

MICROBIOLOGIE GENERALE

1. INTRODUCTION

La microbiologie est une sous-discipline de la biologie basée sur l'étude des organismes trop petits pour être vus à l'œil nu, les microorganismes et des relations avec leur environnement. Les microorganismes encore appelés microbes ou protistes, forment un ensemble d'organismes vivants microscopiques, invisibles à l'œil nu. C'est leur seul point commun, car ils diffèrent et varient par leur morphologie, leur structure, leur physiologie, leur mode de reproduction et leur écologie. Leur taille est généralement inférieure à un millimètre : ils doivent être observés au microscope (photonique ou électronique) et cultivés dans des milieux permettant leur croissance et leur isolement.

Les microorganismes (« microbes », « germes ») constituent un groupe extrêmement diversifié d'organismes microscopiques, unicellulaires et répartis dans les trois domaines du vivant (bactérie, archées et eucaryote).

Les virus sont considérés comme des microorganismes non vivants, acellulaires, puisqu'ils ne peuvent accomplir aucune activité vitale avec autonomie. Cette absence de structure cellulaire, de métabolisme et de croissance fait qu'on ne peut pas les considérer véritablement comme des êtres-vivants.

Le développement des microscopes a été la première étape essentielle dans l'évolution de la discipline. Mais la microscopie toute seule est incapable de répondre aux nombreuses questions que posent les microbiologistes à propos des microorganismes. Une caractéristique typique de la microbiologie est que les microbiologistes retirent souvent les microorganismes de leur habitat normal et les cultivent en les isolant ainsi des autres organismes. C'est ce qu'on appelle la culture pure ou axénique. Le développement des techniques d'isolement des microorganismes en cultures pures a été une autre étape importante dans l'histoire de la microbiologie. Toutefois, les microorganismes en culture pure ressemblent en quelque sorte à des animaux dans un zoo. Au même titre qu'un zoologiste ne peut entièrement comprendre l'écologie des animaux en étudiant ces derniers dans des zoos, les microbiologistes ne peuvent entièrement comprendre l'écologie des microorganismes en culture pure.

Historique

Même avant qu'on ait vu les microorganismes, plusieurs chercheurs suspectaient leur existence et leur rôle dans les maladies. Toutefois, jusqu'à ce qu'on n'est parvenu à observer ou étudier les micro-organismes, leur existence était matière à conjectures. C'est pourquoi la microbiologie se définit non seulement par les organismes qu'elle étudie, mais aussi par les outils utilisés pour les étudier.

Le concept ou théorie de la génération spontanée a existé pendant plusieurs dizaines de siècles. Selon cette théorie, les organismes vivants naissaient de végétaux et d'animaux en décomposition grâce à une mystérieuse force vitale.

ANTONIE VAN LEEUWENHOEK (1632-1723) est considéré comme le véritable découvreur du monde microbien. Il a employé le terme « animalcules » pour qualifier les diverses formes présentes dans des échantillons d'eau, des décoctions de foin ou dans la salive. Il apporta au monde scientifique de précieux témoignages de ce nouvel univers. Mais, sans réelle formation scientifique, il n'en tira aucune théorie. Il a observé à maintes reprises des cellules, mais à aucun moment il ne s'interrogea sur l'universalité de cette structure.

Le mérite d'avoir publié les premiers dessins de microorganismes dans la littérature scientifique revient à l'Anglais ROBERT HOOKE (1635-1703).

L'Italien LAZZARO SPALLANZANI, Professeur de sciences naturelles fut le premier à cultiver des microorganismes dans des bocaux contenant des jus de viande. Il montra que ces « jus » n'étaient troublés par les animalcules que s'ils conservaient un contact avec l'air et s'ils n'avaient pas été bouillis auparavant. Ce fut pour lui un argument pour réfuter la théorie de la génération spontanée.

Le médecin allemand ROBERT KOCH (1843-1910) a démontré la relation directe entre une bactérie et une maladie en étudiant la tuberculose et son agent *Mycobacterium tuberculosis*. Pour affirmer cette causalité, il faut vérifier plusieurs critères rassemblés sous le nom de « Postulats de Koch ».

- Le microorganisme doit être présent chez les sujets malades et absents chez les sujets sains.
- Le microorganisme doit être isolé et cultivé en culture pure ;
- À partir des cultures pures on doit être en mesure de provoquer la maladie par inoculation expérimentale ;
- Le même microorganisme doit être de nouveau isolé chez des malades expérimentaux.

Cependant, le concept de la génération spontanée restera très ancré dans les esprits jusqu'en 1861, à partir de cette année, le chimiste français LOUIS PASTEUR (1822-1895), partisan de la biogenèse (Théorie biologique, opposée à celle de la génération spontanée, et selon laquelle

un être vivant ne peut provenir que d'un autre être vivant) prit en charge cette question. Il montra que la génération spontanée n'existe pas. Il affirma la biogenèse (que l'apparition de vie dans une solution non vivante provient de la contamination par des microorganismes présents dans l'air). Cette prouesse lui vaudra le prix de l'Académie des sciences en 1862.

PASTEUR prouva que, sans contact avec l'air ambiant, ou du moins avec les « poussières » que contient cet air, un liquide organique stérile ne se troublait pas, aucun germe ne s'y développait. Au contraire, dès que ces « poussières » pouvaient toucher le liquide, il se troublait. C'était donc bien de l'extérieur que les êtres vivants microscopiques pouvaient s'introduire dans un milieu. C'est en reprenant des travaux plus anciens, en les précisant, en y apportant plus de rigueur, en les expérimentant, que PASTEUR a donné à la microbiologie de solides bases sur lesquelles s'appuieront tous ses successeurs. LOUIS PASTEUR reste le grand spécialiste des microorganismes.

Toutefois, d'autres scientifiques célèbres ont aussi contribué à l'évolution de la microbiologie. Il s'agit notamment de:

- JOHN TYNDALL (physicien irlandais), en 1877 découvrit des spores, leur thermorésistance et mit au point la tyndallisation.
- WINOGRADSKY 1856-1953 (russe) a travaillé sur les bactéries nitrifiantes, les bactéries fixatrices de l'azote, les bactéries sulfureuses et la décomposition bactérienne de la cellulose dans les sols.
- BEIJERINCK 1851-1931 (allemand), a travaillé sur les bactéries fixatrices de l'azote, les bactéries symbiotiques.
- HANS CHRISTIAN JOACHIM GRAM 1853-1928 (danois) a développé une technique de coloration qui est encore aujourd'hui la plus utilisée dans l'étude et la classification des bactéries.

La microbiologie est devenue une science à part entière, lorsqu'on a réussi à obtenir des cultures pures, grâce au développement des milieux de culture gélosés (solides) et les boîtes de Petri. Aussi, grâce à la fabrication de microscopes plus puissants que les premières loupes et l'élaboration de colorations spécifiques.

2. NATURE ET ETENDU DU MONDE MICROBIEN

La microbiologie est divisée en plusieurs branches, en fonction du type de « microbe » étudié

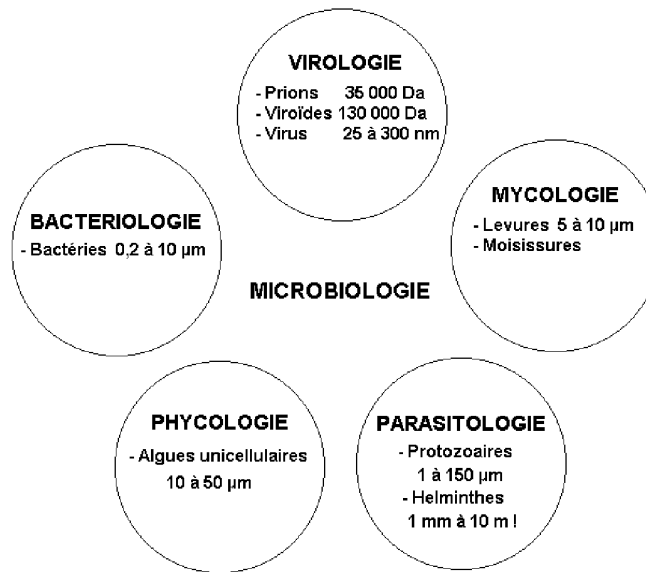


Figure 1: les différentes branches de la microbiologie

2.1. Les groupes de microorganismes

Les microorganismes comprennent deux grands groupes : les microorganismes procaryotes et les microorganismes eucaryotes

2.1.1. Les microorganismes procaryotes

Ils sont repartis en 3 sous-groupes :

2.1.1.1. Archaeobactéries.

Les archées forment le groupe le moins bien connu. Longtemps classées parmi les bactéries du fait de leur apparence similaire, de récentes analyses de leurs génomes ont montré qu'elles sont en fait aussi éloignées des bactéries que des eucaryotes au niveau évolutif.

Au vu des conditions terrestres lors de l'apparition de la vie, on suppose que Luca (acronyme anglais pour *Last Universal Common Ancestor*), le dernier ancêtre commun des êtres vivants, était une cellule proche de ces archées.

2.1.1.2. Eubactéries : 3 groupes :

- cyanobactéries (ancien nom : algues bleues)
- bactéries photosynthétiques
- bactéries non photosynthétiques.

2.1.1.3. virus = structure non cellulaire : acaryote.

Chez ces microorganismes l'organisation cellulaire est simple, c'est à dire sans noyau, l'ADN portant l'information génétique est directement au contact du cytoplasme. Les bactéries appartiennent à ce groupe.

Les procaryotes sont les formes de vie prédominantes sur notre planète. Cinq millions de quadrillions ($5 \cdot 10^{30}$, soit un poids de $50 \cdot 10^{24}$ tonnes) de bactéries, et une quantité aussi impressionnante d'archées et de virus, c'est le nombre estimé de ces organismes. Sur notre planète, les procaryotes règnent donc sans partage, par leur nombre et leur masse, mais surtout par leur extraordinaire capacité de colonisation, c'est-à-dire d'adaptation à des conditions physico-chimiques invivables pour tout être vivant plus complexe. Ils sont présents dans tous les sols et tous les milieux aquatiques, sous toutes les latitudes, et même sur ou dans d'autres organismes. Diversifiés sont leurs styles de vie, de physiologie et de capacités nutritionnelles. Aucune source de molécules carbonées organiques ou minérales naturelles, et de nombreuses molécules artificielles, qui ne puissent potentiellement être exploitées avec grande efficacité par une autre espèce. La moitié du carbone organique présent sur Terre et près de 90 % de l'azote et du phosphore organiques seraient contenus dans des cellules procaryotes. Ils sont les principaux agents de recyclage de la matière organique morte, et sont par conséquent au centre de toutes les réactions biogéochimiques qui perpétuent le monde vivant. Les dizaines de milliers d'espèces de bactéries et d'archées, et leurs nombreuses sous-espèces (souches), constituent un réservoir énorme de biodiversité, très sous-exploré. À ce jour, seules 11000 espèces de bactéries et 5000 espèces d'archées ont été identifiées mais leur nombre est probablement de plusieurs millions. Seul un (très) petit nombre d'espèces, voire de souches, ont été étudiées, essentiellement dans des conditions de laboratoire, c'est-à-dire totalement artificielles et largement simplifiées par rapport aux habitats naturels.

La validité universelle des données obtenues, même confirmées par leur cohérence et leur généralisation à travers d'autres espèces, peut donc être questionnée. La diversité de leur style de vie est liée à leur énorme diversité génétique. Leur relative simplicité a fait des génomes procaryotes les premiers à aider à l'élucidation (rendre compréhensible, plus clair) des mécanismes moléculaires fondamentaux du monde vivant. Les connaissances acquises sur ces génomes (structure, organisation et fonctionnement, processus de leur évolution) sont d'une importance fondamentale pour comprendre l'essence de la vie, et son origine. En outre, elles sont potentiellement riches en retombées dans des secteurs très variés, de la médecine aux diverses biotechnologies, y compris la biologie synthétique, le grand défi de la biologie du $xx^{\text{ème}}$ siècle.

2.2. Les microorganismes eucaryotes

Chez ces microorganismes l'organisation cellulaire est plus complexe et comporte un noyau contenant l'information génétique, portée par l'ADN des chromosomes.

Encore appelés (« protistes »), ils comprennent : des algues unicellulaires, dont la cellule ressemble à la cellule végétale ; des champignons microscopiques et des protozoaires, dont la cellule ressemble à la cellule animale.

2.2.1. Les algues unicellulaires ou microalgues

Les algues unicellulaires sont capables, comme les végétaux supérieurs, d'utiliser la lumière comme source d'énergie. Elles sont autotrophes et pratiquent la photosynthèse, grâce à leurs pigments, dont le plus important est la chlorophylle. Elles comprennent :

2.2.1.1. Les Rhodophycophytes ou « algues rouges ». Ces algues peuvent absorber la lumière, même à plus de 100 mètres de profondeur. Elles sont connues pour la production des polymères (agar, carraghénanes...).

2.2.1.2. Les Pyrrophycohytes ou dinoflagellés, organismes des eaux douces, eaux saumâtres (eaux constituées d'un mélange d'eau douce et d'eau de mer), marines tempérées et chaudes. Elles possèdent deux flagelles et sont généralement entourées d'une thèque cellulosique. Il existe de très nombreuses espèces et certaines sont luminescentes tandis que d'autres sont toxiques (Dinophysis, Gymnodinium).

2.2.1.3. Les Euglenophycophytes, retrouvés principalement dans les eaux douces riches en matières organiques, elles sont proches des protozoaires car certaines espèces sont capables de se nourrir par absorption de molécules organiques voir même par phagocytose. Ils possèdent un ou deux flagelles insérés dans un réservoir, invaginé dans la cellule.

2.2.1.4. Les Chrysophycophytes, diatomées (ou Bacillariophyceae) sont protégées par une coque siliceuse (la frustule) et se déplacent par émission de mucus. Elles forment la majeure partie du plancton dans les mers froides et constituent les principaux producteurs primaires de ces habitats.

2.2.1.5. Les Chrysophyceae, surtout algues d'eau douce. De nombreuses espèces se nourrissent de manière hétérotrophe. Elles possèdent un flagelle antérieur et un flagelle postérieur.

2.2.1.6. Les Chlorophycophytes ou « algues vertes », les espèces du genre *Chlamydomonas* sont mobiles grâce à deux flagelles identiques et possèdent un organite sensible à la lumière.

Certaines microalgues sont directement toxiques pour la faune aquatique. D'autres espèces, peu toxiques pour la faune marine, synthétisent des substances qui sont accumulées au niveau

du tube digestif principalement chez les mollusques. Ces substances rendent ces derniers impropres à la consommation humaine en raison d'une toxicité plus ou moins importante. Si des intoxications périodiques liées à la consommation de coquillages ont été décrites depuis très longtemps, la mise en évidence d'une relation entre la présence de certaines espèces de microalgues dans l'eau où vivent les mollusques et leur toxicité date des années 1970.

2.2.2. Les protozoaires

Les protozoaires sont des organismes unicellulaires hétérotrophes. Ils sont extrêmement diversifiés tant au niveau des structures cellulaires que du point de vue écologique. Quatre groupes importants seront abordés ici.

2.2.2.1. Les Rhizopodes, ces microorganismes, dont les amibes forment des prolongements cytoplasmiques, les pseudopodes, servant à la locomotion et à la nutrition. Exemples: *Entamoeba histolytica* et *Escherichia coli*, responsables de diarrhées et de douleurs abdominales, suite à la consommation d'eau contaminée.

2.2.2.2. Les Flagellés, qui possèdent un ou plusieurs flagelles permettant leur déplacement. Exemples: *Trypanosoma*: responsable de la maladie du sommeil. *Leishmania*, parasite intracellulaire qui s'attaque aux globules blancs et aux organes lymphoïdes (rate, moëlle rouge, ganglions lymphatiques). *Trichomonas vaginalis*, responsable des infections urogénitales (Leucorrhées). *Giardia lamblia*, responsable de diarrhées. *Giardia lamblia*, parasite intestinal responsable de diarrhées.

2.2.2.3. Les Ciliés (ou « infusoires »), ces cellules sont recouvertes de cils dont les battements permettent la locomotion, apportent les particules alimentaires et renouvellent le dioxygène. Les paramécies occupent de nombreux milieux, notamment les eaux stagnantes. Ce sont de grandes cellules (>150 µm) avec deux noyaux, (un petit et un grand). Exemple: *Balantidium coli* est responsable de dysenterie.

2.2.2.4. Les Sporozoaires, qui sont des parasites intracellulaires, dont le cycle comprend plusieurs phases. Exemples: *Plasmodium falciparum*, agent du paludisme. *Toxoplasma gondii*, responsable de la toxoplasmose.

2.2.3. Les champignons microscopiques

Les champignons microscopiques regroupent les moisissures et les levures.

3. CHAPITRE II: MORPHOLOGIE DES CELLULES MICROBIENNES

3.1. Morphologie de la cellule procaryote : la cellule bactérienne

La taille d'une bactérie est de l'ordre du micromètre ($1\ \mu\text{m} = 10^{-6}\ \text{m}$). Exceptionnellement, bactéries (*Thiomargarita* et *Epulopiscium*) sont visibles à l'œil nu.

Les plus petites bactéries ont une taille similaire à celle des plus grands virus tandis que les plus grandes atteignent la taille de certaines algues unicellulaires. Quelques exemples :

- *Mycoplasma pneumoniae* : $0,2\ \mu\text{m}$; - *Escherichia coli* : $1 \times 2\ \mu\text{m}$
- *Treponema pallidum* (Spirochète) : $0,1 \times 10\ \mu\text{m}$; - *Oscillatoria* (Cyanobactérie) : $7\ \mu\text{m}$

Les bactéries se présentent sous deux formes : sphérique (coques : cocci) et cylindrique (en bâtonnet), concerne les coccobacilles bacilles (bacilles courts à extrémités arrondies).

Les spirochètes ont une forme spiralée, les actinomycètes sont filamenteux (comme le mycélium des moisissures).

Selon leur mode de division, les espèces bactériennes forment des arrangements caractéristiques appelés groupements (figures 1 a et b), observables au microscope photonique, et utiles au laboratoire pour le diagnostic.

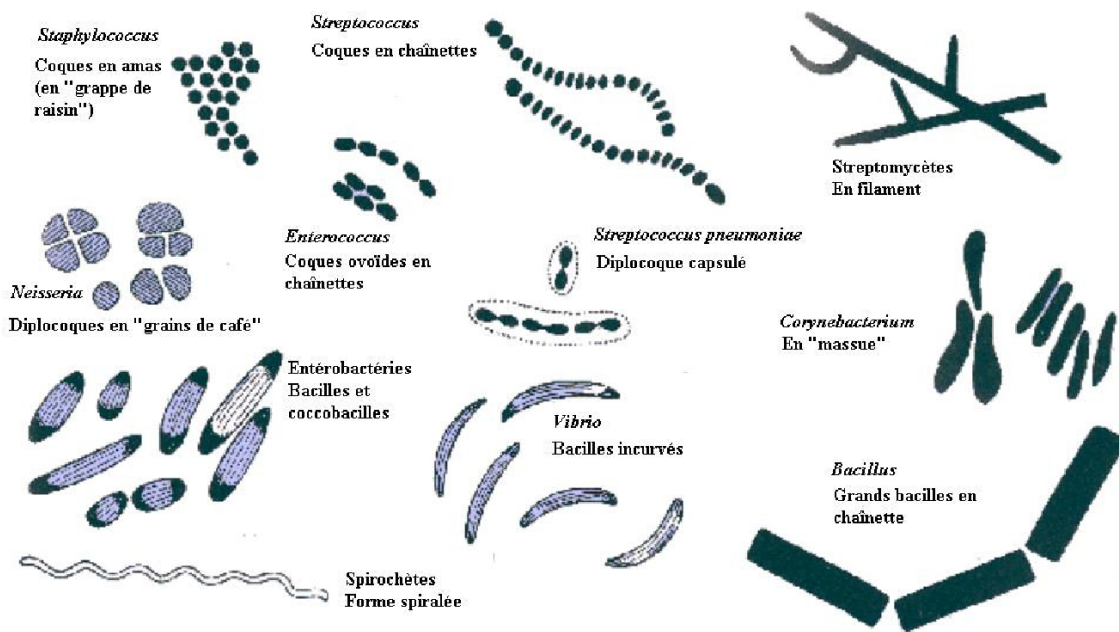


Figure 2 : Formes et groupements chez les bactéries

3.2. Morphologie de la cellule des archées

La taille et la forme des archées sont généralement semblables à celles des bactéries, bien que certaines espèces d'archées présentent une forme inhabituelle, comme *Haloquadratum walsbyi*, qui est plate et carrée.

3.3. Morphologie de la cellule eucaryote :

Les cellules eucaryotes sont généralement de taille plus importante.

3.3.1. Morphologie de la cellule des champignons microscopiques

Les champignons filamenteux sont composés d'un appareil végétatif appelé thalle. Le thalle peut être unicellulaire (levures) ou filamenteux (moisissures). Certaines levures sont toutefois capables de former des structures filamenteuses (pseudomycéliums) dans certaines conditions. Les levures ont une taille généralement comprise entre 10 et 50 μm . Leur forme peut être sphérique, ovoïde, allongée, cylindrique... Leur thalle est dit lévuriforme. Il est composé de filaments ou hyphes enchevêtrés les uns par rapport aux autres, et l'ensemble des hyphes constituent un réseau appelé mycélium. Les hyphes sont diffus, tubulaires et fins avec un diamètre compris entre 2 et 15 μm et sont plus ou moins ramifiés.

Les moisissures sont pluricellulaires, chez certaines moisissures, comme par exemple *Mucor*, les cellules ne sont pas séparées par une cloison transversale, le thalle est alors dit coenocytique ou « siphonné » alors que chez d'autres, comme par exemple *Aspergillus*, le thalle est cloisonné ou « septé » (Figure 3). Les cloisons, appelées septé possèdent des perforations assurant la communication entre les cellules. Les caractéristiques morphologiques de ces microorganismes sont liées à leur substrat nutritif. La colonisation du substrat est réalisée par extension et ramification des hyphes.

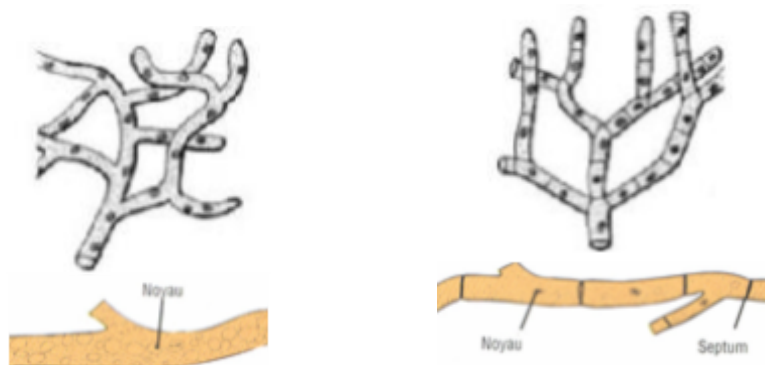


Figure 3 : Structure de l'hyphe. (A) hyphe coenocytique, (B) hyphe cloisonné

I CHAPITRE 1: STRUCTURE DES CELLULES MICROBIENNES

Les cellules microbiennes ont de nombreux points communs et présentent de nombreux éléments ou fonctions identiques. Elles possèdent toutes une barrière, appelée membrane cytoplasmique, séparant le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire. C'est à travers cette membrane que les nutriments et autres composés nécessaires à son fonctionnement pénètrent la cellule, et que les déchets et les autres produits cellulaires vont en sortir. À l'intérieur de la cellule se trouve le cytoplasme, un mélange complexe de substances et de structures cellulaires, délimité par la membrane cytoplasmique. Ces différents éléments intracellulaires, contenus ou dissous dans l'eau, sont responsables du fonctionnement de la cellule.

Les principaux composés dissous dans le cytoplasme comprennent des macromolécules (avec en particulier deux classes très importantes : les protéines et les acides nucléiques), de petites molécules organiques (principalement les précurseurs des macromolécules) et divers ions inorganiques. Les ribosomes responsables de la synthèse protéique sont des particules en suspension dans le cytoplasme, composées d'acides ribonucléiques (ARN) et de diverses protéines. Au cours d'un processus clé, la synthèse protéique, les ribosomes interagissent avec des protéines cytoplasmiques, des ARN messagers et des ARN de transfert.

La paroi cellulaire, localisée à l'extérieur de la membrane cytoplasmique, est relativement perméable et permet de maintenir la structure de la cellule. Cette paroi est d'ailleurs plus rigide que la membrane cytoplasmique. Les cellules microbiennes ont des parois cellulaires.

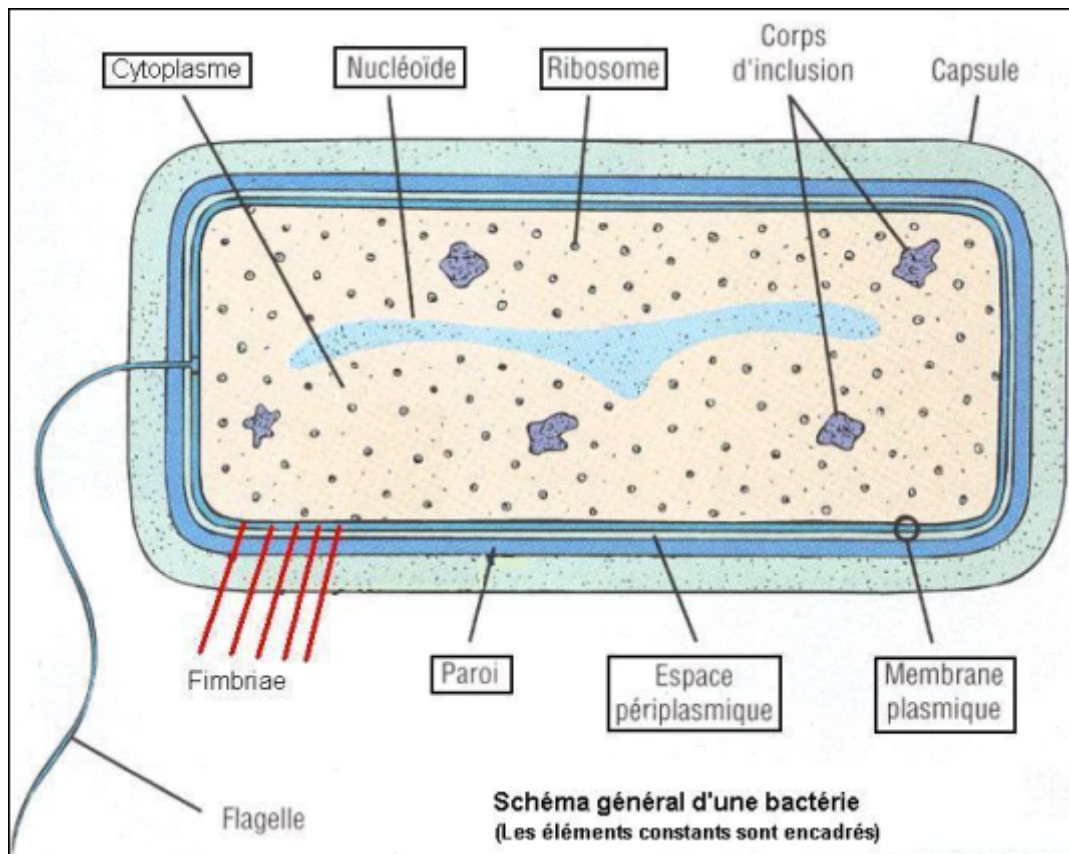
1.1. Structure de la cellule procaryote

1.1.1. Structure de la cellule bactérienne

Une cellule bactérienne est composée d'éléments constants, présents chez quasiment toutes les bactéries et d'éléments facultatifs, observés ou non en fonction des espèces (Tableau 1, Figure 4).

Tableau : Eléments constants et éléments facultatifs, observés ou non en fonction des espèces bactériennes.

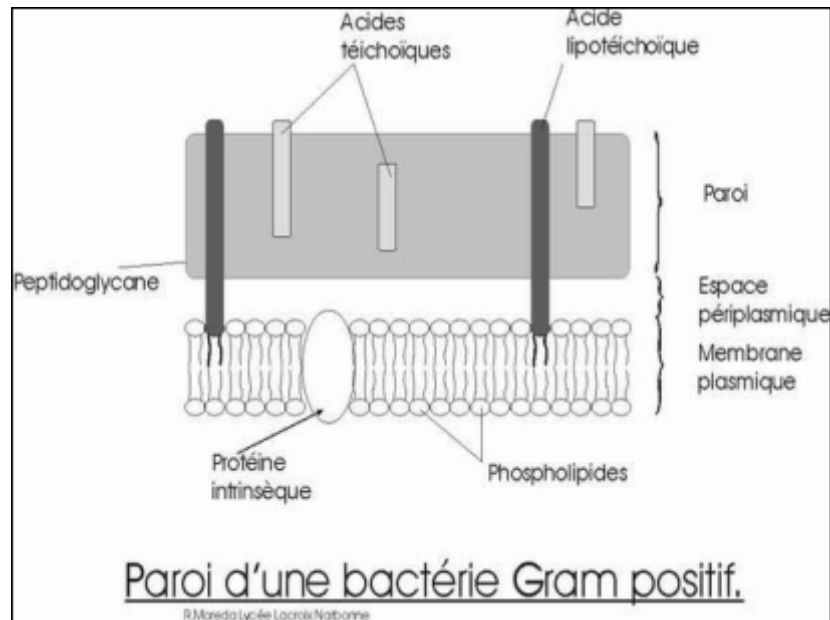
Les éléments constants	Les éléments facultatifs
Le chromosome bactérien (constitué d'ADN)	La spore (forme de résistance)
Le cytoplasme (le "liquide cellulaire")	La capsule (couche entourant la paroi)
Les ribosomes (présents dans le cytoplasme)	Les flagelles (permettant aux bactéries de se déplacer)
La membrane plasmique (délimitant la cellule)	Les pili sexuels (intervenant dans la conjugaison)
La paroi (enveloppe rigide protégeant la cellule)	Les fimbriae (rôle d'adhésion aux cellules de l'hôte)



1.1.1.1. La paroi

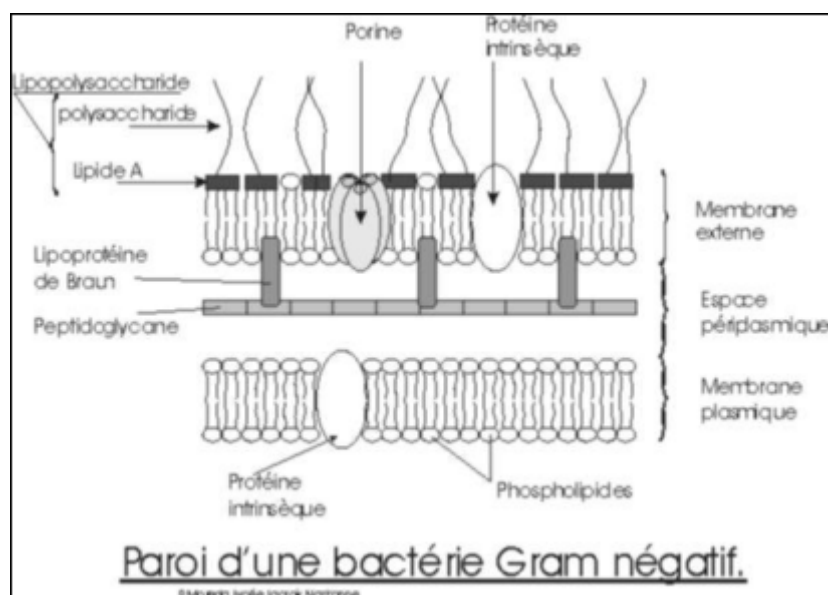
La coloration de Gram permet la mise en évidence de deux grands types de bactéries : les bactéries dites « Gram positives » d'une part, les bactéries « Gram négatives » d'autre part. Les premières apparaissent violettes au microscope photonique, colorées par le complexe violet de gentiane - lugol ; tandis que les secondes apparaissent roses, car le violet combiné à l'iode a été éliminé par l'éthanol puis la fuchsine a permis la contre coloration. Les constituants de la paroi déterminent le degré de perméabilité à l'éthanol de la paroi. La microscopie électronique et l'analyse chimique ont permis de révéler l'architecture et la composition des deux types de paroi.

La paroi des bactéries Gram positives (Figure 5) est épaisse et homogène. Elle est constituée principalement de peptidoglycane. Des polysides, les acides teichoïques et lipoteichoïques (associés à la membrane plasmique par liaison avec les glycolipides) traversent cette couche de peptidoglycane. D'autres polysides (polyside C) ou des protéines (protéine M) chez les streptocoques, protéine A et récepteur du fibrinogène chez *Staphylococcus aureus* peuvent être associés à la paroi.



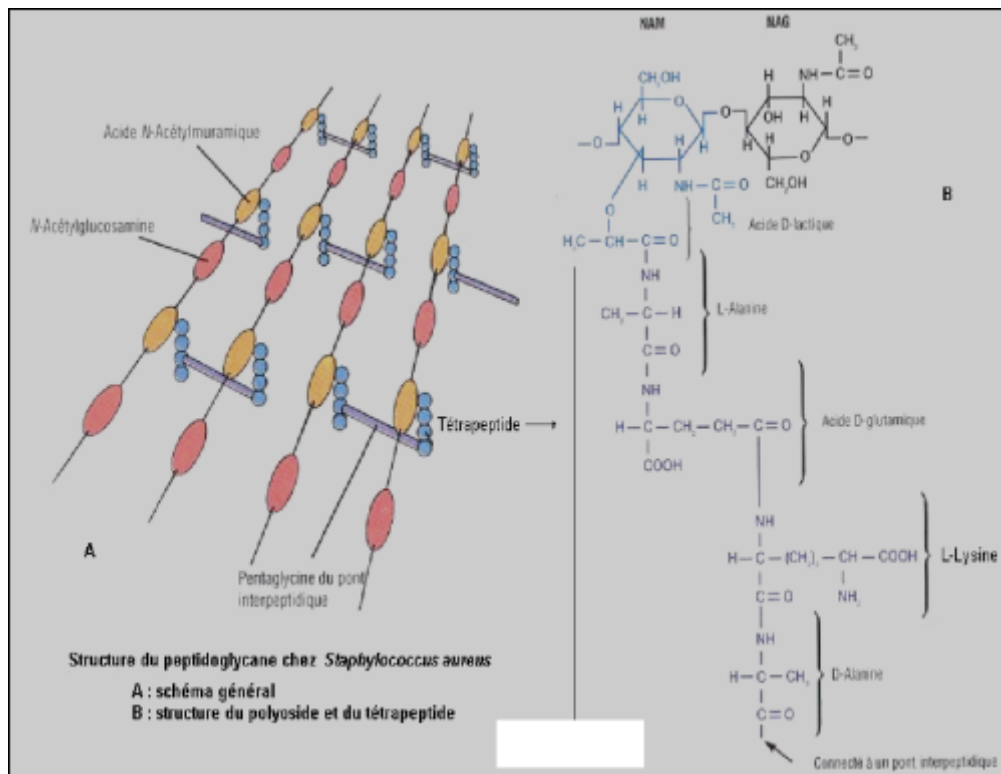
La paroi des bactéries Gram négatives (Figure 6) est plus complexe : une fine couche de peptidoglycane est recouverte par une membrane externe. La lipoprotéine de Braun est liée au peptidoglycane par liaison covalente d'un côté, elle est « enfouie » dans la membrane externe par son extrémité hydrophobe de l'autre côté. La membrane externe est constituée d'une double couche de phospholipides, de lipopolysaccharides (LPS) et de protéines (OMP : « outer membrane protein ») permettant le passage de petites molécules, les porines. Le LPS correspond à l'endotoxine des bactéries Gram négatives. Il est constitué de trois parties :

- la chaîne latérale O, contenant de nombreuses unités osidiques répétées et déterminant la spécificité antigénique (antigène O) ;
- le polysaccharide central (ou « core ») ;
- le lipide A, enchâssé dans la membrane externe et support de la toxicité de la molécule.



Le constituant commun à toutes les parois bactériennes est la muréine (peptidoglycane ou mucopeptide). Il s'agit d'un hétéropolymère complexe, une macromolécule constituée formé de 3 éléments différents (Figure 7):

- un polymère de N-acétyl glucosamine (NAG) et d'acide N-acétyl muramique (NAM),
- des chaînes latérales peptidiques, composées de 4 acides aminés attachées à l'acide N-acétyl muramique ;
- un ensemble de ponts interpeptidiques reliant les tétrapeptides entre deux polyosides.



Le peptidoglycane est synthétisé par des enzymes situées dans le cytoplasme, la membrane plasmique et l'espace périplasmique. Certaines de ces enzymes, appelées protéines liant la pénicilline (PLP ou PBP), sont la cible des antibiotiques de la famille des β -lactamines (pénicillines et céphalosporines), qui inhibent la synthèse du peptidoglycane. Les transpeptidases, qui assurent la réticulation entre les chaînes, font partie des PLP.

La paroi possède également des propriétés antigéniques (Ag O du LPS, polyoside C, protéine M, acides teichoïques...), et des sites de fixation des bactériophages (virus bactériens)...

1.1.1.2. La capsule

L'observation au microscope photonique d'une suspension bactérienne en présence d'encre de Chine, révèle chez certaines espèces (*Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella* sp., *Bacillus anthracis*, certaines souches d'*E. coli*...) montre la présence d'un halo clair et brillant autour

des cellules. Cette enveloppe supplémentaire, si elle est dense et compacte, est appelée capsule. Chez les bacilles à Gram négatif, cela se traduit macroscopiquement sur milieu solide par la formation de colonies de type M (« muqueux »).

La nature chimique de la capsule est généralement polyosidique : acides polyaldobioniques (ose + acide uronique) chez le pneumocoque, polymère de glucose et de rhamnose chez *Clostridium perfringens*...

Chez les *Bacillus* par contre, la capsule est de nature polypeptidique (acide poly-D-glutamique chez *B. anthracis*).

La nature des constituants de la capsule (polyosides ou polypeptides) détermine la spécificité antigénique d'une souche bactérienne, désignée par son sérotype (ou sérovar).

Les bactéries capsulées résistent à la phagocytose (et à l'opsonisation).

D'autres fonctions sont attribuées à la capsule :

- adhésion aux surfaces (milieux naturels et hôtes animaux) ;
- résistance aux bactériophages ;
- résistance à la dessiccation ;
- résistance à certains agents antimicrobiens...

La couche S est une enveloppe polypeptidique plus fine que la capsule retrouvée chez certaines bactéries à Gram positif (*Bacillus*) et à Gram négatif (*Aeromonas*). Ses rôles sont similaires à ceux de la capsule.

1.1.1.3. Les polymères extracellulaires

Les polymères extracellulaires (exopolysaccharides essentiellement) ne sont pas toujours organisés en structure compacte comme pour la capsule. Ils peuvent prendre la forme d'un glycocalyx, pellicule qui assure l'adhésion aux surfaces ou l'attachement entre bactéries (de la même espèce ou non) dans les biofilms (plaque dentaire, bactéries intestinales, obstruction ou corrosion de conduits...). Les exopolysaccharides bactériens ne restent pas toujours liés à la surface cellulaire, ils peuvent être libérés dans le milieu environnant.

Tableau 2 : Quelques applications industrielles des polymères microbiens

Polymères	Microorganismes producteur	Applications
Cellulose	<i>Acetobacter xylinum</i>	Production de membranes acoustiques
Curdlane (_-1,3 glucane)	<i>Agrobacterium, Rhizobium</i>	Gel alimentaire
Pullulane (_-D-glucane)	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Film d'emballage alimentaire
Gellane	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Agent gélifiant dans les produits cosmétiques
Xanthane	<i>Xanthomonas campestris</i>	Additif alimentaire
Dextrane	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Agent défloculant pour l'industrie du papier
Variés	<i>Lactococcus, Lactobacillus</i>	Industrie laitière (viscosité du produit fermenté, prébiotiques)

1.1.1.4. Les endospores

Certaines bactéries (*Bacillus, Clostridium*) sont capables de former une unité sphérique ou ovale, douée d'une grande résistance à des environnements hostiles. Les spores bactériennes sont relativement difficiles à colorer, mais leur observation au microscope photonique est possible, lorsqu'elles sont encore présentes dans les sporanges (cellule végétative dans laquelle la spore est formée) :

- À l'état frais, la spore est fortement réfringente à l'intérieur de la cellule mère ;
- Après coloration de Gram, la spore apparaît incolore alors que le reste de la cellule est violet (parfois rose, même chez les bacilles à Gram positif) ;
- après coloration à chaud au vert de malachite puis contre coloration à la fuchsine, la spore apparaît verte alors que le reste de la cellule est rose.

La position de la spore dans le sporange peut être centrale, subterminale, ou terminale (Figure 8). Si le diamètre de la spore > diamètre de la cellule mère, la spore est dite déformante.

La microscopie électronique permet la révélation de l'ultrastructure de la spore : l'appareil nucléaire, « baignant » dans le cytoplasme sporal, il est protégé par plusieurs enveloppes :

la membrane plasmique ; la paroi (constituée principalement de peptidoglycane) ; le cortex, couche épaisse composée de peptidoglycane et de dipicolinate de calcium ; les tuniques (interne et externe), de nature protéique, imperméables et résistantes ; l'exosporium, couche externe non essentielle, composée de lipoprotéines.

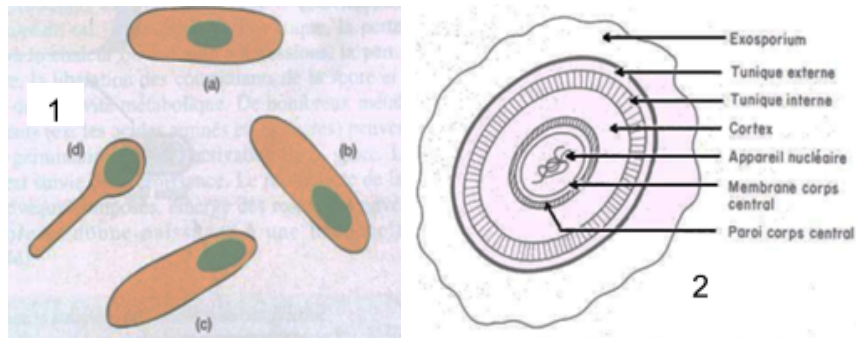


Figure 8 : (1) Différentes localisation des endospores (a) spore centrale, (b) spore subterminale, (c) spore terminale et (d) spore terminale avec sporange gonflé. (2) Structure de la spore bactérienne

La sporulation, déclenchée par des facteurs environnementaux (appauvrissement du milieu en nutriments, accumulation de substances défavorables pour la croissance...), conduit à la formation d'une spore libre contenant un génome identique à celui de la cellule mère mais dont les activités métaboliques sont « en sommeil » : la spore est dormante, jusqu'à ce que les conditions redeviennent favorables. Cependant, le lever de la dormance n'intervient que si les tuniques sporales sont partiellement rompues par un agent mécanique, physique ou chimique (activation), afin de permettre la réhydratation de la spore (initiation). Les détails du cycle sporal sont donnés dans la figure 9.

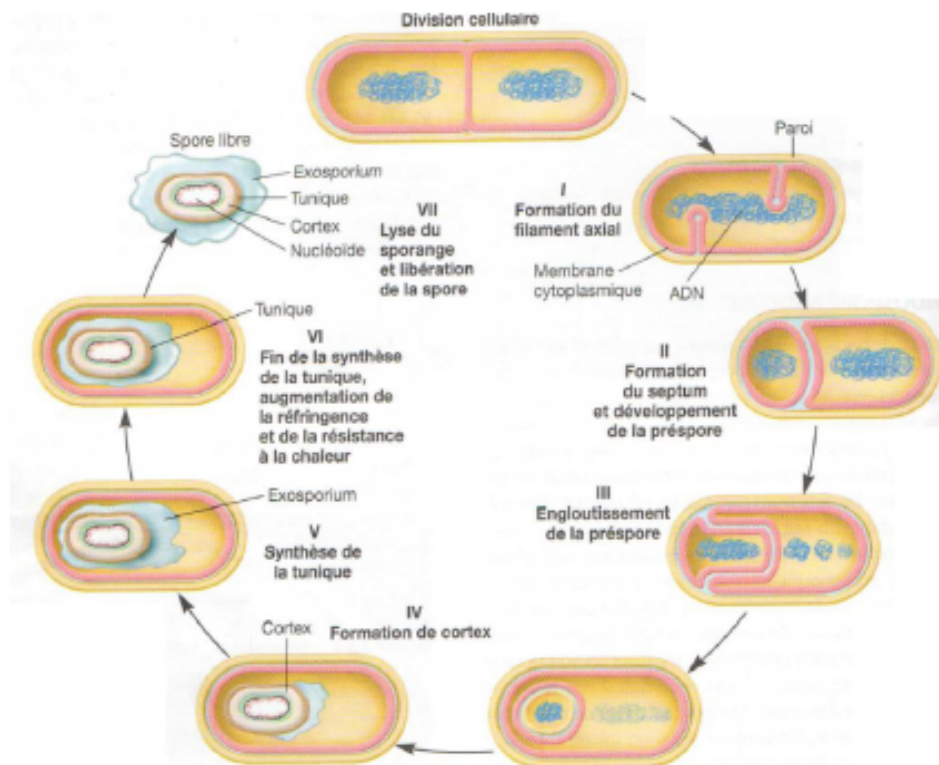


Figure 9 : Le cycle sporal

Les spores bactériennes sont pauvres en eau (seulement 15 à 20 % du poids de la spore, 80 % pour une cellule végétative). Cet état déshydraté leur confère une grande résistance à la chaleur (les protéines et les acides nucléiques résistent fortement à la dénaturation thermique dans ces conditions). Le dipicolinate de calcium, présent dans le cortex, contribue à cette thermorésistance. Un chauffage prolongé à 100°C est insuffisant pour éliminer les spores bactériennes. La destruction des spores de *Clostridium botulinum* n'est obtenue qu'au bout de 20 min à 120° C avec la chaleur humide (10 min à 180° C avec la chaleur sèche). La présence de spores de bactéries pathogènes (*Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *C. tetani*, *C. difficile*, *Bacillus cereus*, *B. anthracis*) dans les hôpitaux ou les industries alimentaires pose donc problème compte tenu des difficultés rencontrées pour les éliminer.

Les spores assurent la survie des bactéries face à d'autres traitements physiques ou chimiques : elles sont capables de résister aux UV, RX aux désinfectants, antiseptiques et antibiotiques... La durée de vie d'une spore bactérienne est très longue : plusieurs dizaines à plusieurs centaines d'années.

Les endospores bactériennes, formes de résistance, ne doivent pas être confondues avec les spores des moisissures ou des Actinomycètes (bactéries filamenteuses), qui sont des formes de dissémination.

1.1.1.5. Les flagelles

De nombreuses bactéries sont mobiles car elles disposent d'un (ou plusieurs) appendice (s) locomoteur(s), le (s) flagelle (s). Un flagelle, dont le diamètre est d'environ 20 nm et dont la longueur est comprise entre 10 et 20 µm, est constitué :

- d'un corps basal, lui même formé d'un axe central et de deux ou quatre anneaux reliés à la membrane plasmique ou à la paroi ;
- d'un crochet ;
- d'un filament, structure cylindrique dont le constituant majeur est la flagelline, protéine de 30 000 à 60 000 Daltons.

Les flagelles ne sont pas directement visibles au microscope photonique car ils sont trop fins. Il est nécessaire de les « épaisir » grâce à des techniques de coloration spéciales (technique de Leifson : acide tannique + fuchsine). Le nombre et la localisation des flagelles permettent de distinguer plusieurs types de ciliature (Figure 10), dont la mise en évidence constitue parfois un critère d'identification important (chez les bacilles à Gram négatif en particulier).

Nombre de flagelle(s)	Position	Bactérie
(1)		Monotriche
(1)	Extrémité	Monotriche polaire
(2)	1/extrémité	Amphitriches
Plrs (touffe)	1 ou 2 extrémités	Lophotriches
Plrs	sur toute la surface	Peritriche

Nb: Spirochètes = présence de flagelles périplasmiques format un filament axial

A



A-Monotriche polaire

B



B-Lophotriche

C



C-Amphitriche

D



D-Péritriche

Figure 10 : Schéma de la localisation des flagelles chez les bactéries

L'examen microscopique à l'état frais (réalisé à partir d'une culture en milieu liquide) permet, en fonction de la mobilité observée, de distinguer ciliature polaire (déplacement rectiligne et rapide avec des changements de direction brusques) et ciliature péritriche (déplacement désordonné et rotations de la bactérie sur elle-même).

Le « moteur » du mouvement flagellaire est le corps basal : un des anneaux est fixe (rôle de « stator »), un autre est en rotation (rôle de « rotor ») : il met en mouvement le reste du flagelle. La source d'énergie de ce système provient directement d'un gradient de protons : le flux de protons à travers l'anneau « rotor » entraîne la rotation de celui-ci (on estime la consommation de protons à 256 par tour).

Les bactéries changent de direction (« culbute ») par une inversion brève du sens de rotation du (des) flagelle(s). En présence d'un gradient de concentration en substance nutritive, on observe que le mouvement devient orienté selon le gradient : ce phénomène est appelé chimiotactisme positif. Une bactérie peut également « fuir » en présence d'un composé répulsif (chimiotactisme négatif). C'est la diminution de la fréquence de culbute qui permet l'orientation du mouvement. La détection des substances attractives et répulsives est assurée par des chimiorécepteurs.

Les flagelles ont également des propriétés antigéniques : la spécificité antigénique repose sur le nombre et sur la séquence en acides aminés des protéines qui composent le flagelle. Chez les bacilles à Gram négatif, les flagelles sont les supports des antigènes « H ». La classification des salmonelles par Kauffman-White repose sur ces propriétés (la détermination du sérovar en particulier).

1.1.1.6. Les pili

Les pili « communs » ou fimbriae, sont des appendices plus courts et plus rigides que les flagelles fréquents chez les bacilles à Gram négatif. Ce sont de minces tubes composés de sous-unités protéiques (piline, 17 kDa), arrangées en hélice. Comme les flagelles, ils possèdent des propriétés antigéniques (antigène F chez les entérobactéries).

Ils interviennent surtout dans les processus d'adhésion aux surfaces. L'adhésion aux muqueuses de l'hôte constitue souvent la première étape de l'infection par les bactéries pathogènes : les pili communs sont donc des facteurs d'adhésion ou adhésines, qui sont reconnus par des récepteurs glycoprotéiques ou glycolipidiques des cellules de l'hôte.

Chez *Escherichia coli* la toxicité est provoquée par la liaison entre les fimbriae et des récepteurs spécifiques situés à la surface des entérocytes. Un des sites de l'adhésion des salmonelles à la muqueuse intestinale est le récepteur à l'epithelial growth factor (EGF). Chez les streptocoques, les pili sont appelés protéines M.

Certaines bactéries possèdent également des pili « sexuels », plus longs que les fimbriae. Les pili sexuels interviennent dans la reconnaissance entre bactéries au cours du phénomène de conjugaison (transfert de matériel génétique entre bactéries par contact) (Figure 11). Ces pili sont déterminés génétiquement par des plasmides conjugatifs.



Figure 11 : Bactéries en conjugaison, liées par un pili

1.1.1.7. Les plasmides et les transposons

Les plasmides sont des petites molécules d'ADN circulaire (103 à 105 paires de bases). Leur réplication (Mécanisme par lequel le matériel génétique, en particulier les acides nucléiques se reproduit continuellement sous la même forme) est indépendante de celle du chromosome bactérien, car ils possèdent leur propre origine de réplication (ORI-R). Ils portent un nombre réduit de gènes, qui ne sont pas essentiels à la survie de la cellule, mais qui lui confèrent des

capacités d'adaptation plus importantes. Les plasmides conjugatifs sont transférables d'une bactérie à une autre par conjugaison : ils portent les gènes nécessaires à la synthèse des pili sexuels et les gènes de conjugaison, ainsi qu'une origine de transfert (ORI-T).

Les plasmides artificiels sont importants en biologie moléculaire : ils sont utilisés comme vecteurs de clonage, car ils possèdent des sites d'ouverture par des enzymes de restriction.

Les transposons sont des fragments d'ADN capables de se « déplacer » dans le chromosome bactérien ou d'être transféré dans un autre réplicon (un plasmide par exemple). Contrairement aux plasmides, leur réplication n'est pas autonome, elle est liée à celle du réplicon qui les héberge. Les transposons les plus simples sont des fragments d'ADN de 750 à 1600pb, contenant le gène de la transposase (enzyme permettant l'insertion du transposon dans l'ADN cible), encadré par des séquences répétées inversées.

Les transposons composites contiennent d'autres gènes que celui de la transposase.

1.1.2. Caractéristiques propres aux archées

Leur membrane est composée d'étherlipides plutôt que d'acides gras et certaines archées sont capables de métaboliser le méthane (méthanogène).

1.1.3. Organisation d'un virus.

Les virus sont constitués d'information génétique sous forme d'ADN mono-caténaire ou bicaténaire, ou d'ARN. La protection de l'information génétique est permise par une capsid protéique, présente chez tous les virus. On peut avoir en plus une enveloppe lipoprotéique (cas du virus de la grippe et du VIH). On peut également avoir des enzymes associées (mais pas dans tous les cas). Ce sont des édifices inertes et déshydratés : rien ne se passe à l'intérieur. Les particules virales sont des structures stables et statiques incapables de modifier ou de remplacer leurs constituants. C'est seulement au cours de l'infection d'une cellule que le virus acquiert la propriété clé d'un être vivant.

1.2. Structure de la cellule eucaryote

Les cellules eucaryotes ont une structure plus complexe (Figure 13) que les procaryotes. Une des principales particularités des cellules eucaryotes est la présence de structures membranaires appelées organelles qui comprennent le noyau, les mitochondries et les chloroplastes (ces derniers n'étant présents que dans les cellules photosynthétiques). Le noyau possède l'information génétique de la cellule (ADN, « le génome ») et est le siège de la transcription dans les cellules eucaryotes. Les mitochondries et les chloroplastes interviennent

de façon spécifique dans la production d'énergie, les premières par la respiration, les secondes par la photosynthèse.

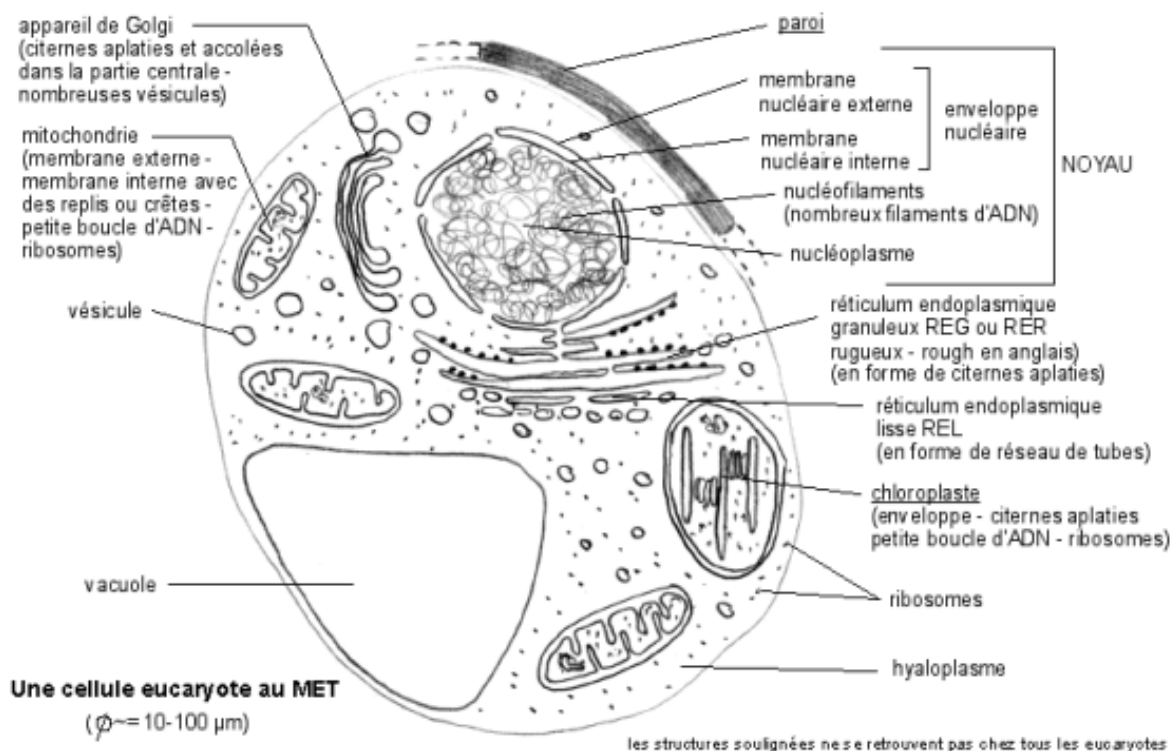


Figure 13 : Schéma générale de la cellule eucaryote

1.2.1. Structure de la cellule chez les champignons microscopiques

Les champignons filamenteux possèdent une paroi constituée essentiellement de polysaccharides, de glycoprotéines et de mannoprotéines (Figure 14). Les polysaccharides sont majoritairement la chitine, polymère de molécules de N-acétylglucosamine liées entre elles par une liaison de type β -1,4, et les glucanes, polymères de molécules de D-glucose liées entre elles par des liaisons β (1). Ces deux polysaccharides assurent la protection des moisissures vis-à-vis des agressions du milieu extérieur. La chitine joue un rôle dans la rigidité de la paroi cellulaire, les glycoprotéines jouent un rôle dans l'adhérence et les mannoprotéines forment une matrice autour de la paroi.

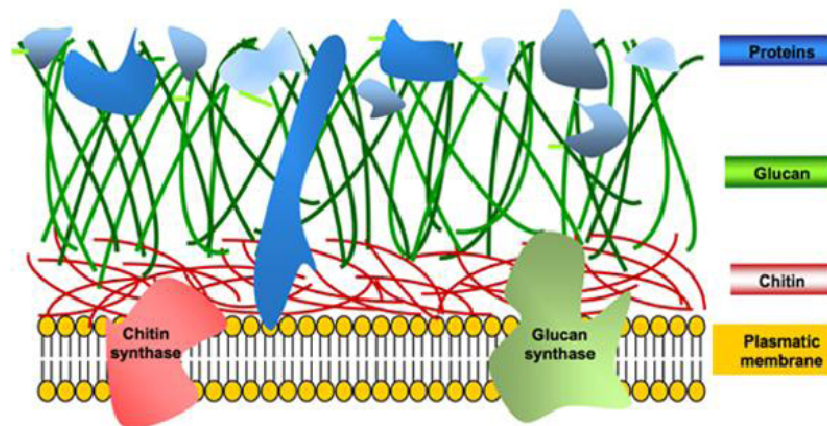


Figure 14 : Schématisation de la structure de la paroi fongique

1.3. Caractéristiques communes aux archées et bactéries et caractéristiques communes aux archées et eucaryotes

Les archées possèdent quelques caractéristiques uniques et aussi certains points communs avec les bactéries et les eucaryotes:

1.3.1. Points communs avec les bactéries : Unicellularité, similarité de taille et de forme, pas de noyau, un seul chromosome circulaire. ADN et ARN semblables, division asexuée, protéines impliquées dans le cytosquelette,

1.3.2. Points communs avec les eucaryotes: Similarité des enzymes impliquées dans la réplication, la transcription et la traduction. Présence d'histones (protéines qui compactent l'ADN), capacité à utiliser l'énergie solaire, ou à fixer le carbone.

II CHAPITRE 2: PHYSIOLOGIE DES CELLULES MICROBIENNES

Les cellules microbiennes ont de nombreuses fonctions identiques. Elles ont toutes besoin de produire de l'énergie et de la conserver. Toutes requièrent aussi des mécanismes génétiques autorisant la réplication et permettant l'adaptation à leurs différents environnements. Les sources d'énergie sont d'une importance primordiale pour les cellules, car les processus vitaux consomment beaucoup d'énergie. Trois stratégies s'offrent pour puiser l'énergie de la nature : à partir des composés *organiques*, des composés *inorganiques* ou de la *lumière*.

Les chimioorganotrophes

Des milliers de composés organiques existant sur la Terre peuvent être utilisés par un microorganisme ou un autre. Tous les composés organiques naturels et la plupart des composés organiques synthétiques peuvent être métabolisés par un ou plusieurs microorganismes. L'énergie est obtenue par *oxydation* d'un de ces composés (perte de ses électrons) et accumulée dans la cellule sous la forme d'un composé riche en énergie, l'**adénosine triphosphate (ATP)**.

Certains microorganismes peuvent extraire l'énergie d'un composé seulement en présence d'oxygène ; ces organismes sont qualifiés d'**aérobies**. Au contraire, d'autres microorganismes ne peuvent extraire leur énergie qu'en absence d'oxygène (**anaérobie**). Néanmoins, certains d'entre eux sont indifférents à la présence ou l'absence d'oxygène.

Les organismes puisant leur énergie à partir de composés *organiques* sont appelés **chimioorganotrophes** et représentent la majeure partie des microorganismes cultivés.

Différentes options métaboliques pour l'obtention d'énergie

Les microorganismes chimiotrophes produisent de l'ATP par oxydation des composés organiques ou inorganiques, tandis que les phototrophes convertissent l'énergie solaire en énergie chimique, également sous forme d'ATP.

Les chimiolithotrophes

De nombreux procaryotes peuvent utiliser l'énergie disponible dans les composés inorganiques. Il s'agit là d'une forme de métabolisme appelée chimiolithotrophie (découverte par Winogradsky), qui est employée par des chimiolithotrophes. Cette forme de métabolisme producteur d'énergie n'est présente que chez les procaryotes et est prévalente chez les archées et les bactéries. L'éventail des composés inorganiques utilisés est très large, mais, en règle générale, un procaryote spécifique se spécialise dans l'utilisation d'un groupe de composés inorganiques ou de sa famille.

La raison pour laquelle la capacité d'extraire de l'énergie de composés inorganiques s'impose comme une évidence est qu'elle évite la concurrence avec les chimioorganotrophes.

De plus, de nombreux composés inorganiques oxydés, tels que le H_2 et le H_2S , sont des déchets de ces chimioorganotrophes.

Ainsi, les chimiolithotrophes ont élaboré des stratégies évoluées pour exploiter des ressources que d'autres organismes sont incapables d'utiliser.

Les phototrophes

Les microorganismes phototrophes possèdent un pigment qui leur permet d'utiliser la lumière solaire comme source d'énergie, ce qui explique par ailleurs leur coloration cellulaire.

À la différence des organismes chimiotrophes, les phototrophes ne requièrent pas de composés chimiques comme source d'énergie, l'ATP étant produite à partir de l'énergie solaire. Cela constitue un avantage important, car il exclut toutes compétitions pour l'énergie avec les chimiotrophes, la lumière étant disponible dans un grand nombre d'habitats microbiens.

Il existe deux types de Phototrophie chez les procaryotes. L'une est appelée photosynthèse oxygénique et produit de l' O_2 . Elle est caractéristique des cyanobactéries et des microorganismes phylogénétiquement affiliés. L'autre forme de photosynthèse est appelée photosynthèse anoxygénique, intervient chez les bactéries vertes et pourpres et ne conduit pas à la production d' O_2 . Néanmoins, ces deux groupes de phototrophes utilisent la lumière pour produire de l'ATP, et leurs mécanismes de synthèse sont remarquablement similaires.

En effet, les principes de base de la photosynthèse oxygénique ont évolué à partir des procédés anoxygéniques, moins complexes.

Les hétérotrophes et les autotrophes

Toutes les cellules utilisent du carbone comme nutriment principal. Les cellules microbiennes sont soit hétérotrophes, nécessitant un ou plusieurs composés organiques comme source de carbone, soit autotrophes, leur source de carbone étant le CO_2 . Les chimioorganotrophes sont aussi des hétérotrophes. À l'opposé, de nombreux chimiolithotrophes et pratiquement tous les phototrophes sont autotrophes.

Les autotrophes sont parfois appelés producteurs primaires, parce qu'ils synthétisent de la matière organique à partir du CO_2 , à la fois pour leur propre bénéfice et celui des chimioorganotrophes.

Ces derniers se nourrissent directement des producteurs primaires ou à partir des produits qu'ils excrètent. Toute la matière organique de la Terre a été synthétisée par des producteurs primaires, principalement des organismes phototrophes.

2.1. Physiologie des cellules procaryotes : Physiologie de la cellule bactérienne

Une bactérie peut avoir un métabolisme intense qui se traduit par une augmentation de la taille, mais, surtout du nombre des cellules. Cet état est dit végétatif. Dans certaines conditions, la bactérie ralentit son métabolisme et ne se divise plus. C'est l'état de repos. Dans les deux états, la bactérie a des besoins nutritifs (pour se diviser ou juste se maintenir en vie). Selon la nature de ces besoins, on définit des bactéries prototrophes et des bactéries auxotrophes.

Les bactéries prototrophes ont des besoins élémentaires (Eau-source d'énergie-source de carbone et d'azote, macro et micronutriments).

Les bactéries auxotrophes nécessitent en plus des besoins élémentaires, des facteurs de croissances.

Les facteurs environnementaux sont également très importants pour la croissance, le pH, la température, la pression osmotique, la présence ou non d'oxygène.

2.1.1. Besoins élémentaires :

2.1.1.1. L'eau

L'eau représente 70% du poids cellulaire total chez *Escherichia coli*. Elle solubilise les nutriments, elle joue un rôle important dans leur transport et ceci dans les deux sens.

C'est le solvant de la vie, où se déroulent toutes les réactions métaboliques (catabolisme plus anabolisme).

Un paramètre appelé «water activity», a_w , ou activité de l'eau) quantifie la disponibilité de l'eau libre, non associée aux nutriments. Elle varie de 0 à 1.

Les endospores peuvent survivre dans un environnement dépourvu d'eau libre.

2.1.2. Macronutriments

Les bactéries ont besoin de phosphore, de soufre, de magnésium, de potassium, de calcium, de sodium, de fer.

2.1.2.1. Le phosphore : est important dans la synthèse des acides nucléiques et phospholipides des membranes plasmiques et externes. Sans oublier l'ATP (énergie).

Il est apporté sous forme de phosphate organique et inorganique

2.1.2.2. Le soufre : est retrouvé au niveau de deux acides aminés qui jouent un rôle dans les ponts disulfure (la méthionine et la cystéine). Il intervient dans les structures complexes des protéines. Il est également utilisé dans la synthèse des vitamines.

2.1.2.3. Le magnésium joue le rôle de cofacteur enzymatique, en plus a une fonction de stabilisateur de structures cellulaires.

2.1.2.3. Le potassium aussi, joue un rôle comme cofacteur enzymatique.

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

2.1.2.6. Le sodium est important pour la croissance des bactéries halophiles.

2.1.2.7. Le Fer, qui intervient dans la chaîne respiratoire (bactéries aérobies), élément des cytochromes (Pigment cellulaire : chromoprotéine, proche de l'hémoglobine, et jouant un rôle dans les processus d'oxydation (respiration) cellulaire des végétaux et des animaux) au niveau de la membrane plasmique.

2.1.3. Les oligoéléments

Ils sont indispensables à la cellule en très faibles quantités. On peut citer le cobalt, le zinc, le bore, le cuivre, le manganèse, le sélénium....Très importants pour le fonctionnement des enzymes. Ils ne sont pas tous requis par une même espèce.

2.1.4. Source d'énergie:

Sur la base de la source d'énergie, on distingue les bactéries chimiotrophes et les bactéries phototrophes.

Les bactéries chimiotrophes puisent leurs énergies des réactions chimiques d'oxydoréduction. Si les composés (donneurs d'électrons) sont inorganiques comme H_2S , H_2 , Fe^{2+} ou NH_3 ..., les bactéries sont dites **chimolithotrophes**. Si le donneur d'électron est organique, elles sont dites chimioorganotrophes.

Les bactéries phototrophes puisent leur énergie de la lumière. Si la source d'électrons est minérale, les bactéries sont dites **photolithotrophes**, si la source d'électrons est organique, les bactéries sont dites **photoorganotrophes**.

2.1.5. Source de carbone

Le carbone est l'élément constitutif le plus abondant chez les bactéries.

* Si la source est le dioxyde de carbone (CO_2) les bactéries sont dites **autotrophes**, c'est le cas des bactéries phototrophes et la plupart des bactéries chimolithotrophes.

* Si la source de carbone assimilable est un substrat organique, ces bactéries sont qualifiées d'**hétérotrophes**.

2.1.6. Source d'azote

La synthèse des protéines et des acides nucléiques nécessite des substances azotées. L'azote représente 12% du poids sec des bactéries et 80% de l'air qu'on respire.

L'azote moléculaire (N_2) est fixé par quelques bactéries vivant en symbiose avec des légumineuses (bactéries fixatrices d'azote) ou par des bactéries jouant un rôle dans la fertilisation des sols.

Pour la majorité des bactéries la source d'azote est constituée par d'autres composés inorganiques (ammoniaque, nitrites, nitrates) ou par des sources organiques (groupements amines des composés organiques).

2.1.7. Les facteurs de croissance :

Selon les besoins nutritionnels nécessaires à la croissance des bactéries, on a défini les bactéries prototrophes et les bactéries auxotrophes.

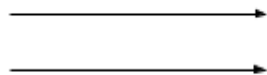
Les bactéries prototrophes ont des besoins élémentaires, alors que les bactéries auxotrophes nécessitent en plus, un ou plusieurs facteurs de croissance qu'elles sont incapables de synthétiser. Soit ils sont fournis par l'environnement ou rajouter dans le milieu de culture.

Les facteurs de croissance sont des vitamines B1, B6, B12, acide folique, des précurseurs de coenzymes (de nicotinamide-adénine-dinucléotide : NAD, de coenzyme A, de Flavine-mononucléotide : FMN, de Flavine-adénine-dinucléotide : FAD).

2.1.8. Les types trophiques de bactéries :

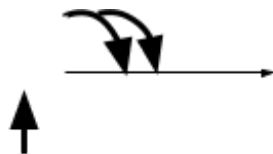
Une bactérie pour synthétiser ses constituants et se déplacer, doit utiliser l'énergie.

Selon cette énergie on définit 2 types trophiques :



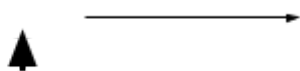
a. Phototrophie :

Chez les plantes la photosynthèse peut se résumer comme suit :



La réaction photosynthèse a lieu dans le chloroplaste chez les plantes et chez les bactéries possédant des pigments dits chlorophylines.

Les chlorophylles bactériennes sont dispersées dans le cytoplasme sous forme de chromatophe, on peut résumer leur photosynthèse comme suit :

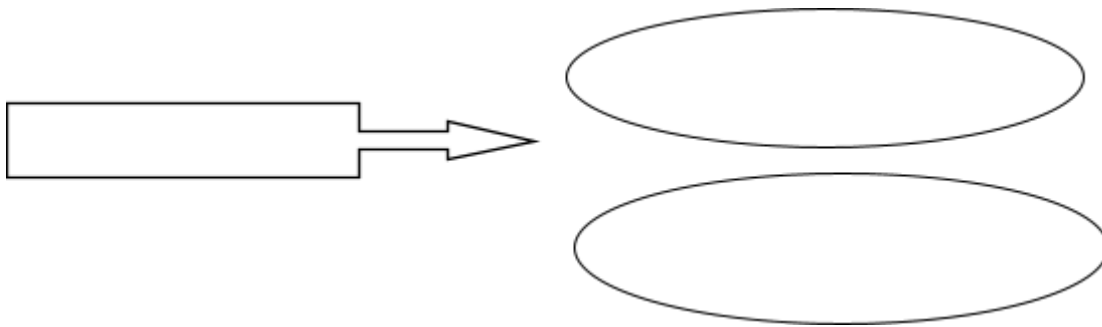


NB : chez les bactéries le donneur des électrons n'est jamais d'H₂O, sa nature chimique permet de distinguer 2 types trophiques :

- * photolithotrophe: le donneur des électrons est minéral ;
- * photoorganotrophe: le donneur des électrons est organique.

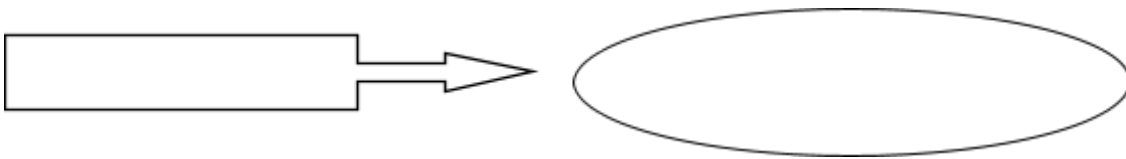
Photolithotrophes :

Elles sont des anaérobies stricts, elles utilisent le sulfure ou le H_2 comme donneur des électrons.



Photoorganotrophes :

Elles utilisent la substance organique comme donneur des électrons



b. Chimiotrophie :

La plupart des bactéries rencontrées dans la nature sont dépourvues de pigment chlorophylline et sont par conséquent incapables de faire la photosynthèse, et tirent leur énergies des réactions d'oxydoréduction.

L'ATP est produite lors de réactions de phosphorylation : Phosphorylation au niveau de substrat et phosphorylation oxydative (chaîne de transfert d'é)

Les chimolithotrophes, n'ont besoin ni de matière organique, ni de lumière du soleil. Ils puisent leur énergie de substance inorganique et transforme le CO_2 en matière organique. Exemples : les bactéries des sources chaudes, les bactéries méthanogènes (Archeae) qui synthétisent le méthane (CH_4) à partir de CO_2 .

Les chimioorganotrophes puisent leur énergie et leur carbone des substances organiques. C'est le cas de la plus part des bactéries d'intérêt médical (pathogènes).

Le résumé des différents types trophiques est présenté dans le tableau 3.

Tableau 3 : Résumé des différents types trophiques

<i>Type du besoin</i>	<i>Nature du besoin</i>	<i>Type trophique</i>
<i>Source d'énergie</i>	<i>Rayonnement lumineux</i>	<i>Phototrophe</i>
	<i>Oxydation de composés organiques ou inorganiques</i>	<i>Chimiotrophe</i>
<i>Donneur d'électrons</i>	<i>Minéral</i>	<i>Lithotrophe</i>
	<i>Organique</i>	<i>Organotrophe</i>
<i>Source de carbone</i>	<i>Composé minéral</i>	<i>Autotrophe</i>
	<i>Composé organique</i>	<i>Hétérotrophe</i>
<i>Facteurs de croissance</i>	<i>Aucun besoin</i>	<i>Prototrophe</i>
	<i>Nécessaires</i>	<i>Auxotrophe</i>

Les bactéries d'intérêt vétérinaire sont principalement des bactéries chimioorganotrophes. Elles sont généralement hétérotrophes et elles peuvent être prototrophes ou auxotrophes.

Les bactéries appartenant à la classe des *Chlamydiae* et à l'ordre des *Rickettsiales* tirent leur énergie de la cellule qu'elles parasitent et elles sont qualifiées de paratrophes.

2.1.9. Les facteurs environnementaux physico-chimiques

Les facteurs environnementaux, comme la température, le pH, la salinité, l'osmolarité et l'oxygène influencent et contrôlent la croissance bactérienne. Chaque bactérie possède des valeurs optimales pour chaque facteur et par conséquent, selon les valeurs optimales, on définit différentes catégories de bactéries.

2.1.9.1. Température :

Elle influence profondément la multiplication et le métabolisme bactérien (action sur la vitesse des réactions biochimiques). Selon la température optimale de développement, on distingue les catégories de bactéries suivantes:

a. Les psychrotrophes : Peuvent se cultiver à 0° C. Température optimale de multiplication entre 20 à 25° C.

b. Les psychrophiles: Température maximale 20° C. Température optimale de croissance inférieure à 15 ° C.

c. Les cryophiles : peuvent se développer à des températures négatives. Elles sont souvent isolées des matières fécales d'animaux polaires. Température optimale de croissance (- 5 ° C).

d. Les mésophiles : croissance entre 25 et 40° C. Optimum à 37°C. La majorité des bactéries pathogènes.

e. Les thermophiles : température optimale entre 50 et 60° C.

f. Les hyperthermophiles: ont une température optimale de croissance entre 70° C et 110° C.

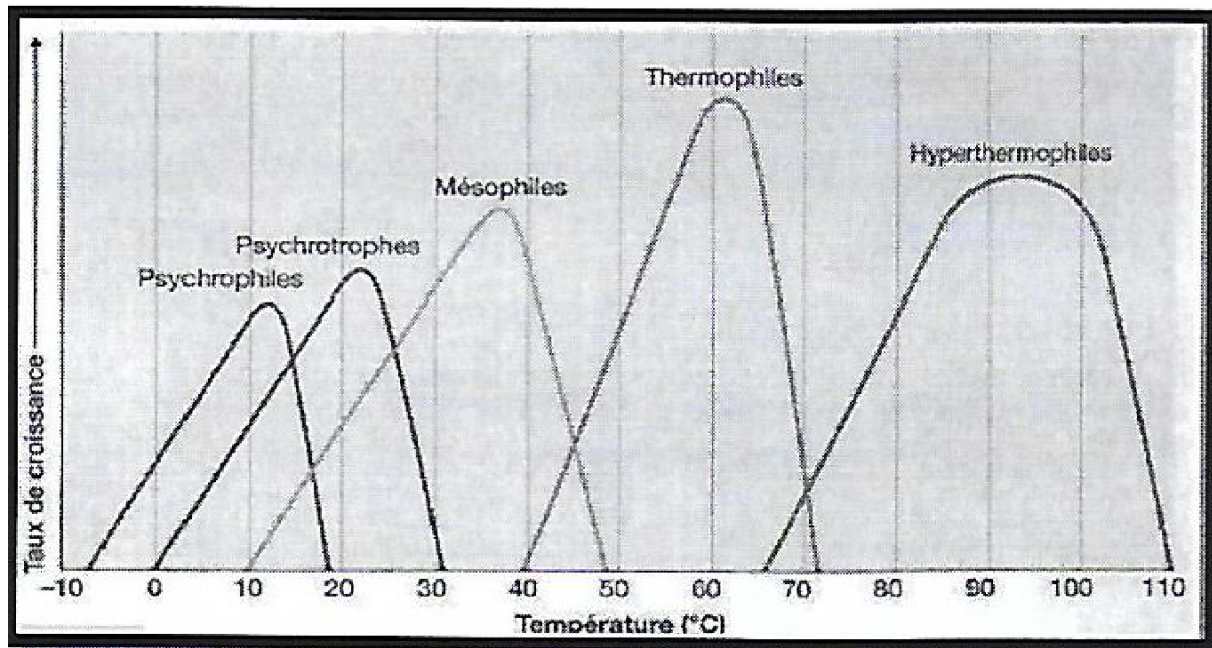


Figure 15: Taux de croissance en fonction de la température

g. Cas spécifique des Archées :

Les archées sont principalement extrêmophiles, elles vivent dans des conditions extrêmes de chaleur, de profondeur, d'acidité ou de concentration en certains produits chimiques (sel, métaux lourds, méthane...). La principale caractéristique des archéobactéries est leur capacité à survivre dans les milieux extrêmes : eaux très acides (pH < 1) ou très salées (mer morte) ou très chaude ($T^{\circ} > 120^{\circ} \text{C}$) ou très froides ($T^{\circ} < 0^{\circ} \text{C}$), bien que la plupart d'entre elles vivent dans des milieux plus cléments.

2.1.9.1.2. pH :

La majorité des bactéries se multiplient préférentiellement à des pH voisins de la neutralité (6,5 à 7,5), mais elles sont capables de croître dans une large gamme de pH. On distingue :

a. Les acidophiles : préfèrent un pH acide. C'est le cas des lactobacilles dont le pH optimal est de 6. *Thermoplasma acidophilum* qui croît à un pH optimal entre 0,8 et 3.

b. Les alcalophile : préfèrent des pH alcalins. Ainsi, le pH optimal est de 9 pour la multiplication de *Vibrio cholerae*, *Alkaliphilus transvaalensis* est capable de croître à un pH de 12,5.

2.1.9.3. Pression :

Les bactéries barophiles, ont une croissance optimale dans une atmosphère dont la pression est supérieure à la pression atmosphérique. Ce sont les bactéries des eaux profondes des mers et des océans.

2.1.9.4. Pression osmotique :

Les bactéries sont peu sensibles aux variations de pression osmotique car elles sont protégées par leur paroi. A l'inverse des Mycoplasmes.

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

a. Les bactéries non-halophiles : concentration de NaCl est inférieure à 0,2 M.

b. Les espèces halophiles : concentration de NaCl supérieure à 0,2 M pour les moins halophiles à 5,2 M pour les plus halophiles.

c. Les espèces halotolérantes : Ils tolèrent 7.5 à 15% de NaCl.

Les osmophiles se multiplient en présence de grandes concentrations de sucre.

2.1.10. Besoins gazeux :

L'oxygène est en réalité un gaz très toxiques s'il n'est pas neutraliser par les bactéries qui en ont besoin (Tableau 4). Lors de la respiration aérobie, il est neutralisé en se combinant à l'hydrogène pour former une molécule d'eau. C'est le cas des aérobies stricts. Ils utilisent l'oxygène comme accepteur final d'électrons et neutralisent les différentes formes toxiques (radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyl ...) par différentes enzymes (catalase, oxydase, superoxydedismutase). Ainsi, on distingue :

a. Les anaérobies facultatifs peuvent croître en absence ou en présence d'oxygène. Mais leurs croissance est maximale en présence de ce dernier (Production d'ATP élevée). En absence d'oxygène, elle utilise la fermentation ou la respiration anaérobie pour produire de l'énergie. C'est le cas d'*Escherichia coli*.

b. Les anaérobies stricts : n'ont aucune enzyme capable de neutraliser les formes toxiques de l'oxygène. Leur croissance doit se faire dans une atmosphère dépourvue d'oxygène. C'est le cas de *Clostridium*.

c. Les anaérobies aérotolestants : n'utilisent pas l'oxygène pour leur croissance mais ce gaz n'a aucun effet sur elles. C'est le cas des Lactobacilles.

d. Les microaérophiles : qui ont besoin d'O₂, mais à une proportion inférieure à celle de l'air.

e. Les capnophiles : qui exigent la présence de concentration très élevées de CO₂ (10 à 30 fois > celle de l'air). Ces bactéries poussent à l'intérieur des hôtes (humain ou animaux). C'est le cas de *Helicobacter pylori*.

Tableau 4 : Comportement des bactéries vis à vis de l'oxygène et types respiratoire

	a) Aérobies stricts	b) Anaérobies facultatifs	c) Anaérobies stricts	d) Anaérobies aérotolérants	e) Microaérophiles
Effet de l'oxygène sur la croissance	Croissance aérobie seulement; la présence de molécules d'O ₂ est essentielle.	Croissance aérobie ou anaérobie; croissance optimale en présence de molécules d'O ₂ .	Croissance anaérobie seulement; arrêt de la croissance en présence de molécules d'O ₂ .	Croissance anaérobie seulement; toutefois, la croissance se poursuit en présence de molécules d'O ₂ .	Croissance aérobie seulement; les molécules d'O ₂ sont essentielles à faible concentration.
Croissance bactérienne dans un tube contenant un milieu de culture solide					
Explication du mode de croissance	La croissance a lieu seulement là où une forte concentration de molécules d'O ₂ a diffusé dans le milieu.	La croissance est optimale là où la concentration de molécules d'O ₂ est la plus élevée, mais elle a lieu partout dans le tube.	La croissance a lieu seulement là où il n'y a pas de molécules d'O ₂ .	La croissance est uniforme partout dans le tube; la molécule d'O ₂ n'a aucun effet.	La croissance a lieu seulement là où une faible quantité de molécules d'O ₂ a diffusé dans le milieu.
Explication des effets de l'oxygène	La présence d'enzymes (catalase et superoxyde dismutase SOD) permet la neutralisation des formes toxiques de la molécule d'O ₂ , qui peut alors être utilisée.	La présence d'enzymes (catalase et SOD) permet la neutralisation des formes toxiques de la molécule d'O ₂ , qui peut alors être utilisée.	Il n'y a pas d'enzyme permettant la neutralisation des formes toxiques de la molécule d'O ₂ ; la molécule d'O ₂ n'est pas tolérée.	La présence d'une enzyme, la SOD, permet la neutralisation partielle des formes toxiques de la molécule d'O ₂ ; la molécule d'O ₂ est tolérée.	Des quantités létales de formes toxiques de la molécule d'O ₂ sont produites en présence d'O ₂ atmosphérique.

2.1.11. Le cycle cellulaire bactérien

Les synthèses permettent aux bactéries de croître en taille et en volume jusqu'à une dimension limite qui conduit généralement à la division cellulaire par scission binaire. Le cycle cellulaire a été particulièrement bien étudié chez *Escherichia coli*.

Dans une culture d'*Escherichia coli*, les cellules bactériennes n'ont pas le même âge, elles ont toutes un diamètre constant, mais pas la même longueur. Les cellules jeunes sont courtes alors que les cellules âgées sont plus longues. En fait, la longueur (et donc le volume) d'une cellule augmente jusqu'à atteindre une valeur critique déclenchant la division. Cette longueur critique, égale à deux fois la longueur d'une cellule nouvellement formée, est appelée la longueur cellulaire unitaire (L_μ). Chez *Escherichia coli*, L_μ est d'environ 1,6 μm.

Un cycle cellulaire bactérien se décompose en trois étapes : l'initiation (B), la réplication de l'ADN chromosomique (C) et la division cellulaire (D). Ces trois étapes se succèdent au cours du cycle : C ne débute qu'à la fin de la période B et D ne débute que lorsque la réplication de l'ADN chromosomique est terminée.

Durant la période B, on assiste à la synthèse d'ARNm et de protéines nécessaires à l'initiation de la réplication du chromosome.

Pendant la période C, l'ADN chromosomique se réplique et, à la fin de cette période, les deux copies du chromosome bactérien migrent chacune, selon un mécanisme actif, vers une des deux futures cellules filles (équpartition).

La durée des étapes C et D ne varie pas avec le taux de croissance. Chez *Escherichia coli*, C dure environ 40 minutes et D dure environ 20 minutes. En revanche, l'étape d'initiation a une durée variable selon les conditions de culture et elle devient de plus en plus courte quand le temps de génération décroît. Quand le temps nécessaire au doublement du nombre de cellules (G) est égal à 60 minutes, la période B est égale à zéro et lorsque G est inférieur à 60 minutes, la période B prend une valeur négative ce qui revient à dire que la réplication du chromosome bactérien débute avant même que ne soit terminée la réplication du cycle précédent. Plusieurs fourches de réplication de l'ADN chromosomique sont alors présentes dans la cellule bactérienne.

Chez les bactéries à Gram positif, dont la paroi est riche en peptidoglycane, la séparation complète des bactéries filles est sous la dépendance de la concentration en autolysines.

2.1.11.1. Les constantes de la croissance

A partir d'une unique cellule, le cycle cellulaire donne naissance à deux cellules filles qui vont chacune donner à leur tour deux autres cellules et ainsi de suite, selon une progression géométrique : 1 cellule ---> 2 cellules ---> 4 cellules ---> 8 cellules ---> 16 cellules ---> 32 cellules ...

Le temps nécessaire au doublement du nombre de cellules ou temps de génération dépend de l'espèce, voire même de la souche et des conditions environnementales. Dans les conditions optimales de culture, le temps de génération ou G est de 13 minutes pour *Vibrio parahaemolyticus*, de 20 minutes pour *Escherichia coli*, de 100 minutes pour *Lactobacillus acidophilus* et de 1000 minutes pour *Mycobacterium tuberculosis*.

Le nombre de divisions par unité de temps est égal à l'inverse du temps de génération ($1/G$). Pour les exemples donnés ci-dessus il est de 4,6 par heure pour *Vibrio parahaemolyticus*, de 3 par heure pour *Escherichia coli*, de 0,6 par heure pour *Lactobacillus acidophilus* et de 0,06 par heure pour *Mycobacterium tuberculosis*.

2.1.11.2. Courbe de croissance en milieu non renouvelé

Dans une population bactérienne, toutes les cellules ne se divisent pas de manière synchrone et la croissance s'effectue de façon continue. Dans un milieu non renouvelé, la croissance des bactéries est limitée par l'épuisement du milieu en nutriments. La cinétique de la croissance

peut être établie expérimentalement en mesurant les variations de la masse bactérienne (m) en fonction du temps (t) (Figure 16). La vitesse de croissance dm/dt ou accroissement de masse par unité de temps est proportionnelle à la masse bactérienne présente au temps t . Le coefficient de proportionnalité, désigné par μ , est nommé taux de croissance.

Sur la courbe de croissance six phases peuvent être définies : phase de latence, phase d'accélération, phase de croissance exponentielle, phase de décélération, phase stationnaire et phase de déclin (voir figure 15).

. La phase de latence, durant laquelle la masse reste identique à la masse bactérienne initiale, se caractérise par une valeur de μ égale à zéro. La durée de la phase de latence est très variable et elle dépend à la fois de la nature du milieu ainsi que de la nature et de la taille de l'inoculum bactérien.

Un inoculum bactérien prélevé en phase exponentielle de croissance etensemencé dans un milieu neuf identique se multiplie sans aucune phase de latence. En revanche, si le même inoculum est placé dans un milieu différent on observe une phase de latence liée à l'adaptation des bactéries aux nouveaux substrats (période d'adaptation enzymatique durant laquelle les bactéries synthétisent de nouvelles enzymes leur permettant d'utiliser de nouveaux nutriments).

L'ensemencement d'un inoculum important réduit la durée de la phase de latence par des mécanismes mal connus. On peut supposer qu'un grand nombre de bactéries est apte à neutraliser rapidement un effet toxique du milieu. On peut également expliquer ce phénomène par un simple problème technique de détection de la biomasse qui est plus facile si l'inoculum est déjà important.

L'âge des bactéries a une influence sur la durée de la latence qui peut être très courte lorsque des cellules jeunes sont introduites dans un milieu neuf. En effet, un inoculum âgé peut contenir de nombreuses cellules mortes et les quelques cellules viables devront se diviser de nombreuses fois avant de donner une masse mesurable. De plus, dans un inoculum âgé, les bactéries sont dans un état physiologique peu favorable et il leur faut du temps pour restaurer leurs systèmes enzymatiques mis au repos.

. La phase d'accélération se caractérise par une augmentation de plus en plus rapide de la masse. Le taux de croissance devient supérieur à zéro et il augmente progressivement.

. La phase de croissance exponentielle ne dure que quelques heures. Durant cette phase, la masse augmente de façon exponentielle et μ atteint une valeur maximale et constante. Les bactéries se multiplient sans entrave et elles libèrent des métabolites pouvant avoir un intérêt industriel comme des antibiotiques ou des toxines. La pente de la droite permet de mesurer la

valeur μ' qui est égale à $\mu \times 0,4343$. La valeur de μ' dépend des conditions d'environnement comme la température, le pH, la nature et la concentration des nutriments.

. Au cours de la phase de décélération, l'augmentation de la masse bactérienne ralentit et μ diminue progressivement.

. La phase stationnaire peut durer de quelques heures à quelques jours. La masse bactérienne est maximale et constante et μ est égal à zéro. Les bactéries peuvent continuer à se diviser mais le taux de division est alors égal au taux de mortalité. Cette phase résulte d'un épuisement du milieu et de l'accumulation de déchets toxiques. Durant cette phase les bactéries en ayant la capacité peuvent sporuler.

. Au cours de la phase de déclin, les bactéries ne se divisent plus, beaucoup d'entre elles meurent et sont détruites par des autolysines. Dans quelques cas, les bactéries survivantes peuvent amorcer une nouvelle phase de multiplication en utilisant les substances libérées par la lyse des cellules. On parle alors de croissance cryptique.

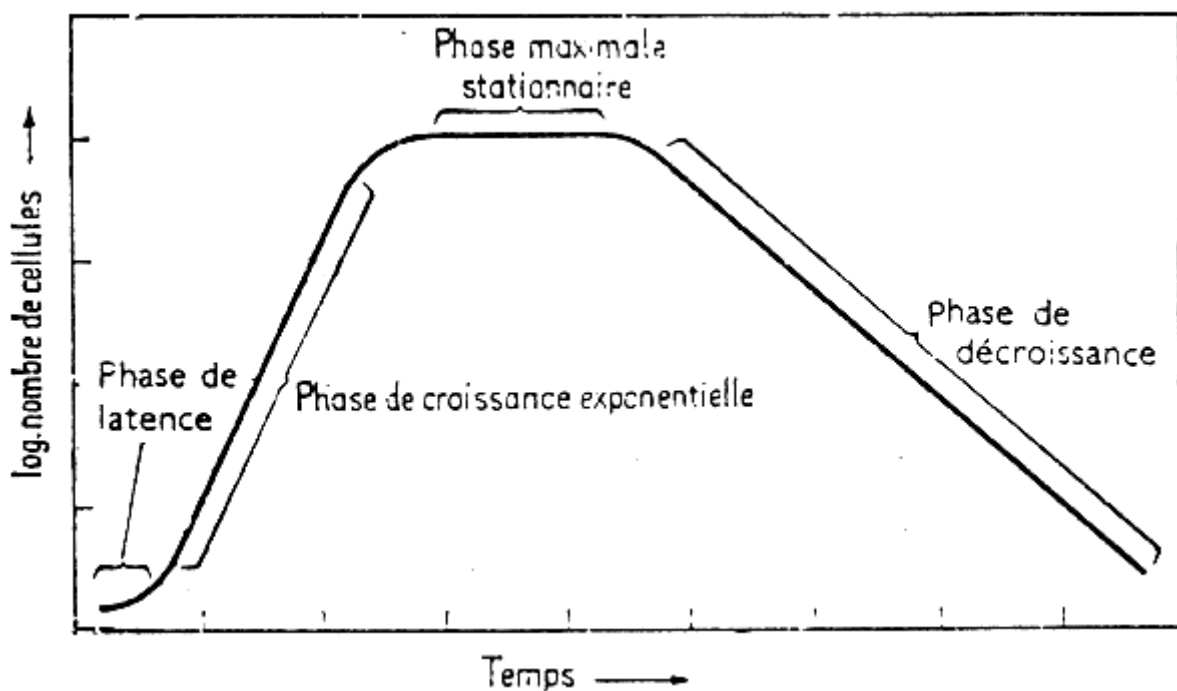


Figure 16. Courbe de croissance en milieu non renouvelé

2.1.11.3. Phénomène de diauxie

Le phénomène de diauxie, mis en évidence par Monod, se traduit par une courbe de croissance diphasique. Il est observé dans des milieux synthétiques contenant au moins deux sources de carbone et il est lié à un mécanisme de répression catabolique. Par exemple, dans un milieu contenant du glucose et du lactose, certaines espèces vont dans un premier temps

utiliser le glucose grâce à des enzymes constitutives. La dégradation du lactose est sous la dépendance d'enzymes inductibles dont l'induction est réprimée en présence de glucose. Lorsque le glucose sera épuisé, les bactéries utiliseront le lactose et donneront une nouvelle phase de croissance exponentielle après un temps de latence intermédiaire.

2.1.11.4. Cultures continues

Dans un milieu non renouvelé, la phase exponentielle de croissance ne peut durer que quelques heures. Dans un but industriel, il peut être nécessaire de prolonger cette phase en renouvelant constamment le milieu de culture et en éliminant les produits du métabolisme. Les croissances continues sont obtenues à l'aide de turbidostat, de chémostats, de fermenteurs en continu multi-étages ou d'autres dispositifs industriels.

2.1.11.5. Croissance en milieu solide

La croissance sur la surface d'un milieu solide se traduit soit par une nappe confluyente lorsque les bactéries sont déposées en grand nombre soit par l'apparition de colonies lorsque les cellules sont déposées de manière isolée.

Lors de la formation d'une colonie, la croissance conduit d'abord à l'apparition d'une couche monocellulaire et la structure de la microcolonie est bidimensionnelle. La prolifération des bactéries de la périphérie conduit à une extension radiale de la colonie alors que la prolifération des bactéries situées au centre sont à l'origine de la structure tridimensionnelle due à la poussée vers le haut des cellules résultant de la division bactérienne.

La vitesse de croissance radiale dépend de l'espèce, de la souche et de la richesse du milieu. Sur milieu pauvre, les colonies d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* croissent de 20 à 25 $\mu\text{m/h}$ lorsque la température est comprise entre 20 et 37 °C. Sur un milieu riche, les colonies d'*Entérocoques faecalis* croissent de 18 à 23 $\mu\text{m/h}$ et celles de *Bacillus cereus* de 575 $\mu\text{m/h}$. La hauteur de la colonie est également fonction de l'espèce. Chez *Escherichia coli* la hauteur augmente durant une quarantaine d'heures puis elle cesse de s'accroître.

Le développement des colonies a des conséquences en ce qui concerne l'accès des bactéries à l'oxygène et aux nutriments. L'oxygène pénètre difficilement dans une colonie bien développée et sa concentration au centre de la colonie peut être faible. Les nutriments diffusent vers le haut à partir de la gélose pour créer un gradient de concentration inverse à celui de l'oxygène.

Pour une bactérie aérobie, toutes les cellules sont en croissance et en multiplication dans une colonie jeune, alors que dans une colonie âgée, seules les cellules proches de la surface continuent à se multiplier. En effet, l'absence d'oxygène au centre de la colonie inhibe la multiplication des bactéries qui s'y trouvent.

Pour une espèce aéro-anaérobie, l'oxygène a peu d'influence sur la multiplication et, quel que soit l'âge des colonies, les cellules les plus actives sont celles en contact avec la gélose, zone où la concentration en substrat est la plus élevée.

L'aspect des colonies est un critère important de l'identification d'une bactérie. Les colonies se caractérisent par leur vitesse d'apparition, leur taille, leur aspect (colonies lisses ou **S** pour smooth, colonies rugueuses ou **R** pour rough, colonies muqueuses ou **M**, colonies brillantes ou mates, colonies à bord régulier ou irrégulier, colonies plates ou surélevées ou ayant un aspect en œuf sur le plat, colonies pigmentées ou non pigmentées, etc.), leur odeur (odeur de seringas pour *Pseudomonas aeruginosa*, odeur de terre mouillée pour *Burkholderia pseudomallei*, etc.), leur texture, leur caractère hémolytique sur une gélose au sang, leur adhérence ou non à la gélose, etc.

2.1.11.6. Bactéries viables mais non cultivables (VNC ou VBNC pour viable but non culturale)

En dépit de l'existence de très nombreux milieux de culture, seule une infime proportion de bactéries peuvent être cultivées in vitro. On estime que les pourcentages de bactéries cultivables sont de 0,25 pour les espèces vivant en eau douce, de 0,3 pour les bactéries du sol et 0,1 à 1 pour les espèces colonisant l'homme ou les animaux. Actuellement de nombreuses bactéries ne sont connues que par les séquences de leurs ARNr 16S. La catégorie *Candidatus* a été proposée en 1994 pour accueillir des bactéries non cultivables mais pour lesquelles on dispose, outre la séquence de leurs ARNr, d'informations concernant leur habitat, leur structure, leur métabolisme etc.

Plusieurs études montrent que des bactéries à Gram négatif ou à Gram positif, telles que *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* ou *Escherichia coli*, ont la possibilité d'entrer dans un état viable mais non cultivable. Les bactéries restent vivantes, elles ont une activité métabolique réduite, leur taille est souvent réduite, elles ont souvent une forme ovoïde, elles présentent des modifications structurales de leur membrane cytoplasmique, elles synthétisent de nouvelles protéines et elles sont incapables de croître in vitro. L'état viable mais non cultivable serait génétiquement programmé et permettrait à une bactérie de survivre dans des conditions qui lui sont hostiles. L'état VNC présente une importance majeure en clinique car les bactéries viables mais non cultivables sont capables de retrouver leur virulence après infection de l'homme ou de l'animal.

Des bactéries VNC pourraient être responsables d'infections ou responsables de la résurgence d'infections observées chez des individus considérés comme guéris depuis plusieurs années. Ainsi, les otites moyennes chroniques résistantes aux antibiotiques ne semblent pas dues à une réponse inflammatoire comme on l'a longtemps cru mais elles seraient dues à la présence de VNC résistantes aux antibiotiques. Des cas de tuberculose observés chez des individus guéris seraient dus à une "résurrection" de mycobactéries VNC.

2.1.11.7. Les biofilms

Leur vie est sessile (par opposition au mode de vie planctonique ou vie à l'état libre observée dans des milieux liquides). Les bactéries sessiles forment des colonies qui se recouvrent de polymères organiques et qui tendent à s'associer en communauté. Elles forment alors des biofilms que l'on retrouve dans les canalisations, à la surface des roches immergées d'une rivière, à la surface des muqueuses, sur les dents (plaque dentaire), sur les prothèses, sur divers matériels médicaux (cathéter, valve cardiaque), etc. Au sein des biofilms, les bactéries sont soumises à des phases d'abondance et de restriction nutritionnelles, mais elles sont protégées vis-à-vis des facteurs environnementaux défavorables (dessiccation, parasitisme par les bactériophages ou les *Bdellovibrio* spp., présence d'antibiotiques, présence d'antiseptiques ou de désinfectants).

Conclusion

L'étude de la nutrition et de la croissance bactérienne est riche d'applications :

Elle permet de définir les paramètres assurant une culture optimale des bactéries (atmosphère gazeuse, température, pression, etc.).

Elle permet la confection de milieux servant à cultiver, à isoler et à identifier les bactéries ainsi qu'à étudier leur sensibilité aux antibiotiques.

Dans l'industrie, elle permet de fabriquer des denrées alimentaires (vinaigres, yaourts, laits fermentés, choucroutes, ...), d'obtenir des substances d'origine bactérienne (toxines, certains antibiotiques, certains insecticides, protéines recombinantes) et d'obtenir des cellules bactériennes en grand nombre en vue de la préparation de vaccins ou de réactifs (antigènes utilisables dans le diagnostic).

Elle permet de réaliser des contrôles de stérilité (mesure de l'inactivation des bactéries après stérilisation) ou de densité bactérienne (contrôles de la qualité de l'air, contrôles des surfaces) ou le contrôle des denrées alimentaires et d'eaux de boisson (recherche de bactéries responsables de toxi-infections alimentaires, recherche de bactéries responsables d'altérations, recherche de bactéries signant une contamination fécale).

Elle permet la mise au point de méthodes permettant de limiter la croissance bactérienne dans les aliments ou diverses substances biologiques (action du froid, de la chaleur, de l'acidité, de la salinité, de l'atmosphère gazeuse, etc.).

2.2. Physiologie de la cellulaire chez les archées

Les archées utilisent une plus grande variété de sources d'énergie que les eucaryotes : composé organique comme les sucres, l'ammoniac, les ions métalliques et même l'hydrogène gazeux comme nutriments. Les *Halobacteria* utilisent la lumière solaire comme source d'énergie, et certaines espèces d'archées peuvent fixer le carbone.

Les archées peuvent être réparties en trois groupes distincts : Les archées méthanogènes, anaérobies strictes, produisant du méthane à partir de substances organiques qu'elles décomposent. Ces archées se trouvent au fond des océans, dans les marais, les stations d'épuration, la panse des ruminants, les intestins d'un grand nombre d'animaux, etc.

Les archées halophiles extrêmes, anaérobies, colonisant les eaux très chargées en sel et les saumures. Ces organismes utilisent les gradients osmotiques présents pour réaliser les échanges transmembranaires des métabolites dont elles ont besoin.

Les archées thermoacidophiles, colonisant les sources hydrothermales où la température de l'eau est proche de la température d'ébullition et où le pH est proche de 1. Ces organismes utilisent le gradient de pH transmembranaire pour pratiquer leurs échanges de métabolites.

Les archées se reproduisent de manière asexuée et se divisent par fission binaire, fragmentation ou bourgeonnement. Par opposition aux bactéries et aux eucaryotes, aucune espèce d'archées identifiée à ce jour n'est capable de former des spores.

2.3. Physiologie des cellules eucaryotes : Cas des champignons microscopiques

Le développement des moisissures comprend deux phases : phase végétative et phase reproductive.

2.3.1. La phase végétative

Elle correspond à la phase de croissance, l'appareil végétatif colonise le substrat par extension et ramification des hyphes. Il existe deux types de ramifications, la ramification par dichotomie (apex) ou par bourgeonnement (latéral). Cette phase correspond également à la phase de nutrition, les hyphes absorbant à travers leur paroi, l'eau ainsi que les éléments nutritifs contenus au sein du substrat tout en dégradant le substrat par émission d'enzymes et d'acides. La forme mycélienne en expansion, qui constitue une phase active de développement, est responsable de la dégradation et de l'altération du substrat.

2.3.2. La phase reproductive

Elle comprend deux types de reproduction : la reproduction asexuée, correspondant à la forme anamorphe, et la reproduction sexuée, correspondant à la forme téléomorphe.

2.3.2.1. La reproduction asexuée

Elle se fait sans fusion de gamètes. Elle correspond majoritairement à la dispersion de spores asexuées, permettant la propagation des moisissures afin de coloniser d'autres substrats. Cette forme de reproduction asexuée est appelée la sporulation. Au cours de la sporulation, ces spores, petites cellules déshydratées au métabolisme réduit et entourées d'une paroi protectrice les isolant du milieu environnant, sont produites en grande quantité par des structures spécialisées développées à partir du mycélium.

Leur diamètre varie de 2 à 250 μm . Il existe différentes formes de reproduction asexuée et différents types de spores (Figure 17). Les spores peuvent être le résultat de la fragmentation. Dans ce cas, un nouvel organisme se développe à partir d'un fragment parent de mycélium (arthrospore). Les spores peuvent aussi être produites de manière endogène à l'intérieur du sporocyste (sporocystiospores), ou de manière exogène en continu à l'extrémité des structures spécialisées appelées phialides (conidiospores). Ensuite, les spores se détachent du mycélium sous l'effet d'un petit choc mécanique, d'un frôlement ou d'un courant d'air. Il existe différents modes de propagation des spores. Les spores appelées gloeiospores sont véhiculées sur un nouveau substrat soit par contact, soit par des insectes ou soit par l'eau. Ces spores présentent une paroi épaisse et humide leur permettant de rester collées entre elles par un mucus et de former ainsi des amas difficilement transportables par l'air. Les spores appelées xérospores sont dissociables et légères leur permettant d'être facilement dispersées par l'air.

Après propagation et lorsque les spores se sont déposées sur un nouveau substrat, celles-ci peuvent rester inertes tant que l'environnement n'est pas favorable à leur développement. Quand les conditions environnementales deviennent favorables, elles « germent » comme des graines et émettent du mycélium.

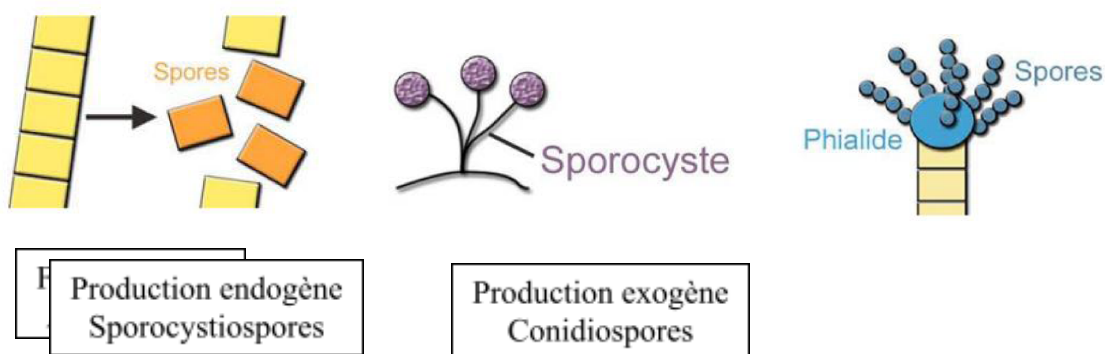


Figure 17 : Les différents modes de sporulation et les différents types de spores associées

2.3.2.2. La reproduction sexuée

Elle basée sur la fusion de deux gamètes haploïdes (n) donnant un zygote diploïde ($2n$). Une structure (+) à n chromosomes rencontre un autre structure (-) et la fusion des cytoplasmes donne naissance à un nouveau mycélium à $2n$ chromosomes (Figure 4). Il existe différents modes de fécondation en fonction des champignons : planogamie (fusion de gamètes complémentaires et flagellés), oogamie-siphonogamie (fécondation des gamètes femelles dans le sporocyste femelle par des gamètes flagellés provenant des gamétocystes mâles par l'intermédiaire d'un siphon), siphonogamie (accolement du gamétocyste mâle non flagellé au gamétocyste femelle puis émission d'un siphon, il n'y a pas de production de gamète flagellé mâle), trichogamie (fusion des parois du gamète mâle non flagellé appelé spermatie et de l'organe femelle appelé ascogone puis injection du noyau mâle), cystogamie (émission d'un diverticule par deux mycélia compatibles, accolement des deux diverticules et production d'une cloison appelée gamétocyste permettant le mélange des cytoplasmes) et la somatogamie (fusion de deux mycélia compatibles) (Figure 18).

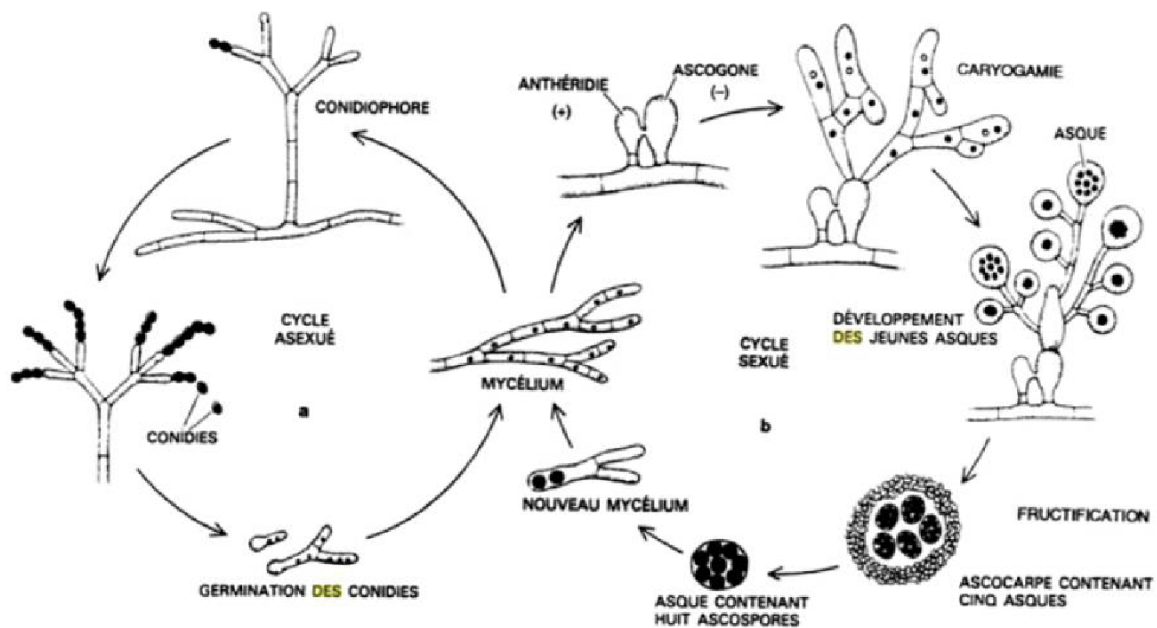


Figure 18 : Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure

III. CHAPITRE 3 : SYSTEMATIQUE DES MICROORGANISMES

3.1. Introduction

En sciences naturelles, la systématique correspond à la science des classifications. Sa première tâche consiste à identifier (identification), décrire (description) et inventorier (inventaire) des êtres vivants dans la nature présente et passée. La seconde est le classement taxonomique des êtres, qui permet de rendre intelligible leur immense diversité.

La science des règles (lois) de la classification des êtres vivants s'appelle taxinomie ou taxinomie, du grec taxis (ordre, arrangement) et nomos (loi). La taxinomie permet de nommer les organismes vivants (la nomenclature) et de les classer en groupes d'affinité ou unités (taxons), au sein desquels, ils partagent un grand nombre de caractéristiques communes. L'espèce est l'unité fondamentale de la classification, elle regroupe les organismes qui possèdent de nombreux caractères communs. A l'intérieur d'une même espèce, on distingue des souches.

En microbiologie, la systématique permet d'identifier (l'identification) les microorganismes pour mieux les utiliser ou les exploiter (ceux qui sont bénéfiques) ou bien pour mieux s'en protéger et de les contrôler (ceux qui sont pathogènes).

3.2. Systématique des bactéries

3.2.1. Classification phénotypique :

La classification phénétique (ou phénotypique) utilise un nombre de caractères considérés comme importants :

- Observations macroscopiques, microscopiques:
- Observation de la mobilité à l'état frais.
- Descriptions des colonies (forme, taille, couleur, consistance, odeur, texture)
- la morphologie des cellules (bacille, coque).
- leurs arrangements.
- Les colorations (Gram, bleu méthylène, acido-alcool-résistante).
- On peut également rechercher la présence d'endospores, la croissance aérobie, anaérobie.

Les caractères morphologiques sont utiles pour l'identification, mais ne peuvent pas démontrer à eux seuls les relations phylogénétiques.

3.2.1. Les Tests métaboliques :

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

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

3.2.2. La méthode sérologique:

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

3.2.3. Les tests d'inhibition :

On évalue la croissance des microorganismes sur des milieux sélectifs, en présence d'antibiotiques (antibiogramme).

3.2.4. La chimiotaxonomie:

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

3.2.5. La lysotypie :

Infection par des bactériophages et formation de plages de lyses. On définit le lysovar ou le lysotype (absence de culture signifie une lyse).

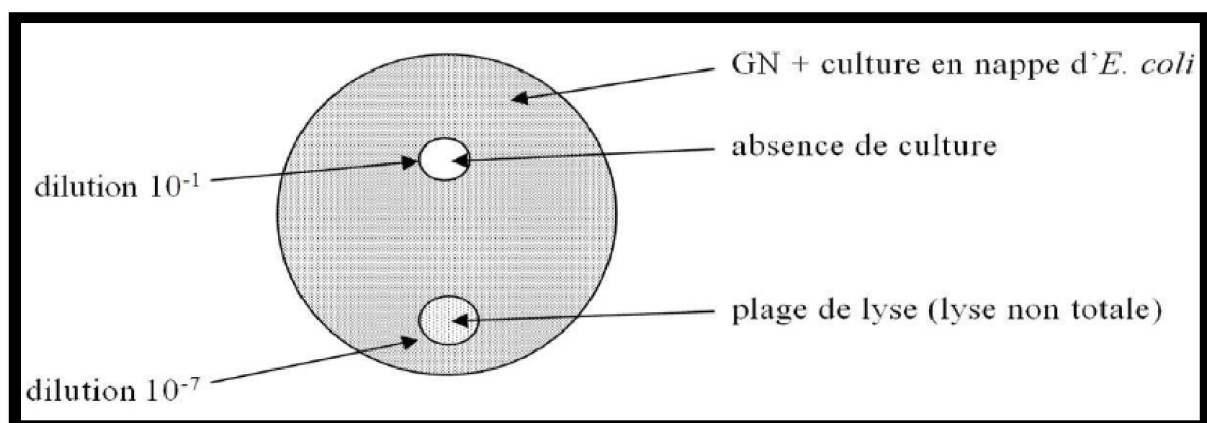


Figure 19 : Lysotypie d'*Escherichia coli* par un bactériophage (absence de culture signifie une lyse).

3.3. Taxonomie génétique ou phylogénique

Les critères recherchés sont:

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

3.3.1. La taille du génome

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

3.3.2. Composition en base d'ADN (Coefficient de Chargaff) :

Quel que soit l'espèce d'origine, l'ADN contient toujours autant de **purine** (Substance basique, dite base purique, à structure bicyclique, constituant important des nucléotides de la cellule vivante) que de **pyrimidine** (substance azotée dont la structure comporte une chaîne fermée, à 6 atomes, qui entre sous forme de dérivés dans la constitution des nucléotides et des acides nucléiques de la cellule vivante) soit :

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

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

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

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

Ou bien par une méthode de spectrométrie ultra-violet.

3.3.3. Hybridation ADN/ADN

Les températures clés et leurs définitions :

T_m : Point de fusion (Thermal elution midpoint) : Température de dénaturation de 50% de l'hybride

T_{or} : Température optimale de renaturation : $25^\circ \text{ à } 30^\circ \text{C} < \text{Température de dénaturation}$

T_{rr} : Température restrictive de renaturation: $10 \text{ à } 15^\circ \text{C} < \text{Température de dénaturation}$.

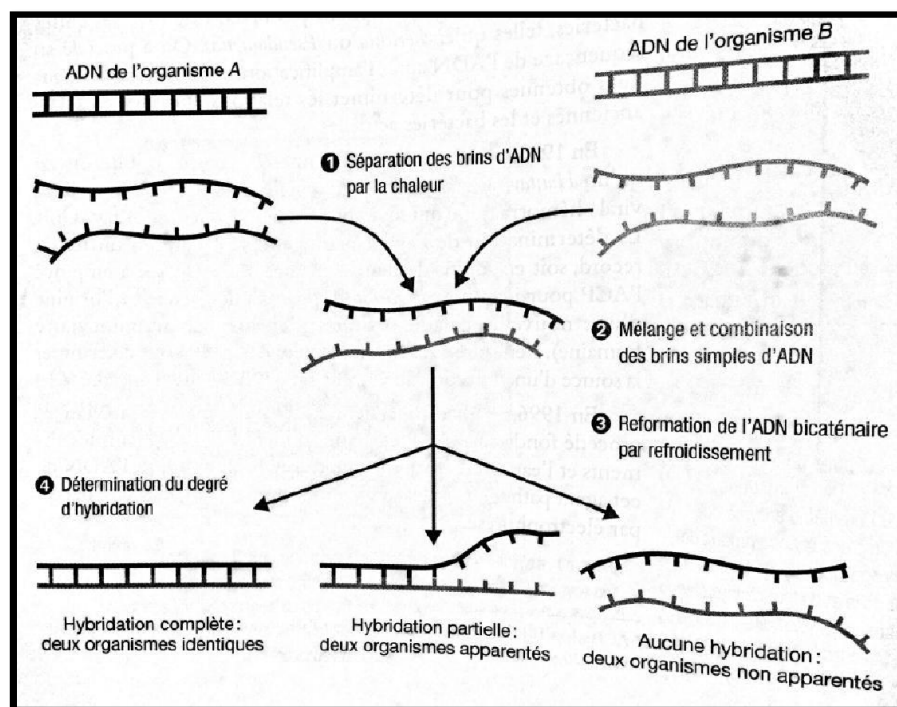


Figure 20 : Schéma explicative du phénomène de l'hybridation

3.3.4. Le séquençage des ARN ribosomiaux (ARNr)

Selon Woese, les ARNr sont les meilleurs chronomètres moléculaires par :

- La constance de leur fonction
- Leur répartition dans tous les organismes
- Leur grande taille

Les taxonomistes utilisent un maximum de caractères écologiques, morphologiques, métaboliques comme des propriétés moléculaires, afin d'obtenir les résultats les plus fiables et les plus réalistes.

3.4. La Classification selon le manuel de Bergey

Cette classification est la plus acceptée par tous les microbiologistes.

Dans ces premières éditions, en 1936, elle se basait sur l'étude :

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

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

- La division des "*Gracilicutes*". Regroupant les bactéries à Gram négatif.

*La division des "*Firmicutes*". Regroupant les bactéries à Gram positif.

*La division des "*Tenericutes*". Bactéries dépourvues de paroi, Gram négatif.

*La division des "*Mendosicutes*". Archaeobactéries.

3.2. Systématique des champignons microscopiques

Les levures et les moisissures appartiennent au règne des Mycètes (Fungi). Leur classification est basée sur le cloisonnement des hyphes et des caractères morphologiques observés lors de la reproduction sexuée (Tableau 5).

Tableau 5 : Classification des champignons microscopiques

Classe	Cloisonnement	Reproduction sexuée	Particularités / Exemples
Myxomycètes	non	oui	moisissures visqueuses plasmodiales
Oomycètes	non	oui (oospores)	<i>Plasmopara viticola</i> (mildiou de la vigne)
Zygomycètes	non	oui (zygospores)	Mucorales : <i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Absidia</i>
Ascomycètes	oui	oui (ascospores)	<i>Saccharomyces</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Hansenula</i> ; <i>Neurospora</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. nidulans</i>
Basidiomycètes	oui	oui (basidiospores)	nombreux champignons macroscopiques : <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Coprinus</i> ...
Deutéromycètes (<i>Fungi imperfecti</i>)	oui	Absente (ou inconnue)	<i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Brettanomyces</i> ; <i>Geotrichum</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i>