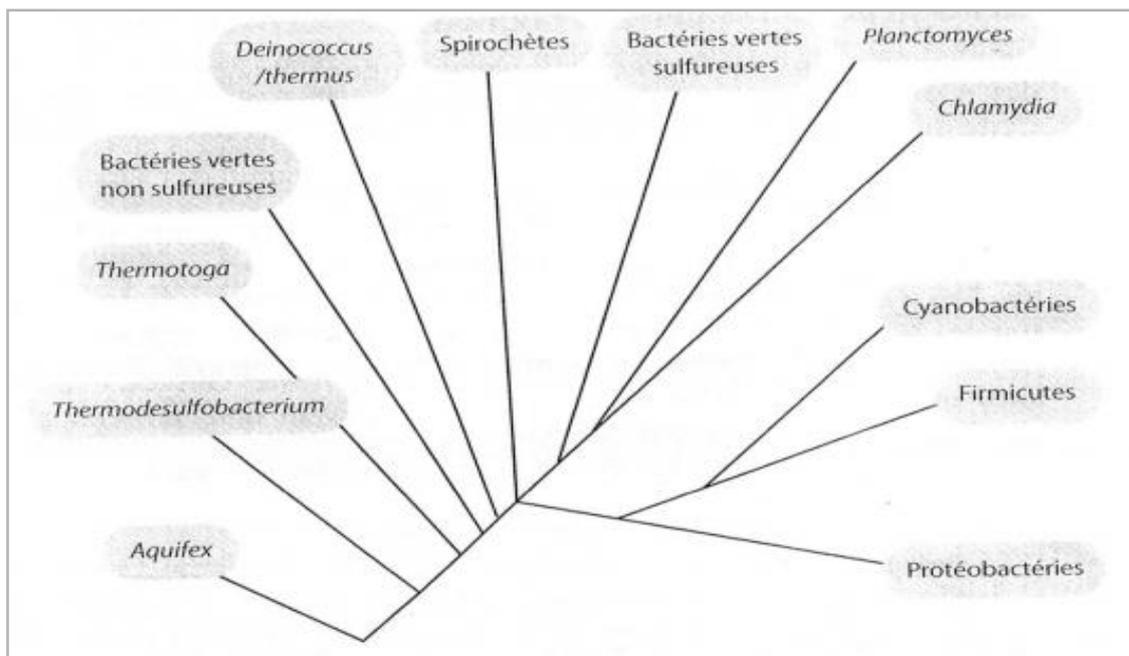


Figure 6.2 : Arbre simplifié du domaine des *Bacteria*.

‡ Les *Bacteria* hyperthermophiles

A la base de l'arbre, trois lignées correspondent à des micro-organismes hyperthermophiles, dont la température optimale de croissance est égale ou supérieure à 80°C.

Le genre *Thermotoga* a une forme allongée entourée d'une enveloppe nommée « toga ». C'est un chimio-organotrophe anaérobie strict dont la température optimale de croissance varie de 80 à 90°C selon les espèces. On le rencontre dans les sources chaudes marines, terrestres et les réservoirs pétroliers.

Thermodesulfobacterium est le plus thermophile des sulfato-réducteurs du domaine des *Bacteria*. Il combine des caractères d'*Archaea* et de *Bacteria* avec notamment des lipides possédant des liaisons éther.

Aquifex est un organisme chimiolithotrophe, autotrophe et hyperthermophile. Il croît de manière optimale à 85°C et utilise l'hydrogène (H₂), S⁰, ou le thiosulfate comme donneurs d'électrons, qu'il oxyde en présence d'oxygène ou de nitrate.

‡ Les bactéries vertes non sulfureuses

Le plus connu est un phototrophe anoxygénique : *Chloroflexus*. Ces organismes filamenteux forment des tapis microbiens dans des sources chaudes neutres, alcalines ou en milieu marin. Ils fixent le CO₂ par la voie de l'hydroxypropionate.

‡ *Deinococcus* / *Thermus*

Deinococcus est une coque Gram⁺, hétérotrophe aérobie. L'espèce la plus connue, *Deinococcus radiodurans* résiste à des radiations ionisantes à des doses allant jusqu'à 30 kGy. Dans cette même lignée phylogénétique, se trouve le genre *Thermus*, hétérotrophe aérobie. C'est de l'espèce *Thermus Aquaticus* que provient l'enzyme taq polymérase employée dans la technologie de PCR.

‡ Les spirochètes

Ces bactéries mobiles sont très répandues dans la nature et chez les animaux. Anaérobies ou aérobies facultatifs, ils peuvent être libres ou très liés à des animaux comme le genre *Cristispira* que l'on rencontre dans la tige cristalline des mollusques bivalves. Certains sont pathogènes et agents de maladies sexuellement transmissibles, comme la syphilis.

‡ Les bactéries vertes sulfureuses

Ce sont des phototrophes anoxygéniques, non mobiles. Elles peuvent utiliser l'hydrogène sulfuré comme donneur d'électrons, et l'oxyder en S⁰, puis en sulfate. Plusieurs espèces sont photohétérotrophes : elles utilisent la lumière pour l'obtention d'énergie, mais assimilent des composés organiques. Les pigments photosynthétiques sont localisés dans des structures nommées chlorosomes, réparties à la périphérie de la cellule et reliées à la membrane cytoplasmique. Le genre principal est *Chlorobium*, dont l'une des espèces, *C. tepidum* est thermophile.

‡ Les cyanobactéries

Autrefois nommées cyanophycées, ou algues bleues, les cyanobactéries sont bien des procaryotes du domaine des *Bacteria*, réalisant la photosynthèse oxygénique. Elles présentent une diversité morphologique considérable avec des formes unicellulaires ou filamenteuses. Au sein de filaments, certaines cellules sont différenciées ; il s'agit des hétérocystes impliquées dans la fixation de N₂. Les photopigments sont la chlorophylle a, la photocyanine, parfois de la photoérythrine. De nombreuses cyanobactéries planctoniques possèdent des vésicules de gaz assurant leur flottabilité.

‡ *Planctomyces*

Les représentants de cette lignée sont essentiellement des chimio-organotrophes aérobies facultatifs (respiration ou fermentation des sucres) vivant en milieu aquatique (eaux douces et salées). *Planctomyces* et *Gemmata* sont les genres les plus connus. La particularité de ce groupe est leur compartimentalisation : ils possèdent une structure interne qui, chez *Gemmata*, entoure complètement le nucléoïde, le séparant du cytoplasme.

‡ *Chlamydia*

Les *chlamydia* sont des parasites obligatoires, avec de faibles capacités métaboliques. On en connaît trois espèces : *C. psittaci* responsable d'une maladie des oiseaux. *C. trachomatis* qui provoque une maladie de l'œil et des infections du système urogénital, *C. pneumoniae* responsable d'infections respiratoires.

‡ Les firmicutes (Gram positif)

Deux grands ensembles sont distingués sur la table de la teneur en G+C des organismes : organismes à faible G+C et organismes à fort G+C.

○ Les firmicutes à faible G+C%

Plusieurs lignées appartiennent à cet ensemble des firmicutes à faibles G+C%. Par commodité, on les distingue sur des critères phylogénétiques, mais aussi morphologiques et métaboliques.

- Les coques Gram+

Il s'agit d'organismes aérobies, anaérobies facultatifs ou anaérobies stricts. *Staphylococcus* est un parasite de l'homme et des animaux et peut provoquer des infections sérieuses. *S. epidermis* est un micro-organisme de la peau, non pathogène. *S. aureus* est associé à diverses pathologies. Plusieurs souches sont résistantes à de nombreux antibiotiques.

- Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques produisent de l'acide lactique comme unique ou majoritaire produit de fermentation. On parle alors de bactéries homolactiques ou hétérolactiques.

Certaines bactéries lactiques ont une morphologie de coques. On distingue le genre *Streptococcus* dont certaines espèces sont pathogènes pour l'homme (*S. pyogenes*, *S. pneumoniae* qui affectent le tractus respiratoire ; *S. sanguis*, *mutans*, etc. qui jouent un rôle dans la formation des caries dentaires). Le genre *Enterococcus* correspond aux streptocoques d'origine fécale, tandis que le genre *Lactococcus* est utilisé dans l'industrie laitière. D'autres bactéries lactiques ont une forme de bâtonnets : ce sont les lactobacilles, en majorité homofermentaires, fréquents dans les produits laitiers, certaines souches étant utilisées pour la fabrication de produits laitiers fermentés comme les yaourts. D'autres espèces sont employées dans la préparation des choucroutes ou des condiments vinaigrés. Ces organismes peuvent se développer à des pH inférieurs à 5. Ils ne sont jamais pathogènes.

- *Listeria*

Phylogénétiquement proche de *Lactobacillus*, et préfère des conditions microaérobies. *L.monocytogenes* est à l'origine de maladies provoquées suite à la consommation d'aliments préparés et contaminés, comme le fromage ou la charcuterie.

- **Les mycoplasmes**

Les mycoplasmes se caractérisent par l'absence de paroi. Ce sont problèmes les plus petits organismes capables de croissance autonome. Ils ressemblent à des protoplastes, mais leurs membranes sont rigidifiées par des stéroïdes et parfois de longues chaînes d'hétéropolysaccharides nommés lipoglycans.

- **Les cellules sporulées**

Plusieurs types de bactéries Gram⁺ à faible G+C % ont la propriété de former des spores lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables. Toutes ces bactéries sont originaires du sol. Les espèces du genre *Bacillus* sont aérobies ou anaérobies facultatifs. Beaucoup produisent des enzymes extracellulaires pouvant dégrader les polymères complexes. Plusieurs espèces dont *B. thuringiensis* produisent des composés larvicides et sont employés dans la lutte biologique contre les insectes. *B. anthracis* est un pathogène, responsable de la maladie du charbon.

- *Clostridium*

Utilise uniquement un métabolisme fermentatif. Beaucoup fermentent les sucres en produisant de l'acide butyrique. D'autres produisent aussi de l'acétate et du butanol, cette fermentation étant utilisée industriellement. Anaérobies stricts, vivent dans les sols, mais aussi l'intestin des mammifères. Il existe des espèces pathogènes dont *C. botulinum* responsable du botulisme et *C. tetani* responsable du tétanos.

- Au sein des Gram⁺, les heliobactéries se distinguent par leur métabolisme phototrophe anoxygénique. Elles produisent des endospores similaires à ceux des *Clostridium* et des *Bacillus*.

o **Les firmicutes à fort G+C% ou actinobactéries**

Il s'agit d'un ensemble très diversifié sur le plan des morphologies ou des habitats. On y trouve des espèces utilisées dans l'industrie laitière ou la production des antibiotiques, mais aussi quelques pathogènes comme l'agent de la tuberculose.

- **Les corynébactéries**

Ce sont des bactéries immobiles, chimio-organotrophes aérobies. *Corynebacterium* et *Arthrobacter* sont les genres principaux. *Arthrobacter* vit essentiellement dans le sol. Ces organismes sont très versatiles et dégradent des substrats tels que des phénols, des herbicides, etc. Les espèces de *Corynebacterium* sont saprophytes des plantes, mais parfois aussi pathogènes des plantes, des animaux et de l'homme : *C. diphtheriae* est l'agent responsable de la diphtérie.

- Les propionobactéries

Le genre *Propionibacterium* est associé aux fromages de type « Emmental » ce sont des anaérobies fermentant l'acide lactique produit par les lactobacilles. Les produits de la fermentation, acide propionique et CO₂, sont à l'origine du goût et des trous (bulles de CO₂) de ces fromages.

- Les Mycobactéries

Les Mycobactéries sont représentées par le genre *Mycobacterium*, en forme de bacille, possédant une propriété de coloration caractéristique (nommée acido-alcool) résistante. *M. tuberculosis* ou bacille de Koch est l'agent responsable de la tuberculose.

- Les actinomycètes

Les actinomycètes comprennent un grand nombre d'espèces présentant une morphologie filamenteuse, souvent ramifiée, ressemblant à un mycélium. La plupart peuvent sporuler, mais selon un processus différent des *Bacillus*. Leur contenu en G+C est parmi les plus élevés connus chez les procaryotes : 63 à 78 %

- Les Streptomyces

Le genre des *Streptomyces* comprend plus de 500 espèces formant des filaments de longueur variable et de diamètre allant de 0.5 à 1 µm. Les *Streptomyces* sont essentiellement rencontrés dans les sols. Ils sont aérobies stricts et utilisent une grande diversité de sources de carbone organique (amidon, cellulose, protéines, graisses, hydrocarbures, caoutchouc, etc.). De nombreux *Streptomyces* produisent des antibiotiques, dont plusieurs dizaines ont une application en médecine vétérinaire et humaine.

‡ Les protéobactéries

Autrefois appelées bactéries pourpres, les protéobactéries sont, du point de vue phylogénétique, subdivisées en 5 catégories distinguées par les lettres grecques : alpha, beta, gamma, delta et epsilon. Toutes ont une paroi de type Gram⁻ et dans leur ensemble présentant une très grande diversité métabolique. On y trouve la majorité des bactéries Gram⁻ connues, d'importance significative dans les domaines médical, industriel, agricole ou environnemental.

‡ Les bactéries pourpres phototrophes

Les bactéries pourpres phototrophes réalisent la photosynthèse anoxygénique. Les pigments photosensibles sont des bactériochlorophylles, et parfois des caroténoïdes. Il s'agit d'un groupe morphologiquement diversifié.

‡ Les bactéries pourpres sulfureuses

Ces bactéries utilisent l'hydrogène sulfuré comme donneur d'électrons pour réduire le CO₂ au cours de la photosynthèse. On les trouve dans les zones anoxiques, mais exposées à la lumière, des habitats aquatiques où l'hydrogène sulfuré s'accumule, ainsi que dans les

sources sulfureuses ou ce gaz est produit de manière abiotique. Parmi les genres principaux, on peut citer *Chromatium* (S° intracellulaire, pas de vésicule de gaz), *Amoebacter* (S° intracellulaire, vésicules de gaz), *Ectothiorhodospira* (soufre extracellulaire).

‡ Les bactéries pourpres non sulfureuses

Ces bactéries utilisent bien H₂S, mais à faible concentration. Elles sont extrêmement diversifiées sur le plan métabolique. Parmi les principaux genres, on cite *Rhodospirillum* ou *Rhodobacter* (subdivision alpha) *Rhodocyclus* (subdivision beta).

‡ Les bactéries chimio-lithotrophes

Rassemblent des organismes des subdivisions alpha, beta ou gamma impliqués dans l'oxydation des composés azotés (nitrosante et nitratantes), des composés soufrés réduits (sulfo-oxydantes) ou du fer (ferro bactéries).

‡ Les hydrogénobactéries

L'hydrogène est une source d'énergie fréquemment employée par des protéobactéries des subdivisions alpha, beta ou gamma. Presque toutes sont des chimio-lithotrophes facultatifs, et certaines peuvent croître sur monoxyde de carbone.

‡ Les méthanotrophes et méthylotrophes

Ces organismes ont en commun d'oxyder des composés chimiques dits en C¹ (ne contenant qu'un seul atome de carbone). Les méthanotrophes oxydent le méthane et d'autres molécules en C¹. Les méthylotrophes oxydent des molécules en C¹, à l'exclusion du méthane, mais aussi des molécules plus complexes.

‡ Les pseudomonades

On rencontre dans cet ensemble des bacilles aérobies, mobiles par un flagelle polaire, chimio-organotrophes aérobies. Il existe des pathogènes de plantes dans le genre *Xanthomonas*, ou des pathogènes opportunistes de l'homme, comme *Pseudomonas aeruginosa*.

‡ Les entérobactéries

Il s'agit d'un groupe assez homogène appartenant à la subdivision gamma qui partage les caractéristiques suivantes : Gram⁻, non sporulés, mobiles, aérobies/anaérobies facultatifs, fermentant les sucres en une variété de produits de fermentation. De nombreuses espèces sont pathogènes pour l'homme, les animaux, les plantes ou ont une importance industrielle. C'est à ce groupe qu'appartient la bactérie la mieux étudiée au monde : *Escherichia coli*.

- *Escherichia, Salmonella, Shigella, Proteus*

Ces quatre genres réalisant la fermentation du glucose de type acides mixtes. Ce sont des habitants réguliers des tractus digestifs de l'homme et des animaux à sang chaud, mais non dominants dans ces habitats. *Salmonella* et *Escherichia* montrent en fait 50% de similitude ADN/ADN. Quelques souches d'*E. coli* sont pathogènes et provoquent des diarrhées ou des infections urinaires. Les *Salmonella* sont davantage pathogènes et responsables de typhoïde ou de gastroentérites. *Shigella*, qui présente 70 à 100 % de similitude ADN/ADN avec *E. coli*, est souvent responsable de dysenteries. *Proteus* est quant à lui responsable d'infections du tractus urinaire.

- *Enterobacter, Klebsiella, Serratia*

Ces trois genres réalisant la fermentation du glucose de type butanediol. *Enterobacter aerogenes* est commun dans l'eau, les tubes digestifs, les eaux usées. *Klebsiella* est commune dans l'eau et le sol. L'espèce *K. pneumoniae* est responsable de pneumonies chez l'homme. *Serratia* peut être isolée de l'eau de sols, du tube digestif de divers invertébrés. Elle est caractérisée par la production de pigments rouges non photosynthétiques appelés prodigiosines.

‡ Les vibrionacées

Il s'agit de bacilles droits légèrement incurvés, aérobies ou anaérobies facultatifs par fermentation, mobiles par flagelles polaires ou péritriches. On les rencontre dans les habitats aquatiques, dulçaquicoles et marins, avec deux genres principaux : *Vibrio* et *Photobacterium*.

Les *Vibrio* sont très souvent associés aux invertébrés et vertébrés marins. Plusieurs espèces sont pathogènes pour les mollusques (*V. tapetis*) ou les poissons (*V. anguillarum*). Il existe des pathogènes de l'homme dont *V. parahaemolyticus* et surtout le responsable du choléra *V. cholerae*.

On rencontre dans ce groupe de nombreuses bactéries bioluminescentes, essentiellement des *Photobacterium*. Beaucoup sont associées à des poissons et localisées dans les organes luminescents fréquents chez plusieurs poissons de grande profondeur (en fait, ce sont les bactéries qui produisent la lumière).

‡ Les rickettsies

Il s'agit de petites cellules en forme de coques ou de bacilles, parasites intracellulaire qui n'ont jamais été cultivés en l'absence des cellules hôtes. Elles sont à l'origine de diverses infections chez l'homme dont le typhus. Elles ne peuvent survivre longtemps en dehors de leurs hôtes et sont transmises d'un animal à l'autre par des arthropodes vecteurs.

‡ Les spirilles

Ces organismes mobiles caractérisés par des formes en spirale sont très variés sur le plan physiologique ou métabolique. Certaines sont symbiontes ou pathogènes des plantes ou des animaux. Les genres principaux sont *Spirillum* (subdivision beta), *Aquaspirillum* (alpha ou beta), *Oceanospirillum* (gamma). Certains spirilles sont magnétotactiques. Ces cellules

contiennent des chaînes de particules magnétiques formées d'oxydes de fer. Les genres *Campylobacter* et *Helicobacter* de la subdivision epsilon, sont également des spirilles. *Campylobacter* est responsable d'entérites aiguës et de diarrhées suite à l'action d'une entrérotoxine proche de celle du choléra. *Helicobacter* est impliqué dans des gastrites aiguës et chroniques provoquant des ulcères de l'estomac.

‡ Les bactéries gainées et pédonculées

- Les bactéries gainées sont des formes filamenteuses appartenant à la subdivision beta. Les cellules nageuses et flagellées s'empilent dans une longue gaine. En conditions défavorables, les cellules s'échappent, laissant une gaine vide. Dans de bonnes conditions, elles reprennent leurs divisions et s'entourent à nouveau d'une gaine. Elles sont fréquentes dans les milieux aquatiques, riches en matière organique comme les stations d'épuration. Les principaux genres sont *Sphaerotilus* et *Leptotrix*.

- Les bactéries pédonculées forment un groupe hétérogène appartenant à la subdivision alpha et présentant la particularité de former divers types d'excroissances cytoplasmiques, appelées selon le cas tiges, hyphes ou appendices. Le métabolisme de ces bactéries est varié. Ainsi, *Hyphomicrobium* et *Rhodomicrobium*, deux bactéries bourgeonnantes, sont respectivement chimio-organotrophes (aussi méthélotrophe) et phototrophes.

- *Caulobacter* et *Galionella* sont deux bactéries pédonculées communes. *Caulobacter*, chimio-organotrophe. *Galionella* est une bactérie ferro-oxydante, d'apparence torsadée. Sa tige n'est pas un prolongement cytoplasmique, mais une matrice extracellulaire organique dans laquelle s'accumule de l'hydroxyde de fer résultant de l'oxydation du fer ferreux.

‡ Les myxobactéries

Les myxobactéries (subdivision delta) se déplacent sans flagelle, par mobilité glissante, au contact d'une surface. Les cellules végétatives obtiennent leurs nutriments en lysant d'autres bactéries, qu'elles tuent parfois en sécrétant des substances antibiotiques. Sous certaines conditions, les cellules végétatives s'agrègent et forment des fructifications pouvant atteindre quelques dizaines de microns de hauteur. Ce sont des accumulations de cellules reliées à la surface par un pédoncule muqueux, et qui se transforment pour la plupart en myxospores, plus résistantes que les cellules végétatives à divers agents comme la dessiccation, la chaleur ou les UV.

‡ Les bactéries sulfato et soufre-réductrices

Les bactéries sulfato- réductrices sont très répandues dans les environnements aquatiques et terrestres contenant des sulfates, et qui deviennent anoxiques suite à la dégradation microbienne de composés organiques. On en distingue deux groupes. Le premier comprenant les genres *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfotomaculum* utilise le pyruvate, le malate, l'éthanol, tous ces composés étant oxydés jusqu'au stade de l'acétate. Le second groupe avec les genres *Desulfococcus*, *Desulfobacter* est spécialisé dans l'utilisation de l'acétate,

mais aussi du succinate et même du benzoate, jusqu'au stade du CO₂. Parmi les réducteurs de soufre, qui ne peuvent réduire les sulfates, se trouvent les genres *Desulfuromonas* ou *Desulfurella*.

VII. Chapitre VII : Contrôle des micro-organismes par les agents physiques et chimiques

VII.1 Contrôle et destruction des micro-organismes

Le contrôle et la destruction des micro-organismes est un sujet d'une immense importance pratique. Si la plupart des micro-organismes sont bénéfiques, certains peuvent avoir des activités aux conséquences indésirables, comme une détérioration de la nourriture ou une maladie. En conséquence, il est essentiel de pouvoir détruire une grande variété de micro-organismes ou d'inhiber leur développement de manière à minimiser leurs effets destructeurs. Le but est double : (1) détruire les agents pathogènes et empêcher leur transmission et (2) réduire ou éliminer les micro-organismes responsables de la contamination de l'eau, des aliments et d'autres substances.

Lorsqu'un milieu devient défavorable ou qu'un agent antimicrobien agit, la croissance s'arrête (action microbiostatique) puis survient la mort cellulaire suivie ou non d'une lyse (action microbicide).

La mort des micro-organismes est un phénomène naturel qui peut avoir plusieurs causes : absence de nutriments et épuisement des réserves, conditions physico-chimiques, action de produits toxiques autoformés ou provenant de l'extérieur, etc. L'élimination et la destruction des micro-organismes demandent la mise en œuvre d'agents antimicrobiens qui servent pour la stérilisation et la désinfection des matériels, des locaux, de l'eau et des aliments, etc.

Au niveau du laboratoire, les agents antimicrobiens sont utiles pour la sélection et l'identification de nombreuses espèces microbiennes : milieux d'isolement sélectifs, tests de résistance aux inhibiteurs, etc.

Par ailleurs, il existe des cas où la destruction accidentelle de micro-organismes utiles doit au contraire être évitée : fermentations industrielles, systèmes d'épuration, etc. Il est alors nécessaire d'éviter et de contrôler la présence d'agents antimicrobiens éventuellement présents.

VII.1.1 Lois générales de destruction et élimination

VII.1.1.1 Généralités

La destruction d'un micro-organisme est un phénomène mettant en jeu des réactions complexes. Ces réactions varient en fonction de la nature du micro-organisme, de son état physiologique et de la « dose » utilisée (concentration d'un produit chimique, temps d'exposition, etc.

○ Notion de mort microbienne

La mort d'un micro-organisme correspond à la perte irréversible de ses propriétés métaboliques et de son aptitude à la reproduction : elle peut être mise en évidence par l'absence de croissance sur un milieu adéquat. Les effets d'un agent antimicrobien ne sont pas instantanés et il existe toute une série d'états intermédiaires entre un micro-organisme vivant et un micro-organisme mort : ces « mauvais états » physiologiques peuvent évoluer irrémédiablement vers la mort ou être réversibles. La présence d'un milieu favorable (milieu de culture en laboratoire ou milieu naturel) permet le développement, et donc l'évaluation

lors d'une numération, des formes en « condition » optimale et des formes faiblement « abîmées ». Si le milieu est moins favorable (cas des milieux sélectifs), ces formes « abîmées » peuvent ne pas se développer et /ou mourir. Par contre, si le milieu est plus favorable (milieu de revivification, milieu riche), des formes très abîmées peuvent être régénérées. Il faut aussi tenir compte de la complexité de la cellule. L'effet d'un agent antimicrobien pourra dépendre d'un ensemble de réactions, certaines étant plus réversibles que d'autres. Le niveau de molécules indispensables inactivées ou dénaturées sera un élément déterminant : si ce niveau est élevé, il y aura mort cellulaire. Si ce niveau est faible et les réactions prédominantes réversibles, il y aura uniquement blocage de la multiplication, mais le germe restera vivant et pourra avoir par exemple une activité catabolique ou catalytique.

Le dosage de l'ATP est un moyen de détermination de la viabilité. La teneur en ATP, bien que variable, est toujours décelable dans une cellule vivante alors qu'elle est nulle dans une cellule morte. Par ailleurs, l'activité cellulaire peut être évaluée par détermination du rapport ARN/ADN qui peut être estimé par mesure de la fluorescence des acides nucléique (verte pour l'ADN, rouge pour l'ARN : ce rapport est faible dans les cellules mortes ou à l'état de vie latente et il est fort dans les cellules en pleine activité.

Chez les bactéries (et chez quelques autres micro-organismes), il faut prendre en compte la résistance l'existence de formes de résistance et il faudra traiter à part le cas des formes végétatives et celui des formes sporulées.

- **Notion de stérilité**

Un produit est qualifié de non stérile ou de septique s'il contient des micro-organismes ; il est qualifié de stérile s'il n'en contient pas (au moins sous forme vivante). L'asepsie est la propriété correspondante à l'absence de germes : ce terme est plutôt utilisé pour les manipulations. La stérilité stricte ou stérilité biologique se traduit par l'absence de toute forme de vie : il peut y avoir des organismes morts, c'est-à-dire en aucun cas revivifiables quelles que soient les conditions appliquées. La notion de stérilité peut cependant être élargie à des situations variées : dans certains cas, un milieu est considéré comme stérile s'il contient des formes non revivifiables dans les conditions habituelles mais revivifiables dans des conditions très particulières (par exemple des spores incapables de germer dans les conditions du milieu).

VII.1.1.2 Facteurs influençant la destruction microbienne

- **Nature et état du micro-organisme**

Les différentes espèces microbiennes ne sont pas également sensibles à un agent antimicrobien ; ce dernier est caractérisé par son spectre d'activité qui est plus ou moins large en fonction de l'activité vis-à-vis des différentes molécules biologiques. L'état physiologie de la bactérie joue aussi un grand rôle : les micro-organismes sont plus sensibles en phase exponentielle qu'en phase stationnaire vis-à-vis des antimicrobiens chimiques, le phénomène pouvant être inversé pour des agents physiques. Les formes sporulées sont beaucoup plus résistantes aux agents physiques. Les formes sporulées sont beaucoup plus résistantes aux agents physiques ou chimiques que les formes végétatives correspondantes. L'« âge » d'une culture est important de même que ses antécédents (condition de culture, facteurs nutritifs). Plus la charge initiale en micro-organismes sera élevée, plus le temps

nécessaire pour obtenir un niveau de destruction donné sera grand (conséquence de la loi logarithmique).

- **Nature de l'agent antimicrobien**

Les différents agents ont une efficacité et un spectre d'activité variables. Pour les agents physiques, l'activité microbicide augmente souvent avec la dose alors que pour les agents chimiques, les effets seront d'abord bactériostatiques puis bactéricides. L'activité de certains agents chimiques dépend de leur stabilité ; pour d'autres (hypochlorite de sodium, peroxyde d'hydrogène), l'activité est liée à leur décomposition.

- **Rôle de l'environnement**

L'environnement peut influencer considérablement l'efficacité des agents antimicrobiens physiques ou chimiques. Pour les agents chimiques, la solubilité dans l'eau est un facteur déterminant. Parmi les principaux facteurs jouant un rôle, on peut signaler : le pH du milieu, la turbidité, la viscosité, l'épaisseur (les UV ne sont actifs que sur quelques millimètres de profondeur en milieu limpide), la dureté de l'eau (les ions calcium et magnésium diminuent par exemple l'activité antimicrobienne des ammoniums quaternaires), les matières organiques (les protéines précipitent en présence d'alcool et le précipité formé empêche la diffusion de l'alcool ; les hypochlorites donnent, en présence de matières organiques des chloramines moins actives), etc. La température peut modifier l'action de certains agents antimicrobiens chimiques : la plupart des antibiotiques perdent leur activité à température élevée.

VII.2 Principaux agents antimicrobiens

VII.2.1 Généralités

VII.2.1.1 Critères de choix

Le choix d'un agent désinfectant est délicat. Ne sont évidemment utilisables dans l'industrie alimentaire ou le traitement de l'eau que les agents qui n'entraînent pas de toxicité. Ce problème, qui se pose peu pour les traitements physiques, est beaucoup plus aigu pour les traitements chimiques ou biochimiques. Plusieurs autres conditions sont généralement requises : large spectre d'activité adapté à la flore du produit, faible coût, facilité d'utilisation (utilisable à faible concentration, ou facilement éliminable par rinçage, ou ne laissant pas de sous-produits dangereux), absence de pouvoir corrosif, etc. L'addition de produits chimiques (agents de traitement désinfectants ou conservateurs) est sévèrement réglementée.

VII.2.1.2 Classification

Le rôle des agents antimicrobiens est d'inhiber la croissance des micro-organismes ou de les détruire. Il existe de nombreux moyens de lutte de nature physique, chimique ou biologique. Les principaux traitements sont classés en traitements d'élimination, de destruction et de stabilisation. Il faut distinguer les produits microbicides (ou germicides ou bactéricides) qui agissent par destruction (mort) des germes et les microbiostatiques (ou bactériostatiques) qui agissent sur leur développement (stabilisation). Les produits utilisés pour le traitement des eaux sont microbicides, alors que dans l'industrie alimentaire, on peut utiliser des agents, soit au cours de la fabrication (microbicides), soit dans le produit fini

(microbicides et stabilisants). L'utilisation de composés qui sont éliminés ou détruits après action peut être intéressante. Des produits chimiques sont utilisés aussi pour le nettoyage du matériel et des locaux.

On appelle désinfectants des agents capables de détruire les germes pathogènes (ou non) dans l'environnement (eau, sol, air, etc). Ce terme est généralement réservé aux substances agissant sur des objets inertes. Il est possible d'utiliser les désinfectants à concentration et temps de contact élevés. On appelle antiseptiques des agents capables de détruire les micro-organismes ou d'arrêter leur développement (agents microbicides ou microbiostatiques). Ils sont habituellement utilisés en action locale chez les êtres vivants. Les désinfectants et antiseptiques ne sont généralement pas administrés à l'homme par voie orale en raison de leur toxicité. On appelle agents de conservation ou conservateurs alimentaires des substances additionnées aux aliments : ils ne sont pas toxiques pour le consommateur aux doses utilisées. On appelle agents chimiothérapeutiques des substances actives sur les micro-organismes mais peu ou pas toxiques, aux doses employées, pour les autres cellules humaines ou animales et qui sont utilisées en médecine.

VII.2.2 Agents d'élimination

L'élimination des micro-organismes peut être obtenue par des procédés mécaniques. Le lavage est un moyen simple mais pas toujours efficace : des micro-organismes fixés ou « cachés » ne sont pas forcément éliminés. L'efficacité peut être améliorée à l'aide d'agents tensio-actifs ou de produits désinfectants (eau chlorée). La décantation (éventuellement après un traitement de floculation ou d'agglutination) et la centrifugation au-dessus de 5000 g permettent de diminuer la charge microbienne de produits liquides : ces traitements permettent de faciliter des traitements ultérieurs. La filtration est également utilisable à condition que le milieu ne soit pas visqueux et ne soit pas chargé de matières en suspension. Elle nécessite l'emploi de filtres organiques ou minéraux (filtre en céramique, verre frité, membranes en acétate de cellulose ou en matériaux divers) dont le diamètre des pores est inférieur aux dimensions des micro-organismes. L'avantage majeur de ces procédés est de ne pas modifier les qualités organoleptiques du produit traité.

VII.2.3 Agents physiques de stabilisation ou de destruction

En raison de leur faible spécificité, la plupart des agents physiques antimicrobiens sont efficaces sur l'ensemble des micro-organismes, en affectant les acides nucléiques ou les protéines.

○ Température : chaleur

L'utilisation de la chaleur est un procédé très efficace de destruction des micro-organismes. Très utilisés au laboratoire pour les milieux de culture et le matériel, les traitements thermiques sont à la base de la conservation de nombreux aliments mais ils ne sont pas adaptés au traitement industriel de l'eau.

La chaleur agit au niveau de l'agitation moléculaire. Elle provoque une augmentation de la vitesse des réactions métaboliques et de la vitesse de croissance, puis rapidement la dénaturation des composés microbiens et en particulier des protéines enzymatiques. On observe alors une diminution puis un arrêt de la croissance, puis quand le niveau de modification devient important et irréversible, la mort.

- La **pasteurisation** entraîne la « destruction » des formes végétatives, en particulier de celles des micro-organismes pathogènes ou responsables d'altérations organoleptiques, à l'exclusion de la plupart des formes sporulées bactériennes. Elle est obtenue par différents couples temps-température : 30 minutes à 60-65 °C, 10 minutes à 80°C, quelques secondes à 90°C, quelques fractions de seconde à une température >100°C (jusqu'à 140°C). La thermisation, traitement de 15 à 20 secondes à 63-65°C, est une pasteurisation incomplète qui ne fait que réduire une charge microbienne.

- La **stérilisation** par la chaleur correspond à un traitement permettant « d'éliminer » tous les micro-organismes (y compris sous forme sporulée). Les paramètres du traitement sont supérieurs à ceux de la pasteurisation et ils varient selon le produit entre 10 minutes à 15°C et 30 minutes à 121°C. Ils sont choisis en fonction de la flore à détruire et doivent tenir compte de la charge initiale. La stérilité obtenue peut être absolue ou « commerciale » (élimination des risques sanitaires et stabilisation). On emploie le terme *appertisation* dans l'industrie de la conserve pour qualifier une stérilisation par la chaleur couplée à un conditionnement étanche. Les micro-organismes tests, permettent de calculer ou de contrôler un barème de stérilisation, sont habituellement des germes « pathogènes » sous forme sporulée (*Clostridium botulinum*) ou des germes très thermorésistants.

- La **tyndallisation** est un traitement thermique équivalent à des pasteurisations répétées, séparées par des intervalles de 12 à 24 heures à des températures de 30 à 40°C. Au cours de la pasteurisation, seules les formes végétatives sont inactivées tandis que dans les intervalles, la plupart des spores thermorésistantes germent et sont sensibles à la pasteurisation suivante. Ce procédé est utilisé pour les milieux de culture fragiles.

○ **Température : froid**

Le froid entraîne le ralentissement de la croissance et des transformations microbiennes.

- La **réfrigération** qui utilise une température proche de 0° à 4 °C empêche la multiplication de nombreux germes mais pas celle des germes psychrophiles.

- La **congélation** à -18°C et la **surgélation** (-40 °C et même -80°C) permettent une stabilisation totale vis-à-vis des micro-organismes et entraîne une mortalité plus ou moins importante selon la nature des germes et la vitesse de refroidissement.

○ **Radiations électromagnétiques**

On appelle irradiation l'action de soumettre un produit ou un matériel à un rayonnement. Les rayonnements électromagnétiques couvrent une très large gamme de longueurs d'onde. On peut distinguer : les rayonnements infrarouges (>800 nm), les visibles (800 à 400nm), les ultraviolets (400 à 10 nm), les rayons X (10 à 0.1 nm), les rayons γ (0.1 à 0.001 nm), les rayons cosmiques (<0.001 nm).

Certaines radiations électromagnétiques détruisent les micro-organismes. Leur efficacité est liée à la puissance énergétique qui est fonction de la longueur d'onde : plus celle-ci est faible et plus la radiation est énergétique et donc efficace (mais plus dangereuse à utiliser). Des

effets directs se manifestent à partir des longueurs d'ondes inférieures à 300nm. Une irradiation ionisante est liée à la formation d'ions par perte d'électrons : ceci entraîne des dénaturations et donc un effet létal. Les rayonnements ultra-violetes ne sont que faiblement ionisants : ils sont peu pénétrants et ont une action plus décontaminant que stérilisante. Pratiques à utiliser, ils sont employés au laboratoire et dans certaines industries pour la désinfection d'atmosphères, de surfaces, de couches liquides minces. Les longueurs d'onde les plus utilisées se situent entre 260 et 270 nm. Les rayonnements X et γ sont très efficaces mais plus difficiles à utiliser : ils sont cependant employés dans les traitements d'ionisation. La dose d'énergie absorbée s'exprime en Gray ($1\text{Gy} = 1\text{ J/kg} = 10^2\text{ rad}$). La source de ces radiations est généralement la radioactivité du Cobalt $^{60}_{27}\text{Co}$ ou du Césium $^{137}_{55}\text{Cs}$ pour les rayons γ et le bombardement électronique d'une cible pour les rayons X (l'unité d'activité de la source est exprimée en becquerel Bq ou en curie Ci).

Il faut signaler que les micro-ondes, radiations électromagnétiques d'une longueur d'onde de 1 mm à 1 m, sont actives de manière indirecte. Elles provoquent l'agitation thermique des molécules polaires et en particulier de l'eau. L'élévation de température qui en résulte (et qui concerne l'eau intracellulaire) entraîne la mort des micro-organismes : les formes végétatives sont beaucoup plus sensibles que les formes sporulées.

○ Autres agents

Les radiations particulaires (par exemple β) sont parfois utilisées. Il s'agit d'électrons obtenus par effet thermoélectrique et qui sont utilisables pour l'ionisation.

Les **radiations soniques** ont des effets antimicrobiens à de faibles longueurs d'onde (ultrasons) : elles tuent les micro-organismes en suspension. Elles sont peu utilisées comme agents antimicrobiens et sont surtout utiles comme moyen de rupture des cellules ou d'extraction.

L'activité antimicrobienne des **hautes pressions** est intéressante malgré les problèmes techniques posés. Cette technologie est en plein développement et à des applications en industrie alimentaire.

VII.2.4 Agents chimiques de stabilisation et de destruction

Les agents chimiques antimicrobiens sont très nombreux mais ils ne peuvent pas tous être utilisés comme antiseptique ou désinfectants. Certains sont des poisons cellulaires très toxiques (cyanure). D'autres, tels que les antibiotiques et les sulfamides qui ont un rôle thérapeutique, ont un coût élevé. Le choix d'un antimicrobien dépend de l'usage auquel il est destiné, de son activité, de sa toxicité, de sa stabilité, de son pouvoir corrosif ou colorant, de son odeur, etc.

De nombreux polluants chimiques minéraux ou organiques ont une activité antimicrobienne qui gêne ou empêche leur dégradation et peut perturber le fonctionnement des systèmes d'épuration.

Il existe des réactions de résistance aux substances antimicrobiennes (métaux, antibiotiques, etc.) qui aboutissent à l'apparition de biotypes nouveaux.

VII.2.4.1 Mode d'action

Les antimicrobiens chimiques agissent selon divers mécanismes :

- altération (oxydation, hydrolyse, coagulation) des protéines ou dénaturation (perte d'activité) des enzymes. Les alcools coagulent les protéines. Les agents oxydant, les métaux lourds oxydent ou se combinent avec les groupements SH des enzymes ;
- altération (oxydation, hydrolyse) des acides nucléique activité mutagène. Des colorants (violet gentiane) ;
- altération de l'enveloppe cellulaire (paroi, membrane), il s'agit de l'hydrolyse de la paroi qui conduit à une destruction cellulaire sous l'effet de la pression osmotique (lysozyme) ou de la perturbation de la perméabilité cellulaire (agents liposolubles : phénol, savon, détergents) ;
- action sur d'autre grandes fonctions métaboliques comme la respiration (inhibée par le cyanure, l'azide, etc.), les actions de synthèse, etc.

VII.2.4.2 Principaux types d'agents chimiques**- Agents oxydants oxygénés**

Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (ou eau oxygénée) est un antiseptique efficace à 3% (10 volumes) en solution aqueuse. Son utilisation est limitée en raison de sa décomposition rapide et du fait que des micro-organismes catalase + sont résistants. Les perborates et les persulfates alcalins, qui en présence d'eau donnent du peroxyde d'hydrogène, sont utilisés en hygiène dentaire. L'ozone (O_3) est un produit utilisable pour la désinfection de l'eau. Le permanganate de potassium et le peroxyde de zinc sont également des oxydations désinfectantes.

- Chlore et dérivés

Le chlore gazeux et ses dérivés constituent les antiseptiques les plus communs qui sont employés pour le traitement des eaux de boisson, de piscine, pour la désinfection des locaux, d'objets contaminés, etc. Les formes gazeuses sont difficiles à manipuler. Les composés liquides tels que les hypochlorites et certaines chloramines sont plus utilisés. L'hypochlorite de sodium ($ClONa$: eau de javel) est généralement utilisé à 10°chlorométrique. Le dioxyde de chlore est employé pour la stérilisation et la désodorisation de l'eau. Les chloramines comme la clonazone ou la chloramine T permettent d'obtenir des actions plus durables mais leur efficacité est moindre. L'action est complexe : l'oxygène naissant et le Cl^+ tuent les micro-organismes, y compris les virus. Les formes sporulées sont plus résistantes (elles exigent des concentrations cent fois plus élevées). Le pH et la température jouent un grand rôle : le pH contrôle les équilibres entre chlore libre, acide hypochloreux, ion hypochlorite. L'acide hypochloreux est la forme la plus active.

- Autres halogènes : iode et dérivés

L'iode est peu soluble dans l'eau, mais facilement soluble dans l'alcool ou des solutions aqueuses d'iodure de potassium ou de sodium. Les solutions iodo-iodurées (iode et iodure) ou teintures d'iode sont utilisées pour désinfecter les plaies superficielles. Certains

détergents peuvent solubiliser l'iode et lui servir de support : iodophores (polyvinylpyrrolidone iodée= bétadine).

Le brome et ses dérivés peuvent sous certaines conditions être employés pour la désinfection de l'eau.

- Métaux lourds et sels

Certains métaux ont un effet microbicide même à faible concentration en raison des interactions qu'ils peuvent avoir avec les protéines cellulaires. Les sels de métaux lourds les plus utilisés sont les sels d'argent de mercure, de cuivre, de zinc. Certains sont utilisables pour la stérilisation d'eaux de piscine (argent, cuivre), d'autres pour des antiseptiques (mercurochrome, nitrate d'argent).

- Alcools

L'éthanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) présente un bon effet microbicide pour des dilutions de 50% à 70%. Il est inactif sur les formes sporulées. Il est utilisé comme désinfectant cutané, mais son action est superficielle : il dénature les protéines. Le méthanol est moins actif et plus nocif. Les alcools supérieurs (propylique, isopropylique, butylique, amylique) ont un pouvoir bactéricide qui augmente avec leur masse molaire, mais leur solubilité dans l'eau diminue parallèlement, ce qui limite leur usage. Les glycols sont des désinfectants de surfaces.

- Phénols, crésols, autres composés phénoliques et aromatiques

Le phénol et ses dérivés (hexachlorophène, crésol, créosote, résorcine, thiobisphénol) sont utilisés comme agents microbicides. Cependant ces produits sont relativement peu actifs en particulier sur les formes sporulées. L'action du phénol est atténuée en milieu alcalin et en présence de matières organiques. Certains antioxydants phénoliques (BHA : butylhydroxyanisole, BHT : butylhydroxytoluène, TBHQ : tributylhydroxyquinone) présentent des propriétés antimicrobiennes intéressantes. D'autres produits à cycle aromatique ont un bon pouvoir antimicrobien : chlorhexidine (antiseptique basique) salicylanilide, carbanilides.

- Colorants

Leur pouvoir antiseptique est variable. Ils sont utilisés pour des usages locaux ou généraux (désinfection des plaies, désinfectant urinaire). Ils jouent un grand rôle au laboratoire dans les milieux sélectifs. Les principaux sont : bleu de méthylène, vert malachite, vert brillant, violet de méthyle, violet de gentiane. Certains agissent en altérant la membrane, d'autres se complexent avec les acides nucléiques. Plusieurs ont une action sélective sur les bactéries : le cristal violet, le vert brillant, le vert malachite inhibent les bactéries Gram⁺ ; l'éthyle violet inhibe les *Bacillus* et sélectionne les *Enterococcus*.

- Savons et détergents

Les savons ont un pouvoir antiseptique qui varie en fonction des espèces. Leur action est liée à l'effet tensioactif : abaissement de la tension superficielle et augmentation du pouvoir mouillant de l'eau. On peut citer le ricinoléate de sodium ; les germes sont éliminés

par rinçage. Les détergents se classent en détergents anioniques et en détergents cationiques. Le pouvoir mouillant et émulsifiant des groupements cationiques lipophiles est élevé : ils sont bactériostatiques à faible concentration, stables et d'utilisation facile. Ils sont toxiques par ingestion et sont utilisés comme désinfectants de la peau ou pour le nettoyage et la désinfection du matériel.

- Acides, anhydrides, aldéhydes

Les acides ont une action antimicrobienne indirecte par effet du pH. En outre certains ont une action propre : acide acétique, benzoïque, propionique, sorbique. Des produits soufrés comme l'anhydride sulfureux (SO_2), les sulfites (SO_3), bisulfites (HSO_3), peuvent aussi être des agents très efficaces.

Les vapeurs de formaldéhyde obtenues par chauffage d'une solution diluée de formol ou de ces produits de polymérisation sont de bons agents antimicrobiens. Leur pouvoir bactéricide augmente avec la température et l'humidité. Pour la désinfection des locaux, on rajoute de l'ammoniaque pour diminuer la toxicité ; dans ces conditions, le formol donne avec l'ammoniac un composé inodore : l'hexamine. Le glutaraldéhyde (à 2% dans l'eau) est aussi un bon agent.

- Essences volatiles et huiles essentielles

Les essences naturelles ont un pouvoir bactéricide lié à la présence de composés phénoliques, d'alcools, etc. On peut citer les essences de girofle (désinfectant en chirurgie dentaire), de thym (antiseptique intestinal et respiratoire), d'eucalyptus (antiseptique des voies respiratoire), etc. Ces essences peuvent être remplacées par leur composé actif : eucalyptol, thymol, etc., utilisé parfois comme conservateurs alimentaires.

- Autre agents

Les solvants des lipides sont actifs sur certaines bactéries et les virus enveloppés (éther).

Des gaz sont employés pour la désinfection de produits instables à la chaleur et la désinfection de locaux ou d'objets. L'oxyde d'éthylène est gazeux à température ordinaire (il est inflammable) et liquide au-dessus de 10 °C. La β propionolactone liquide à température ordinaire émet des vapeurs très actives (vient cinq fois plus que le formol et mille fois plus que l'oxyde d'éthylène) : elle est utilisée pour stériliser des objets, des milieux de culture, etc. Elle est hydrolysée en milieu aqueux en acide β hydroxypropionique inactif.

VII.2.4.3 Agents chimiothérapeutiques

Ces produits sont surtout utiles en médecine. Ils jouent un grand rôle au laboratoire dans les milieux sélectifs, mais sont rarement utilisables en industrie alimentaire (nisine, subtiline, etc.). On appelle antibiotique toute substance chimique produite par un micro-organisme et capable d'inhiber le développement et de détruire les bactéries et d'autres micro-organismes. On utilise également les notions d'antimétabolite ou d'agent chimiothérapeutique (la plus large). Les antibiotiques sont produits par les bactéries (surtout actinomycètes) et les moisissures. Ils sont utilisés à l'état naturel ou sous forme de dérivés chimiques parfois plus actifs.

Les agents chimiothérapeutiques agissent à des concentrations très faibles (de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ils peuvent avoir des effets bactériostatiques (ou fongistatiques) ou des effets bactéricides (ou fongicides) c'est-à-dire létaux. A forte concentration, un antibiotique peut être toxique non seulement pour un micro-organisme, mais également pour l'homme. L'effet est variable en fonction de la nature du produit, de sa concentration et des conditions de l'environnement : à concentration faible, un produit peut être bactériostatique et il peut être bactéricide à concentration plus élevée. L'effet peut être bactériostatique si la culture n'est pas en phase exponentielle et bactéricide si elle y est. Un antibiotique se caractérise par son spectre d'activité : tous les antibiotiques n'agissent pas sur toutes les bactéries. Certains possèdent un spectre d'action antimicrobienne étroite, c'est-à-dire qu'ils agissent sur un éventail restreint d'espèces de microbes. La pénicilline G, par exemple, agit sur les bactéries à Gram positif mais sur peu de bactéries à Gram négatif. C'est pourquoi les antibiotiques qui influent sur une gamme étendue d'espèces bactériennes à Gram positif et à Gram négatif sont dits à large spectre. La figure (7.1) présente un résumé de leurs principaux mécanismes d'action.

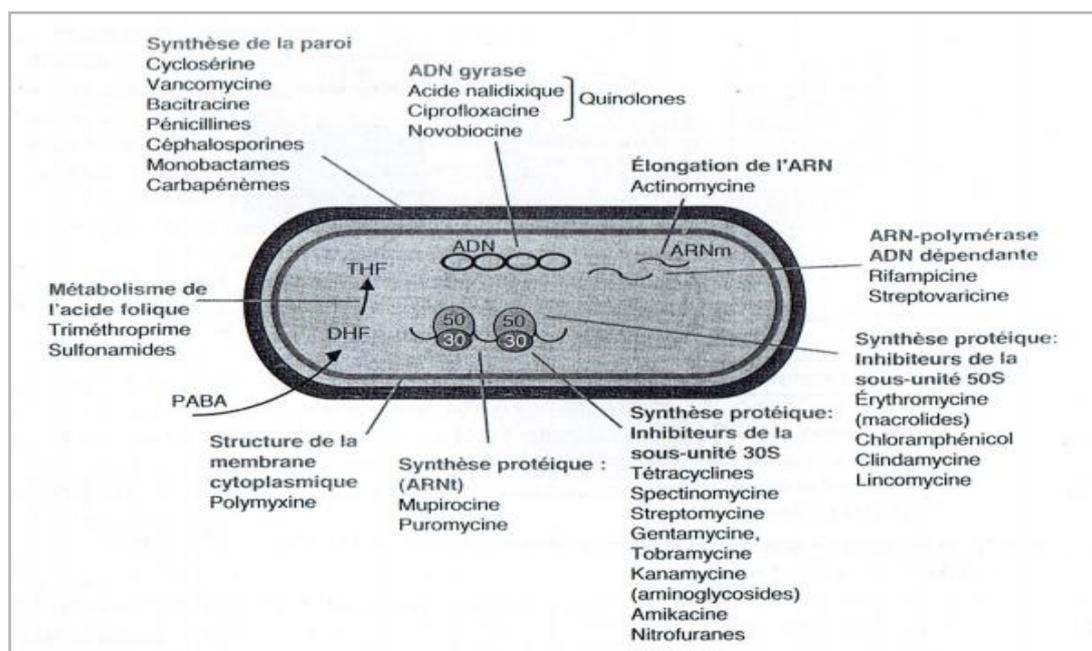


Figure 7.1 : Cibles des différentes classes d'antibiotiques. PABA.

Un antibiotique agit par :

- **Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire**

La paroi cellulaire bactérienne est composée d'un réseau macromoléculaire appelé peptidoglycane. Ce dernier se trouve seulement dans la paroi cellulaire des bactéries. Or, la pénicilline et d'autres antibiotiques empêchent la synthèse normale du peptidoglycane ; par conséquent, la paroi cellulaire est grandement affaiblie, et la cellule finit par se lyser. Puisque l'action de la pénicilline vise le processus de la synthèse, seules les cellules en croissance active sont touchées par ce type d'antibiotique. Et puisque la membrane des cellules humaines ne possède pas de peptidoglycane, la pénicilline n'a pas d'effet toxique direct sur la

cellule hôte. Outre les pénicillines, les antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi cellulaire sont les céphalosporines, la bacitracine et la vancomycine.

- **Inhibition de la synthèse des protéines**

Cibler les ribosomes, c'est perturber le processus de synthèse des protéines, les cellules eucaryotes possèdent des ribosomes 80S alors que les cellules procaryotes contiennent des ribosomes 70S. C'est sur cette distinction que repose la toxicité sélective des antibiotiques qui visent la synthèse des protéines. Cependant, les mitochondries (organites essentiels des cellules eucaryotes) ont aussi des ribosomes 70S similaires à ceux des bactéries ; certains antibiotiques qui s'attaquent aux ribosomes 70S prouvent donc entraîner des effets indésirables sur les mitochondries des cellules de l'hôte. Parmi les antibiotiques inhibant la synthèse des protéines bactériennes, on compte le chloramphénicol, l'érythromycine, la streptomycine et les tétracyclines..

- **Détérioration de la membrane plasmique**

Certains antibiotiques, en particulier les antibiotiques polypeptidiques, influent sur la perméabilité de la membrane plasmique des bactéries, ces modifications engendrent la rupture de la membrane et, par conséquent, la perte d'importants métabolites cellulaires. Par exemple, la polymyxine B provoque une rupture de la membrane plasmique en se fixant aux phosphoglycérolipides de cette dernière.

- **Inhibition de la synthèse des acides nucléiques**

Un certain nombre d'agents antimicrobiens et d'antiviraux compromettent le processus de synthèse de l'ADN et (ou) de l'ARN des cellules microbiennes et des virus. Toutefois, certains des médicaments procédant par ce mécanisme sont d'une utilité très limitée ; parce qu'ils exercent aussi une action sur l'ADN et l'ARN des cellules de mammifères. D'autres agents, tels que la rifampicine et les quinolones, sont employés plus couramment en chimiothérapie parce que leur toxicité est plus sélective.

- **L'inhibition de la synthèse des métabolites essentiels**

Il est possible d'enrayer une enzyme au moyen d'une substance qui ressemble à son substrat normal. La substance (appelée *antimétabolite*) agit par *inhibition compétitive*. La relation entre la sulfanilamide, qui est un antimétabolite, et l'acide para-aminobenzoïque (PABA) est un exemple de cette forme d'inhibition. Chez beaucoup de microbes, le PABA est le substrat normal de la réaction enzymatique qui aboutit à la synthèse de l'acide folique, vitamine jouant le rôle de coenzyme dans la synthèse de certains constituants des acides nucléiques et de certains acides aminés. En présence de sulfanilamide, l'enzyme transformant habituellement le PABA en acide folique se combine avec l'antimétabolite plutôt qu'avec le PABA. La formation de ce complexe prévient la synthèse de l'acide folique et, par conséquent, bloque la croissance du microbe. Parce que les humains ne produisent pas d'acide folique à partir du PABA – ils l'obtiennent sous forme de vitamine dans les aliments qu'ils ingèrent-, la sulfanilamide présente une toxicité sélective. Parmi les agents chimiothérapeutiques qui agissent comme antimétabolites, on compte les sulfones et le triméthoprime.

VII.3 Détermination de l'activité antimicrobienne

VII.3.1 Notion de germe test

On utilise des micro-organismes pathogènes « modèles » comme témoins d'efficacité d'un traitement : *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et parfois même des virus (virus de la poliomyélite pour le traitement de l'eau). On utilise *Salmonella typhi* pour les désinfectants, *Staphylococcus aureus* pour les antiseptiques lors de la mesure du coefficient phénol, *Clostridium sporogenes*, *Bacillus stearothermophilus* pour la chaleur.

VII.3.2 Détermination des doses actives d'un agent antimicrobien

VII.3.2.1 Mesure du coefficient phénol

Il s'agit de comparer l'activité d'un antiseptique avec celle du phénol en présence d'un germe test. Pour cela, on réalise des dilutions du produit à tester à raison de 5 mL par tube et on ajoute 5 gouttes d'une culture fraîche de la souche test. On prélève une goutte dans chacun des tubes à des temps variables (deux à quinze minutes) et on l'inocule dans un bouillon nutritif. La même opération est réalisée avec des dilutions de phénol. Après 48 heures à 37 °C, on note la dilution la plus élevée du désinfectant et celle du phénol qui tuent les germes en 7.5 et non en 5 minutes. Le coefficient phénol est égal au rapport entre la dilution du désinfectant et celle du phénol. Dans les conditions opératoires décrites, *Salmonella typhi* est tuée en 10 minutes par le phénol dilué au 1/90, mais résiste 5 minutes. *Staphylococcus aureus* survit cinq minutes dans du phénol dilué au 1/60.

VII.3.2.2 Méthode des porte-germes

Le porte-germes est constitué d'une bandelette de papier filtre. Il est immergé dans une culture d'un germe test. En général, séché 24 heures à 37°C, il est mis en contact avec le désinfectant pendant des durées croissantes. La survie ou la destruction du germe est mise en évidence par immersion du papier préalablement séché dans un bouillon nutritif et par essai de culture.

VII.3.2.3 Détermination des doses minimales inhibitrices et bactéricides

La construction des courbes de croissance *in vitro* en présence de concentration croissante en agents antimicrobiens permettent de définir des concentrations limites : la concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la concentration pour laquelle on n'observe pas de croissance visible ; la concentration inhibitrice 50% correspond à une croissance égale à la moitié de la croissance du témoin et la concentration minimale bactéricide (CMB) correspond à la concentration permettant de tuer tous les micro-organismes (en fait, si au bout d'un temps t on a au moins 4 réductions décimales).

VII.3.2.4 Détermination de la sensibilité *in vitro* aux antibiotiques

Des dilutions croissantes d'antibiotiques dans un milieu de culture liquide sont ensemencées avec le germe à étudier. On détermine la concentration en antibiotiques inhibant la croissance. On peut aussi utiliser un milieu solide. Des disques imprégnés de l'antibiotique à tester sont déposés sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée par étalement. Après culture, on mesure le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance autour des disques, ce qui permet de déterminer la CMI. Ces méthodes sont adaptables à d'autres substances bactéricides.

Références Bibliographiques

- Baudry, C., & Brezellec, H. (2006).** Microbiologie – Immunologie- Cahier du Préparateur en Pharmacie, 2^e édition. 126p.
- Boulahbal, F. (1986).** Manuel bactériologie médicale et générale. Office des publications universitaires, Alger. 170p.
- Cristian, C. (2008).** Microbiologie hygiène – Bases microbiologiques de la diététique. Lavoisier. 431p.
- Daniel Prieur, C. G., Claire, G. & Christopher, P. (2015).** Mini manuel de microbiologie, 2^e édition, Dunod, Paris. 431p.
- Gottschalk, G. (1986).** Bacterial metabolism, 2nd edn, Springer, New York. 208-282 p.
- Guiraud, J.P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. 614p.
- Hart, T., & Shears, P. (1997).** Atlas de poche de Microbiologie. Flammarion, Paris. 317p.
- Nicklin, J. K., G.- C., T. Paget & R. Killington. (2000).** L'essentiel en microbiologie. Berti, Paris, 365p.
- Paolozzi, L., & Liébart, J. C. (2015).** Microbiologie – Biologie des procaryotes et de leurs virus. Dunod, Paris. 512p.
- Prescott, Willey, J. M. Sherwood, L.M. & Woolverton, C.J. (2013).** Microbiologie, 4^e édition. De Boeck, Bruxelles. 1070 p.
- Rossignol, J. (1978).** Abrégé de génétique, 2^e édition, Masson, Paris. 252p.
- Russel, P. J. (1981).** Cours de génétique de la biologie moléculaire aux lois de Mendel. MEDSI, Médecine. 292 p.
- Singleton, P. (2005).** Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies, 6^e édition, Dunod, Paris. 542p.
- Stansfield, W. D. (1995).** Génétique cours et problèmes. 2^e édition, McGraw-Hill Inc., Paris. 398p.
- Tortora, G.J., Funke, B. R. & Case, C. L. (2012).** Introduction à la microbiologie. 2^e édition. 630p.